



No. 11-180696-00000-0000

Fecha: 2011-12-29 11:52:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI/ Eve: 378 FASENACIONAL/
Act. 411 PRESENTACION Folios: 188

Act. 411 PRESENTACION Folios: 187



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ NUEVOS CONJUGADOS, SU PREPARACION Y SU APLICACION
_____ TERAPEUTICA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ SANOFI

DOMICILIO _____ PARIS, FRANCIA

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456 .344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



No. 11-180696- -00000-0000
Fecha: 2011-12-29 11:52:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI 3n
Act. 411 PRESENTACION Folios: 188
Act. 411 PRESENTACION Folios: 187

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1

☒ Patente de Invención.
☒ Capítulo I.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **SANOFI**
Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Francia.

Dirección: 174 avenue de France,
F-75013, Paris,
Francia

Domicilio: Paris,
Francia

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**
Dirección: **Carrera 4ª. No. 72-35**
Teléfono: **347 36 11**
Fax: **211 86 50**
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: **Bogotá, Colombia.**

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____

Número 35.456.344 T.P 23.555

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. **Hervé BOUCHARD**
c/o Sanofi-Aventis,
Département Brevets,
174 avenue de France,
F-75013, Paris,
Francia

2. **Marie-Priscille BRUN**
c/o Sanofi-Aventis,
Département Brevets,
174 avenue de France,
F-75013, Paris,
Francia

3. **Alain COMMERÇON**
c/o Sanofi-Aventis,
Département Brevets,
174 avenue de France,
F-75013, Paris,
Francia

4. **Jidong ZHANG**
c/o Sanofi-Aventis,
Département Brevets,
174 avenue de France,
F-75013, Paris,
Francia

5

PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/FR2010/050986 Fecha: 20 de mayo de 2010
Publicación Internacional No. WO 2011/001052 A1 Fecha: 06 de enero de 2011

6

Título (54)
NUEVOS CONJUGADOS, SU PREPARACIÓN Y SU APLICACIÓN TERAPÉUTICA

7

Clasificación Internacional (51) C07D 273/008

8

Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen
FR
FR

(32) Fecha
29 de junio de 2009
25 de noviembre de 2009

(31) Número de Solicitud
0903170
0905651

9

Comprobante de pago No.: 11-126467
Comprobante de pago No.: 11-122614
Comprobante de pago No.: 11-122615
Comprobante de pago No.: 11-125023
Comprobante de pago No.: 11-122578
Comprobante de pago No.: 11-122576
Comprobante de pago No.: 11-122577
Comprobante de pago No.: 11-122676

Fecha: 28 de diciembre de 2011
Fecha: 16 de diciembre de 2011
Fecha: 16 de diciembre de 2011
Fecha: 23 de diciembre de 2011
Fecha: 16 de diciembre de 2011
Fecha: 16 de diciembre de 2011
Fecha: 16 de diciembre de 2011
Fecha: 16 de diciembre de 2011

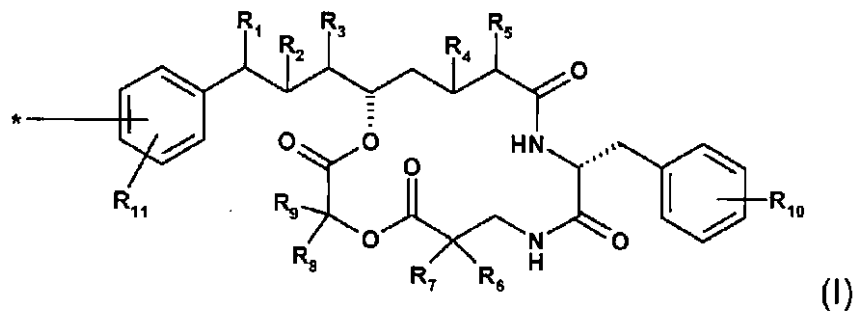
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 571.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 24 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$648.000.oo.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poder, si fuere el caso de **SANOFI**.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2011/001052 A1
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA:

Luz Clemencia de Paez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2011/001052 A1

Descripción:

Páginas 124 en español

Reivindicaciones: Número 34

Figuras: Número 2

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ **Forma PCT/IB/306.** notificación de la anotación del cambio de nombre de la sociedad solicitante de SANOFI-AVENTIS a SANOFI.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY



Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

SANOFI

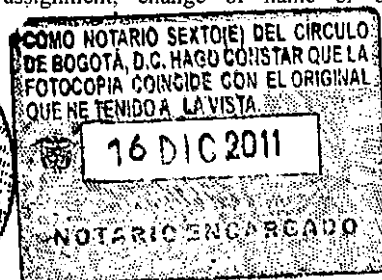
domiciliado (s) en/of 174, avenue de France, 75013 Paris, France

por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; OSCAR CORREA BARBOSA, tpa.71027 y EDNA SARMIENTO CHARRY, tpa. 65794, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el párrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; OSCAR CORREA BARBOSA, tpa.71027 y EDNA SARMIENTO CHARRY, tpa. 65794, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) **Obtención de patentes de invención**; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) **Obtainment of patents**; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary





registro de marcas de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos empresariales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contenciosos administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 9th of May 2011

en/in Paris

[Handwritten signature of Josiane MERLIER]

for/by Josiane MERLIER
Director, Patent Administration

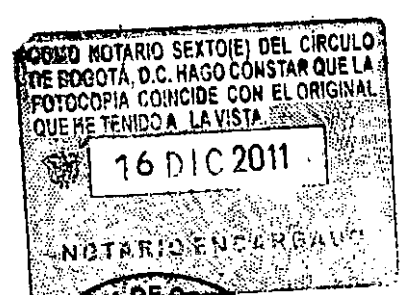
SANOFI
174, avenue de France
75013 PARIS - France
395 030 844 RCS PARIS

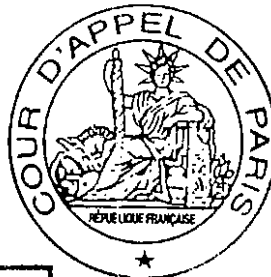
Firma

Signature

Je soussigné Me **Antoine BAILLY**
Notaire à Paris, certifie matériellement
la signature de M^{me} **Josiane MERLIER**.
apposée sur le présent document.
Cette certification ne comporte aucune
vérification de l'exactitude des faits et
actes mentionnés dans le présent document

[Handwritten signature of Antoine BAILLY]





APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par M. BAILEY

3. agissant en qualité de Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de Son étude

Attesté

5. à Paris

24 JUIN 2011

6. le

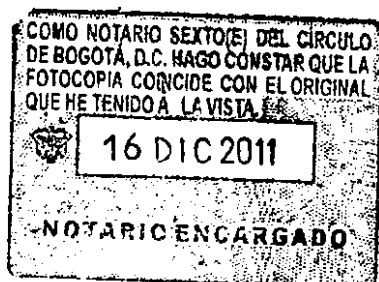
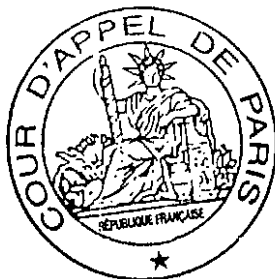
7. par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

8. sous n° 45089

9. Sceau : Jean MARTIN

10. Signature : [Signature]
Avocat général

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"



BAILLY POMMERY CAURO

Notaires

Successeurs de Maîtres BAILLY et BUCAILLE

30, rue La Boétie – 75008 PARIS

☎ 01.53.53.53.00 - Fax 01.53.53.53.01

Dossier suivi par / Matter followed by Mr Michaël FREDIER
Tél direct: 01 53 53 53 18 / Fax: 01 53 53 53 01
E-Mail: mickael.fredier.75018@paris.notaires.fr

Expediente seguido por D. Michaël FREDIER
Tel. directo: 01 53 53 53 00/Fax: 01 53 53 53 01
Mail: mickael.fredier.75018@paris.notaires.fr

NOTARY'S CERTIFICATE

I, the undersigned, Me Antoine BAILLY, Notary Public in the firm of notaries « BAILLY-POMMERY-CAURO » holding office as Notary Public at 30, rue la Boétie, Paris (8th district).

HEREBY CERTIFY THAT:

I. SANOFI is a French company registered in the Paris Trade and Companies Register under the number 395 030 844, having its registered office at 174 avenue de France, Paris (75013), and has been validly incorporated in accordance with French laws.

II. Mrs Josiane MERLIER is well known to me and is the person who signed the preceding document.

III. Mrs Josiane MERLIER, in her capacity as Director, Patent Administration, has sufficient powers of representation and is duly qualified to sign and represent SANOFI for the purposes of the preceding document.

Done in PARIS,
On June 24, 2011



Métro : Miromesnil – Parkings publics : 163 ou 164 Boulevard Haussmann, ou Rond-Point de l'Europe
Membre d'une association agréée. Le règlement des honoraires par chèque
RCS PARIS n° D 323 377 390

CERTIFICADO NOTARIAL

El abajo firmante, don Antoine BAILLY, Notario miembro de la Sociedad Civil Profesional «BAILLY-POMMERY-CAURO», titular de la Notaria de París (Distrito 8) sita en 30, rue la Boétie.

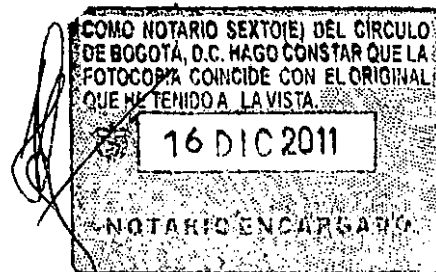
CERTIFICO Y DOY FE DE QUE:

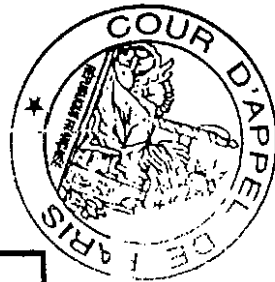
I. SANOFI es una sociedad francesa inscrita en el Registro Mercantil de PARÍS con el N° 395 030 844 y con domicilio social en París (75013), 174 avenue de France, y que la misma se encuentra válidamente constituida de conformidad con la legislación francesa;

II. Conozco a D^a Josiane MERLIER y es la persona que ha firmado el documento precedente;

III. D^a Josiane MERLIER ostenta, en su calidad de Director de Administración de Patentes, poderes de representación suficientes y está debidamente facultada para firmar y representar a la sociedad SANOFI a los efectos del documento precedente.

Hecho en PARÍS,
El 24 de junio 2011





APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par M. BAILLY

3. agissant en qualité de Notaire

4. est revêtu du sceau/livre de Son étude

Attesté

5. à Paris

6. le 24 JUIN 2011

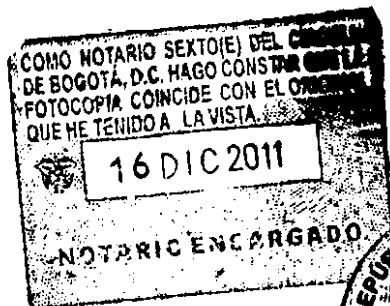
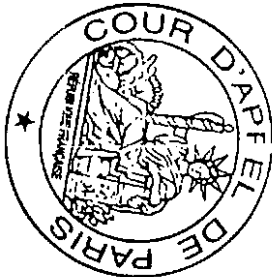
7. par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

8. sous n° 45086

9. Sceau :

10. Signature : Jean MARTIN
Avocat général

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou
l'imbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est
correct ou que la République française approuve son contenu"



CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4ª. NO. 72-35

Bogotá 8 - Colombia

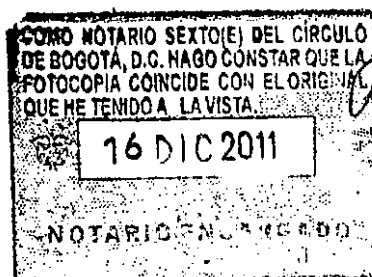
REPRESENTACIÓN Y PODER

Yo (nosotros) abajo firmado(s)

SANOFIDomiciliado(s) en 174, avenue de France, 75013 París, Francia

Por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555; OSCAR CORREA BARBOSA, tpa 65794, domiciliados en la carrera 4ª. No. 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o. del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquel. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero, y se tratará de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, unos y otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de inversión, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contenciosos administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar,



Traductora e intérprete oficial
Resolución 133 del 30/01/1992

admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Dado y firmado hoy 9 de mayo de 2011 en París

(Firma ilegible)
Por Josiane MERLIER
Director, Administración de Patente

Sello de SANOFI
174, avenue de France
75013 PARÍS – Francia
395 030 844 RCS PARÍS

El suscrito Notario Antoine BAILLY, Notario en París, certifica materialmente la firma de la Señora Josiane MERLIER colocada en este documento.
Esta certificación no comprende ninguna verificación de la exactitud de los hechos y de los actos mencionados en este documento.
(Firma ilegible)

APOSTILLA
(Convention de la Haye, du 5 octobre 1961)

- 1. **República Francesa**
Este acto público
- 2. fue firmado por: **Notario BAILLY**
- 3. Quien actúa en su capacidad de: **Notario**
- 4. Lleva el Sello de: **Notaria**

CERTIFICADO

- 5. En: **París**
- 6. El: **24 de junio de 2011**
- 7. Por: **Procurador General del Tribunal de Apelación de París**
- 8. No: **45089**
- 9. Sello/Estampilla:
- 10. Firma: **(Firma ilegible)**
Jean Martin
Abogado General

(Sello del Procurador del Tribunal de Apelación de París)

“La Apostilla confirma solamente la autenticidad de la firma, del sello o de la estampilla sobre el documento. Esta no significa que el contenido del documento sea correcto o que la República francesa apruebe su contenido”.

Traducción oficial No. 784/2011 de un documento expedido en francés. Traducción realizada por **Jeannette Insignares Melo**, traductora e intérprete oficial juramentada de francés-español, español-francés según Resolución 5451 de 1982 del Ministerio de Justicia Colombia. Bogotá, D.C., julio 19 de 2011.



BAILLY POMMERY CAURO

Notarios

Sucesores de los Notarios BAILLY y BUCAILLE

30, rue de la Boétie – 75008 PARÍS

☎ 01.53.53.53.00 – Fax: 01.53.53.53.01

Expediente seguido por D. Michael FREDIER

Teléfono directo: 01 53 53 53 00 / fax 01 53 53 53 01

Mai : michael.fredier.75018@paris.notaires.fr**CERTIFICADO NOTARIAL**

El abajo firmante, Notario Antoine BAILLY, Notario miembro de la Sociedad Civil Profesional BAILLY-POMMERY-CAURO, titular de la notaria de París (Distrito 8), sita en 30 rue la Boétie, París 8.

CERTIFICO Y DOY FE DE QUE:

- I. SANOFI, es una sociedad francesa inscrita en el Registro Mercantil de París con el No. 395 030 844 y con domicilio social en París (75013), 174 Avenue de France, y que la misma se encuentra válidamente constituida de conformidad con la legislación francesa;
- II. Conozco a Doña Josiane MERLIER y es la persona que ha firmado el documento precedente;
- III. Doña Josiane MERLIER ostenta, en su calidad de Director de Administración de Patentes, poderes de representación suficientes y está debidamente facultada para firmar y representar a la sociedad SANOFI a los efectos del documento precedente,

Hecho en París,

El 24 de junio de 2011

(Firma ilegible)

(Firma ilegible)

Miembro de una asociación autorizada. Se acepta el pago con cheque
RCS París No. D 323 377 390

APOSTILLA

(Convention de la Haye, du 5 octobre 1961)

1. **República Francesa**
Este acto público
2. fue firmado por: **Notario BAILLY**
3. Quien actúa en su capacidad de: **Notario**
4. Lleva el Sello de: **Notaría**



11

CERTIFICADO

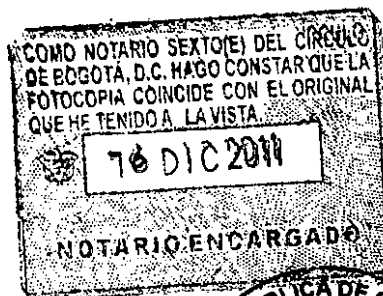
5. En: **París**
6. El: **24 de junio de 2011**
7. Por: **Procurador General del Tribunal de Apelación de París**
8. No: **45086**
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: **(Firma ilegible)**
Jean Martin
Abogado General

(Sello del Procurador del Tribunal de Apelación de París)

"La Apostilla confirma solamente la autenticidad de la firma, del sello o de la estampilla sobre el documento. Esta no significa que el contenido del documento sea correcto o que la República francesa apruebe su contenido".

Traducción oficial No. 786/2011 de un documento expedido en francés. Traducción realizada por **Jeannette Insignares Melo**, traductora e intérprete oficial juramentada de francés-español, español-francés según Resolución 5451 de 1982 del Ministerio de Justicia Colombia. Bogotá, D.C., julio 19 de 2011.

Jeannette Insignares Melo
Jeannette Insignares Melo
Traductora e intérprete oficial
Resolución 133 del 30/01/1992



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

082590

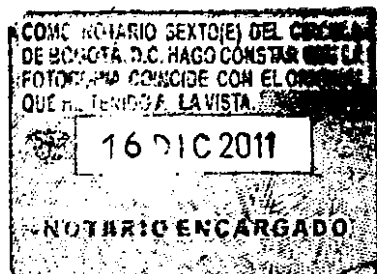
Neuquén insign

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEADO
AS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2011 JUL 19 A 10:01

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



M^r **Antoine BAILLY**
Certifie le présent document
Conforme à l'original
qui lui a été présenté

sanofi-aventis Ref No. FR2509-071

ASSIGNMENT AND AGREEMENT

Effective as of 29 June 2009, for value received and intending to be legally bound, I/we, the undersigned joint inventor(s) (Assignor(s)), sell, assign and transfer to **Sanofi-aventis** (Assignee), 174 avenue de France, 75013 PARIS, FRANCE, and its successors, assigns and legal representatives, the entire right, title and interest in and to my/our invention and any improvements thereon for all countries of the world, relating in and to the application for Letters Patent therefore, assigned Attorney Docket No. FR2009/071, and entitled

New conjugates, preparation of said conjugates and the therapeutic use of said conjugates

and for all patent applications which claim priority to or are derived from said priority applications:

Priority Application Filing Date: 29 June 2009
Priority Application No.: France 0903170

Priority Application Filing Date: 25 November 2009
Priority Application No.: France 0905651

and all the rights and privileges, including any and all benefits under the International Convention for the Protection of Industrial Property, including the right to claim priority based on the above applications, and under any and all Letters Patent which may be granted therefore, and all right, title and interest in and to every patent application filed or to be filed on said invention in any other country or patent organization, including continuations, divisions, renewals, revivals, and any substitute applications of said priority application, and any and all patents which may issue thereon, and any reissues, pipelines and extensions, and governmental exclusivity rights of the same.

I/we authorize and request competent authorities to grant and issue any and all patents on said invention to said assignee or its successor, assigns and legal representatives, or to such nominees as said assignee may designate.

I/we agree that, when requested, I/we will, without charge to said assignee but at its expense, sign all papers, take all rightful oaths, and do all acts which may be necessary, desirable or convenient for securing and maintaining patents for said invention in any and all countries and for vesting title thereto in said assignee, its successors, assigns, legal representatives or nominees.

I/we covenant with said assignee, its successors, assigns and legal representatives, that the rights and property herein conveyed are free and clear of any encumbrance, and that I/we have full right to convey the same as herein expressed.

Signed at Vitry/Seine France on this 31st day of March 2010.
(City, State and Nation)

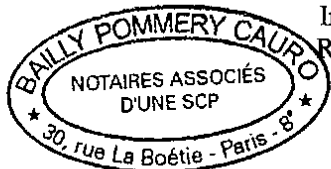
Signature: _____

Inventor's Name: **COMMERÇON Alain**

Residential Address: c/o sanofi-aventis,
Département Brevets,
174 avenue de France,
75013 PARIS, FRANCE

Je soussigné Me **Hervé POMMERY**
Notaire à Paris, certifie matériellement
la signature de Monsieur **Alain COMMERÇON**.

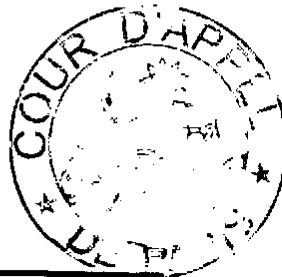
apposée sur le présent document.
Cette certification ne comporte aucune
vérification de l'exactitude des faits
actes mentionnés dans le présent document.



Witnessed by:

Jidong Zhang
Catherine DANIEL

[Signature]
[Signature]



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par Me BAILLY

3. agissant en qualité de Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de Son étude

Attesté

5. à Paris

6. le 11 OCT. 2011

7. par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

8. sous n° 67341

9. Sceau : 10. Signature :

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"



13
Mr Antoine BAILLY
Certifie le présent document
Conforme à l'original
qui lui a été présenté

sanofi-aventis Ref No. FR2009/071

ASSIGNMENT AND AGREEMENT

Effective as of June 29, 2009 for value received and intending to be legally bound, I/we, the undersigned joint inventor(s) (Assignor(s)), sell, assign and transfer to Sanofi-aventis (Assignee), 174 avenue de France, 75013 PARIS, FRANCE, and its successors, assigns and legal representatives, the entire right, title and interest in and to my/our invention and any improvements thereon for all countries of the world, relating in and to the application for Letters Patent therefore, assigned Attorney Docket No.FR2009/071, and entitled

NOUVEAUX CONJUGUES, LEUR PREPARATION ET LEUR APPLICATION EN THERAPEUTIQUE

and for all patent applications which claim priority to or are derived from said priority applications:

FR Priority Application Filing Date: June 29, 2009
FR Priority Application No.: 0903170

And

FR Priority Application Filing Date: November 25, 2009
FR Priority Application No.: 0905651

and all the rights and privileges, including any and all benefits under the International Convention for the Protection of Industrial Property, including the right to claim priority based on the above applications, and under any and all Letters Patent which may be granted therefore, and all right, title and interest in and to every patent application filed or to be filed on said invention in any other country or patent organization, including continuations, divisions, renewals, revivals, and any substitute applications of said priority application, and any and all patents which may issue thereon, and any reissues, pipelines and extensions, and governmental exclusivity rights of the same.

I/we authorize and request competent authorities to grant and issue any and all patents on said invention to said assignee or its successor, assigns and legal representatives, or to such nominees as said assignee may designate.

I/we agree that, when requested, I/we will, without charge to said assignee but at its expense, sign all papers, take all rightful oaths, and do all acts which may be necessary, desirable or convenient for securing and maintaining patents for said invention in any and all countries and for vesting title thereto in said assignee, its successors, assigns, legal representatives or nominees.

I/we covenant with said assignee, its successors, assigns and legal representatives, that the rights and property herein conveyed are free and clear of any encumbrance, and that I/we have full right to convey the same as herein expressed.

Signed at Vitry / Seine on this 10th day of June 2010, 2010.
(City, State and Nation)

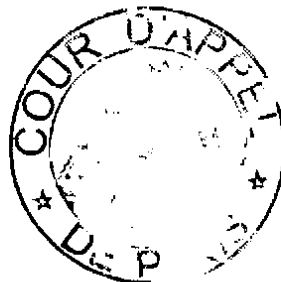
Signature: [Signature]
Inventor's Name: BOUCHARD Hervé
Residential Address: c/o sanofi-aventis,
Département Brevets,
174 avenue de France,
75013 PARIS, FRANCE

1. Witnessed by:
Signature: [Signature]

Name: LERCY Vincent

2. Witnessed by:
Signature: [Signature]

Name: Christian Vincent



APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par. **Me BAILLY**

3. agissant en qualité de. **Notaire**

4. est revêtu du sceau/timbre de. **Son étude**

Attesté

5. à Paris

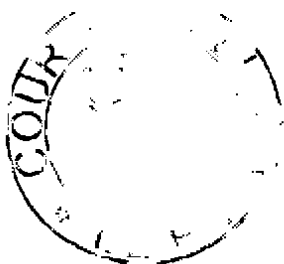
6. le. **11 OCT. 2011**

7. par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

8. sous n° **67342**

9. Sceau : 10. Signature : **[Signature]**

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"



Signed at _____ on this _____ day of _____, 2010.
(City, State and Nation)

Signature: _____
Inventor's Name: COMMERÇON Alain
Residential Address: c/o sanofi-aventis,
Département Brevets,
174 avenue de France,
75013 PARIS, FRANCE

1. Witnessed by:
Signature: _____
Name: LEROY Vincent

2. Witnessed by:
Signature: _____
Name: Christian VISTOU

Signed at Vitry sur Seine on this 10th day of June, 2010.
(City, State and Nation)

Signature: _____
Inventor's Name: BRUN Marie-Priscille
Residential Address: c/o sanofi-aventis,
Département Brevets,
174 avenue de France,
75013 PARIS, FRANCE

1. Witnessed by:
Signature: _____
Name: LEROY Vincent

2. Witnessed by:
Signature: _____
Name: Christian VISTOU

Signed at Vitry / Seine on this 10th day of June, 2010.
(City, State and Nation)

Signature: _____
Inventor's Name: ZHANG Jidong
Residential Address: c/o sanofi-aventis,
Département Brevets,
174 avenue de France,
75013 PARIS, FRANCE

1. Witnessed by:
Signature: _____
Name: LEROY Vincent

2. Witnessed by:
Signature: _____
Name: Christian VISTOU

Je soussigné Me **Antoine BAILLY**
Notaire à Paris, certifie matériellement
la signature de MM. **Henri BOUCHARD**,
Jidong ZHANG et Mme **Marie-Priscille BRUN**
apposée sur le présent document.
Cette certification ne comporte aucune
vérification de l'exactitude des faits et
actes mentionnés dans le présent document.

Antoine BAILLY, Notaire à Paris


SANOFI-AVENTIS

Société Anonyme au capital de 2 621 995 570 €
Siège social : 174 avenue de France – 75013 PARIS
395 030 844 R.C.S. PARIS

ASSEMBLEE GENERALE MIXTE

DU 6 MAI 2011

EXTRAIT DU PROCES VERBAL

Résolutions relevant de la compétence de l'assemblée générale extraordinaire

VINGT-SIXIEME RESOLUTION

Changement de dénomination sociale et modification corrélative des statuts

L'assemblée générale, statuant aux conditions de quorum et de majorité requises pour les assemblées extraordinaires, connaissance prise du rapport du conseil d'administration décide de modifier la dénomination de la Société en Sanofi à compter de ce jour et de modifier en conséquence l'article 2 des statuts ainsi qu'il suit :

« Article 2 - Dénomination

La société a pour dénomination sociale : Sanofi. »

Cette résolution est adoptée :

970 406 003 voix pour
1 407 729 voix contre ou abstentions.

M^r Antoine BAILLY
Certifie le présent document
Conforme à l'original
qui lui a été présenté

VINGT-SEPTIEME RESOLUTION

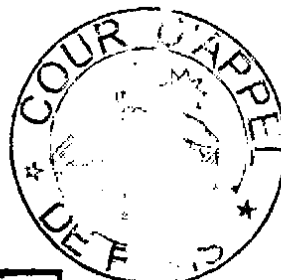
Pouvoirs pour les formalités

L'assemblée générale, statuant aux conditions de quorum et de majorité requises pour les assemblées extraordinaires, confère tous pouvoirs au porteur d'un original, d'une copie ou d'un extrait du procès-verbal de ses délibérations, pour effectuer tous dépôts (y compris tout dépôt au greffe compétent) et formalités requis par la loi.

Cette résolution est adoptée :

970 704 471 voix pour
1 109 261 voix contre ou abstentions.


M. Felitti



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par. **Me BAILLY**

3. agissant en qualité de... **Notaire**

4. est revêtu du sceau/timbre de. **Son étude**

Attesté

5. à Paris

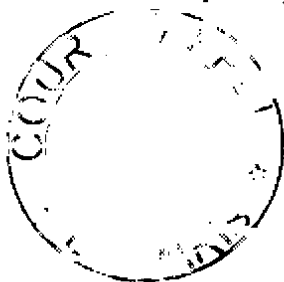
6. le... **11 OCT. 2011**

7. par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

8. sous n° **67338**

9. Sceau : 10. Signature :

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"



SANOFI-AVENTIS

Limited company with capital of € 2 621 995 570
 Registered office: 174 avenue de France – 75013 PARIS
 395 030 844 R.C.S. PARIS

COMBINED GENERAL MEETING**OF 6 MAY 2011****EXTRACT FROM THE MINUTES****Resolutions falling within the remit of the extraordinary general meeting****TWENTY-SIXTH RESOLUTION**

Change in company name and corresponding amendment of the articles of association

The general meeting, acting under the conditions of quorum and majority required for extraordinary meetings, being aware of the report by the board of directors, decided to change the name of the company to Sanofi with immediate effect and to consequently amend Article 2 of the articles of association as follows:

"Article 2 – Name

The name of the company is: Sanofi."

This resolution was adopted by:

970 406 003 votes in favour

1 407 729 votes against or abstentions.

TWENTY-SEVENTH RESOLUTION

Powers for formalities

The general meeting, acting under the conditions of quorum and majority required for extraordinary meetings, conferred all powers on the bearer of an original or of a copy of or of an extract from the minutes of its deliberations, in order to carry out all filings (including any filing at the relevant registry) and formalities required by law.

This resolution was adopted by:

970 704 471 votes in favour

1 109 261 votes against or abstentions.

..... **Certified true copy**

[signed]

M. Felitti

sanofi-aventis Ref No. FR2009/071

CESIÓN Y ACUERDO

Con vigencia del 29 de junio de 2009, por el valor recibido y con la intención de que sea legalmente vinculante, yo/nosotros, los suscritos inventores copartícipes (Cesionistas), vendemos, cedemos y transferimos a Sanofi-aventis (Cesionario), 174 avenue de France, 75013 PARÍS, FRANCIA, y sucesores, cesionarios y representantes legales, el total derecho, título intereses de mi/nuestro invento y de cualesquier mejoras de éste para todos los países del mundo, relacionados con la solicitud de Patentes de Invención por ellos, Expediente Abogado No. FR2009/071, y titulares.

NUEVOS CONJUGADOS, PREPARACIÓN DE DICHOS CONJUGADOS Y EL USO TERAPÉUTICO DE TALES CONJUGADOS

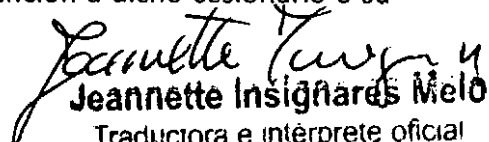
y todas las solicitudes de patentes que reivindiquen prioridades de dichas solicitudes de prioridad o que deriven de éstas.

Fecha de Solicitud de Registro Prioritario:	Junio 29 de 2009
No. de solicitud de Prioridad:	Francia 0903170

Fecha de Solicitud de Registro Prioritario:	Noviembre 25 de 2009
No. de solicitud de Prioridad:	Francia 0905651

y todos los derechos y privilegios, incluidos cualquiera y todos los beneficios de conformidad con la Convención para la Protección de la Propiedad Industrial, incluido el derecho a reivindicar prioridad basado en las anteriores solicitudes, y de conformidad con cualquiera y todas las Patentes de Invención que sean otorgadas por ello, y todos los derechos, títulos e intereses en cada una de las patentes registradas o por registrar de dicha invención en cualquier otro país u organización de patentes, incluidas las continuaciones, divisiones, renovaciones, reactivación y toda solicitud substituta de dicha solicitud prioritaria, y cualquiera y todas las patentes que puedan expedirse de éstas, y cualesquier reediciones, en trámite y extensiones, y los derechos exclusivos gubernamentales del mismo.

Yo/nosotros autorizo/autorizamos y solicitamos a las autoridades competentes otorgar y expedir cualquiera y todas las patentes de tal invención a dicho cesionario o su


Jeannette Insignares Melo
Traductora e intérprete oficial
Resolución 133 del 30/01/1992

sucesores, abogados y representantes legales, o al designado que el cesionario haya podido designar.

Yo/nosotros acuerdo/acordamos que, cuando me/nos sea solicitado, sin cargo alguno para dicho cesionario pero a sus expensas, firmaremos todos los documentos, tomaremos los juramentos legales y realizaremos todos los actos que puedan ser necesarios, aconsejables o convenientes para asegurar y mantener las patentes de tal invención en cualquiera y todos los países y para transferir el título de propiedad de éste en dicho concesionario, sus sucesores, abogados, representantes legales o designados.

Yo/nosotros convenimos con dicho concesionario, sus sucesores, abogados y representantes legales, que todos los derechos y bienes aquí transferidos están libres de cualquier gravamen, y que tengo/tenemos el pleno derecho a transferir la misma como se ha expresado en este documento.

Firmado en Vitry/Seine - Francia, el 31 de marzo de 2010

(Ciudad, estado y nación)

Firma

(Firma ilegible)

Nombre del Inventor:

COMMERÇON Alain
c/o Sanofi-Aventis
Departamento de Patentes
174 avenue de France
75013 PARÍS, FRANCIA

Testigos:

Jidong Zhang

(Firma ilegible)

Catherine DANIEL

(Firma ilegible)

Sello del Notario Antoine BAILLY

Autenticación de este documento conforme al original que le fue presentado

(Firma ilegible)

El suscrito Notario Hervé POMMERY, Notario en París, certifica materialmente la firma del Señor Alain COMMERÇON colocada en este documento.

Este certificado no comprende ninguna verificación de la exactitud de los hechos y de los actos mencionados en este documento.

(Firma ilegible)

Sello de BAILLY POMMERY CAURO

NOTARIOS ASOCIADOS DE UNA SCP

30, rue de la Boétie – París 8


Jeannette Instigares Nieto
Traductora e intérprete oficial
Resolución 133 del 30/01/1992

APOSTILLA

(Convention de la Haye, du 5 octobre 1961)

1. **República Francesa**
Este acto público
2. fue firmado por: **Notario BAILLY**
3. Quien actúa en su capacidad de: **Notario**
4. Lleva el Sello de: **Su Notaría**

CERTIFICADO

5. En: **París**
6. El: **11 de octubre de 2011**
7. Por: **Procurador General del Tribunal de Apelación de París**
8. No: **67 341**
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: **(Firma ilegible)**
Jean Martin
Abogado General

(Sello del Tribunal de Apelación de París)

"La Apostilla confirma solamente la autenticidad de la firma, del sello o de la estampilla sobre el documento. Esta no significa que el contenido del documento sea correcto o que la República francesa apruebe su contenido".

Traducción oficial No. 1144/2011 de un documento expedido en inglés y francés. Traducción realizada por **Jeannette Insignares Melo**, traductora e intérprete oficial juramentada de francés-español-francés e inglés-español-inglés según Resoluciones 5451 de 1982 y 133 de 1992 del Ministerio de Justicia Colombia. Bogotá, D.C., noviembre 22 de 2011.

NOSE APLICA
RESOLUCION 133 DE 1992
107888
Jeannette Insignares Melo
LAS FUNDACIONES

Jeannette Insignares Melo
Jeannette Insignares Melo
Traductora e intérprete oficial
Resolución 5451 del 5/11/1982

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
23. NOV 24 11 35
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

Traducción oficial No. 1145/2011 de un documento expedido en inglés y legalización en francés

sanofi-aventis Ref No. FR2009/071

CESIÓN Y ACUERDO

Con vigencia del 29 de junio de 2009, por el valor recibido y con la intención de que sea legalmente vinculante, yo/nosotros, los suscritos inventores copartícipes (Cesionistas), vendemos, cedemos y transferimos a Sanofi-aventis (Cesionario), 174 avenue de France, 75013 PARÍS, FRANCIA, y sucesores, cesionarios y representantes legales, el total derecho, título intereses de mi/nuestro invento y de cualesquier mejoras de éste para todos los países del mundo, relacionados con la solicitud de Patentes de Invención por ellos, Expediente Abogado No. FR2009/071, y titulares.

NUEVOS CONJUGADOS, SU PREPARACIÓN Y SU APLICACIÓN EN USO TERAPÉUTICO

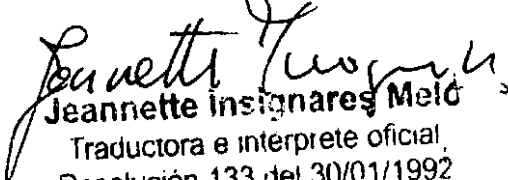
y todas las solicitudes de patentes que reivindiquen prioridades de dichas solicitudes de prioridad o que deriven de éstas.

Fecha de Solicitud de Registro Prioritario:	Junio 29 de 2009
No. de solicitud de Prioridad:	Francia 0903170

Fecha de Solicitud de Registro Prioritario:	Noviembre 25 de 2009
No. de solicitud de Prioridad:	Francia 0905651

y todos los derechos y privilegios, incluidos cualquiera y todos los beneficios de conformidad con la Convención para la Protección de la Propiedad Industrial, incluido el derecho a reivindicar prioridad basado en las anteriores solicitudes, y de conformidad con cualquiera y todas las Patentes de Invención que sean otorgadas por ello, y todos los derechos, títulos e intereses en cada una de las patentes registradas o por registrar de dicha invención en cualquier otro país u organización de patentes, incluidas las continuaciones, divisiones, renovaciones, reactivación y toda solicitud substituta de dicha solicitud prioritaria, y cualquiera y todas las patentes que puedan expedirse de éstas, y cualesquier reediciones, en trámite y extensiones, y los derechos exclusivos gubernamentales del mismo.

Yo/nosotros autorizo/autorizamos y solicitamos a las autoridades competentes otorgar y expedir cualquiera y todas las patentes de tal invención a dicho cesionario o su


Jeannette Insignares Melo
Traductora e interprete oficial
Resolución 133 del 30/01/1992

sucesores, abogados y representantes legales, o al designado que el cesionario haya podido designar.

Yo/nosotros acuerdo/acordamos que, cuando me/nos sea solicitado, sin cargo alguno para dicho cesionario pero a sus expensas, firmaremos todos los documentos, tomaremos los juramentos legales y realizaremos todos los actos que puedan ser necesarios, aconsejables o convenientes para asegurar y mantener las patentes de tal invención en cualquiera y todos los países y para transferir el título de propiedad de éste en dicho concesionario, sus sucesores, abogados, representantes legales o designados.

Yo/nosotros convenimos con dicho concesionario, sus sucesores, abogados y representantes legales, que todos los derechos y bienes aquí transferidos están libres de cualquier gravamen, y que tengo/tenemos el pleno derecho a transferir la misma como se ha expresado en este documento.

Firmado en Vitry/Seine - Francia, el 10 de junio de 2010
(Ciudad, estado y nación)

Firma (Firma ilegible)
Nombre del Inventor: BOUCHARD Hervé
c/o Sanofi-Aventis
Departamento de Patentes
174 avenue de France
75013 PARÍS, FRANCIA

- | | |
|-------------------------|--------------------------|
| 1. Testigo: | 2. Testigo: |
| Firma: (Firma ilegible) | <u>(Firma ilegible)</u> |
| Nombre: LEROY Vincent | Nombre: Christian VISKOV |

Sello del Notario Antoine BAILLY
Autenticación de este documento conforme al original que le fue presentado
(Firma ilegible)

Firmado en _____
(Ciudad, estado y nación)

Firma (Firma ilegible)
Nombre del Inventor: COMMERÇON Alain
c/o Sanofi-Aventis
Departamento de Patentes
174 avenue de France
75013 PARÍS, FRANCIA


Jeannette Insignares Meio
Traductora e intérprete oficial
Resolución 133 del 30/01/1992

1. Testigo:

Firma: (Firma ilegible)

Nombre: LEROY Vincent

2. Testigo:

(Firma ilegible)

Nombre: Christian VISKOV

Firmado en Vitry/Seine - Francia, el 10 de junio de 2010

(Ciudad, estado y nación)

Firma

(Firma ilegible)

Nombre del Inventor:

Brun marie-Priscille

c/o Sanofi-Aventis

Departamento de Patentes

174 avenue de France

75013 PARÍS, FRANCIA

1. Testigo:

Firma: (Firma ilegible)

Nombre: LEROY Vincent

2. Testigo:

(Firma ilegible)

Nombre: Christian VISKOV

Firmado en Vitry/Seine - Francia, el 10 de junio de 2010

(Ciudad, estado y nación)

Firma

(Firma ilegible)

Nombre del Inventor:

ZHANG Jidong

c/o Sanofi-Aventis

Departamento de Patentes

174 avenue de France

75013 PARÍS, FRANCIA

1. Testigo:

Firma: (Firma ilegible)

Nombre: LEROY Vincent

2. Testigo:

(Firma ilegible)

Nombre: Christian VISKOV

El suscrito Notario Antoine BAILLY, Notario en París, certifica materialmente la firma de los Señores Hervé BOUCHARD, Jidong ZHANG y de la Señora Marie-Priscille BRUN colocadas en este documento.

Este certificado no comprende ninguna verificación de la exactitud de los hechos y de los actos mencionados en este documento.

(Firma ilegible)

Sello de Antoine BAILLY, Notario en París – Corte de Apelación

(Firma ilegible)


Jeannette Insignares Melo
Traductora e intérprete oficial
Resolución 5451 del 5/11/1982

APOSTILLA

(Convention de la Haye, du 5 octobre 1961)

1. **República Francesa**
Este acto público
2. fue firmado por: **Notario BAILLY**
3. Quien actúa en su capacidad de: **Notario**
4. Lleva el Sello de: **Su Notaría**

CERTIFICADO

5. En: **París**
6. El: **11 de octubre de 2011**
7. Por: **Procurador General del Tribunal de Apelación de París**
8. No: **67 342**
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: **(Firma ilegible)**
Jean Martin
Abogado General

(Sello del Tribunal de Apelación de París)

"La Apostilla confirma solamente la autenticidad de la firma, del sello o de la estampilla sobre el documento. Esta no significa que el contenido del documento sea correcto o que la República francesa apruebe su contenido".

Traducción oficial No. 1145/2011 de un documento expedido en inglés y francés. Traducción realizada por **Jeannette Insignares Melo**, traductora e intérprete oficial juramentada de francés-español-francés e inglés-español-inglés según Resoluciones 5451 de 1982 y 133 de 1992 del Ministerio de Justicia Colombia. Bogotá, D.C., noviembre 22 de 2011.


Jeannette Insignares Melo
Traductora e intérprete oficial
Resolución 5451 del 5/11/1982

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
22 NOV 24 11:35
JEFES DE LA ADMINISTRACIÓN
BOGOTÁ D.C.

107
Jeannette Insignares Melo

SANOFI-AVENTIS

Sociedad Anónima de capital de 2.621.995.570 €
Sede social: 174 avenue de France – 75013 PARÍS
395 030 844 R.C.S. PARÍS

ASAMBLEA GENERAL MIXTA

DEL 6 DE MAYO DE 2011

EXTRACTO DEL ACTA

.....
Resoluciones que provienen de la competencia de la asamblea general extraordinaria
.....

RESOLUCIÓN VEINTISÉIS

Cambio de denominación social y modificación correlativa de los estatutos

La asamblea general, estatuyendo en las condiciones de quórum y de mayoría requeridas para las asambleas extraordinarias, con conocimiento del informe del consejo administrativo, decide modificar la denominación social de la Sociedad en Sanofi a partir de ese día y modificar en consecuencia el artículo 2 de los estatutos como sigue:

“Artículo 2 – Denominación

La sociedad tiene por denominación social: Sanofi”

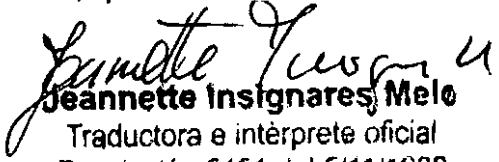
Esta resolución es adoptada:

970.406.003 votos en pro
1.407.729 votos en contra o abstención

RESOLUCIÓN VENTISIETE:

Poderes para las formalidades

La asamblea general, estatuyendo en las condiciones de quórum y de mayoría requeridas para las asambleas extraordinarias, confiere todos los poderes al portador de un original, de una copia o extracto del acta de sus deliberaciones, para efectuar todas las


Jeannette Insignares Melo
Traductora e intérprete oficial
Resolución 5451 del 5/11/1982

presentaciones (incluidas cualquier presentación ante el secretario competente) y formalidades requeridas por la ley.

Esta resolución es adoptada:

970.704.471 votos en pro
1.109.261 votos en contra o abstención

.....
(Firma ilegible)

M. Felitti

Sello del Notario Antoine BAILLY
Autenticación de este documento conforme al original que le fue presentado
(Firma ilegible)

APOSTILLA

(Convention de la Haye, du 5 octobre 1961)

1. **República Francesa**
Este acto público
2. fue firmado por: **Notario BAILLY**
3. Quien actúa en su capacidad de: **Notario**
4. Lleva el Sello de: **Su Notaría**

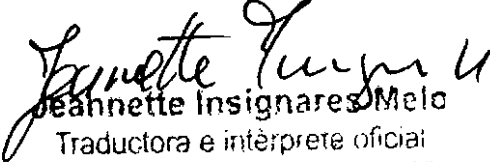
CERTIFICADO

5. En: **París**
6. El: **11 de octubre de 2011**
7. Por: **Procurador General del Tribunal de Apelación de París**
8. No: **67 338**
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: **(Firma ilegible)**
Jean Martin
Abogado General

(Sello del Tribunal de Apelación de París)

"La Apostilla confirma solamente la autenticidad de la firma, del sello o de la estampilla sobre el documento. Esta no significa que el contenido del documento sea correcto o que la República francesa apruebe su contenido".

Traducción oficial No. 1146/2011 de un documento expedido en francés. Traducción realizada por **Jeannette Insignares Melo**, traductora e intérprete oficial juramentada de francés-español-francés según Resolución 5451 de 1982 del Ministerio de Justicia Colombia. Bogotá, D.C., noviembre 22 de 2011.


Jeannette Insignares Melo
Traductora e intérprete oficial
Resolución 5451 del 5/11/1982

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
6 janvier 2011 (06.01.2011)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/001052 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07D 273/08 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/395 (2006.01)

(74) Mandataire : SENNINGER, Thierry; c/o sanofi-aventis, Département Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2010/050986

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :
20 mai 2010 (20.05.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0903170 29 juin 2009 (29.06.2009) FR
0905651 25 novembre 2009 (25.11.2009) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
SANOFI-AVENTIS [FR/FR]; 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
BOUCHARD, Hervé [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis, Département Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR). BRUN, Marie-Priscille [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis, Département Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR). COMMERÇON, Alain [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis, Département Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR). ZHANG, Jidong [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis, Département Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

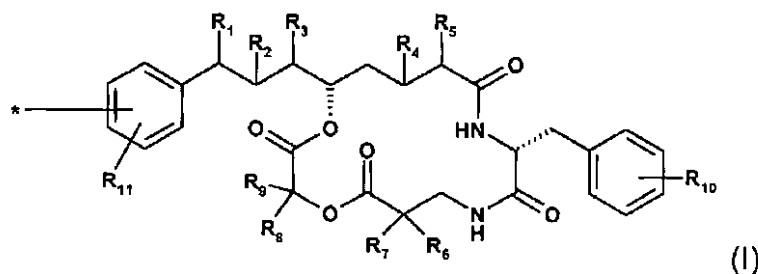
Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : NOVEL CONJUGATES, PREPARATION THEREOF, AND THERAPEUTIC USE THEREOF

(54) Titre : NOUVEAUX CONJUGUES, LEUR PREPARATION ET LEUR APPLICATION EN THERAPEUTIQUE



(57) Abstract : The invention relates to a targeting agent, to which at least one cryptophycin is attached, of the formula (I), where: R₁ is a halogen atom and R₂ is an OH group, an acyl group derived from an amino acid AA or a (C₁-C₄)alkanoyloxy group; or else R₁ and R₂ together form an epoxy unit; AA denotes a natural or artificial amino acid; R₃ is a (C₁-C₆)alkyl group; R₄ and R₅ are both H or together form a CH=CH double bond between C13 and C14; R₆ and R₇ are, independently from one another, H or a (C₁-C₆)alkyl group; R₈ and R₉ are, independently from one another, H or a (C₁-C₆)alkyl group; R₁₀ is at least one substituent of the phenyl core selected from among: H, an OH group, (C₁-C₄)alkoxy, a halogen atom or a NH₂, NH(C₁-C₆)alkyl, or N(C₁-C₆)alkyl group; R₁₁ is at least one substituent of the phenyl core selected from among H or a (C₁-C₄)alkyl group; the targeting agent and the cryptophycin derivative being covalently bonded, the bond being located at the ortho (o), meta (m), or para (p) position of the phenyl core containing the CR₁ unit.

(57) Abrégé : L'invention est relative à un agent de

[Suite sur la page suivante]

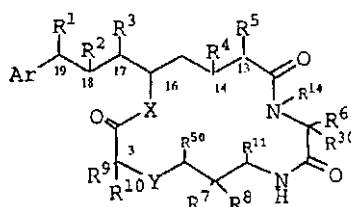
ciblage auquel est attaché au moins un dérivé de cryptophycine de formule (I) : dans laquelle : R₁ représente un atome d'halogène et R₂ représente un groupe -OH, un groupe acyle dérivé d'un acide aminé AA ou un groupe (C₁-C₄)alcanoyloxy; ou bien R₁ et R₂ forment ensemble un motif époxyde; AA désigne un acide aminé naturel ou non-naturel; R₃ représente un groupe (C₁-C₆)alkyle; R₄ et R₅ représentent tous deux H ou forment ensemble une double liaison CH=CH entre C13 et C14; R₆ et R₇ représentent indépendamment l'un de l'autre H ou un groupe (C₁-C₆)alkyle; R₈ et R₉ représentent indépendamment l'un de l'autre H ou un groupe (C₁-C₆)alkyle; R₁₀ représente au moins un substituant du noyau phényle choisi parmi : H, un groupe OH, (C₁-C₄)alcoxy, un atome d'halogène ou bien un groupe -NH₂, -NH(C₁-C₆)alkyle ou -N(C₁-C₆)alkyle; R₁₁ représente au moins un substituant du noyau phényle choisi parmi H ou un groupe (C₁-C₄)alkyle; l'agent de ciblage et le dérivé de cryptophycine étant attachés de façon covalente, l'attachement se situant en position ortho (o), meta (m) ou para (p) du noyau phényle porteur du motif CR₁.

NUEVOS CONJUGADOS, SU PREPARACIÓN Y SU APLICACIÓN TERAPÉUTICA

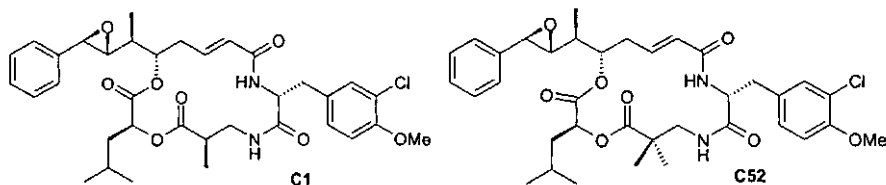
La presente invención se refiere a conjugados de criptoficinas, a las composiciones que los contienen y a su aplicación terapéutica, especialmente como anticancerosos. La invención se refiere también al procedimiento de preparación de estos compuestos así como a los propios derivados de criptoficinas.

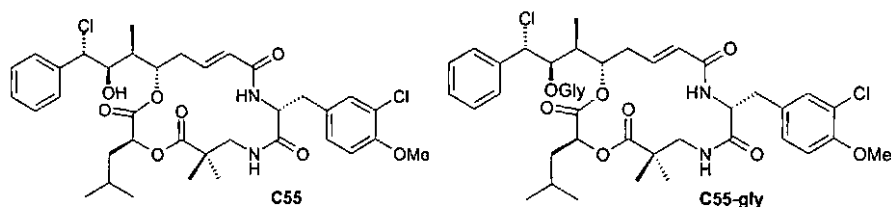
[Área técnica]

Las criptoficinas son metabolitos secundarios que pertenecen a la clase de los macrociclos depsipeptídicos producidos por las cianobacterias del género *Nostoc*. Su nombre se refiere al hecho de que son altamente citotóxicas para las levaduras del género *criptococcus*. El primer representante de esta clase de moléculas, la criptoficina-1 (**C-1**), ha sido aislado en 1990 de la cianobacteria *Nostoc sp* (ATCC 53789) (véase Eißler S., et al., *Synthesis* **2006**, 22, 3747-3789). La estructura, la fórmula general así como la numeración de los átomos de carbono de estos compuestos, tal como la descrita en el documento **WO 98/08505**, se indican a continuación:



Las criptoficinas **C-1** y **C-52**, que se caracterizan por una función epóxido representada más adelante, tienen propiedades anticancerosas. Se han realizado ensayos clínicos de fase II en el cáncer de pulmón con **C-52** (LY 355073): véase Edelman M.J., et al., *Lung Cancer* **2003**, 39, 197-199; Sessa C., et al., *Eur. J. Cancer* **2002**, 38, 2388-96. La criptoficina **C-55**, profármaco de la **C-52**, se caracteriza en relación a ésta por una función clorhidrina en lugar de la función epóxido (Bionpally R.R., et al., *Cancer Chemother Pharmacol* **2003**, 52, 25-33). La **C-55** ha resultado muy activa pero no es estable en solución. Derivados de tipo glicinato de clorhidrina tal como el compuesto **C-55 Gly** han sido igualmente descritos para ganar en estabilidad (Liang J., et al., *Investigational New Drugs* **2005**, 23, 213-224).





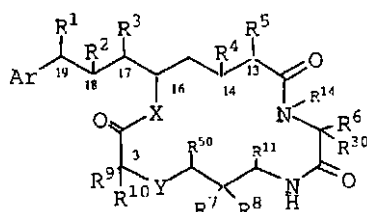
[Problema técnico]

La química de los conjugados es conocida desde hace muchos años y ha sido aplicada a varias familias de citotóxicos como por ejemplo los maitansinoides (WO 04103272), los taxanos (WO 06061258), las tomamicinas (WO 09016516), las leptomicinas (WO 07144709), el CC-1065 y sus análogos (WO 2007102069); véase también a propósito de los conjugados, Monneret C., et al., *Bulletin du Cancer*. 2000, 87(11), 829-38; Ricart A.D., et al., *Nature Clinical Practice Oncology* 2007, 4, 245-255. Sin embargo, no se ha aplicado a los derivados de criptoficina conjugados con anticuerpos o con otros agentes de selección de dianas celulares.

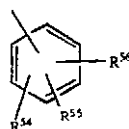
El problema técnico que pretende resolver la presente invención es proponer nuevos conjugados a base de derivados de criptoficina, así como de nuevos derivados de criptoficina aptos para ser conjugados.

[Técnica anterior]

Los documentos EP 0830136 y WO 98/08505 describen derivados de criptoficinas pero no describen conjugados de criptoficinas. El documento WO 98/08505 describe derivados de criptoficinas de la fórmula (A):



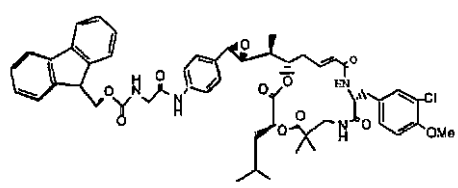
(A) en la que Ar puede representar un grupo Ar'



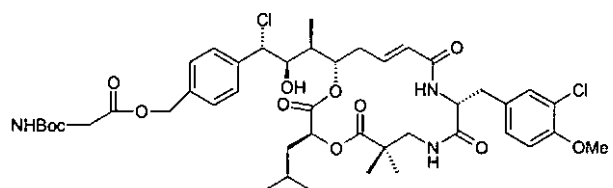
de fórmula: en la que R_{54} representa H, un grupo alquilo (C_1-C_6), alquilo (C_1-C_6) ($R_{57}, R_{57}', R_{57}''$), arilo, fenilo, heterocicloalquilo, un átomo de halógeno, $COOR_{57}$, PO_3H , SO_3H , SO_2R_{58} , $NR_{59}R_{60}$, $NHOR_{61}$, $NHOR_{61}'$, CN, NO_2 , OR_{62} , CH_2OR_{62}' , $CH_2NR_{96}R_{96}'$,

alquilo (C_1-C_6) OR_{100} , SR_{63} ; R_{55} et R_{56} representan H, un grupo alquilo (C_1-C_6), $C(R_{57}, R_{57}', R_{57}'')$, arilo, fenilo, heterocicloalquilo, un átomo de halógeno, $COOR_{57}$, PO_3H , SO_3H , SO_2R_{58} , $NR_{59}R_{60}$, $NHOR_{61}$, $NHCHR_{61}'$, CN, NO_2 , OR_{62} , CH_2OR_{62}' , CH_2OCOR_{95} , $CH_2NR_{96}R_{96}'$, alquilo (C_1-C_6) OR_{100} , alquilo (C_1-C_6) $NR_{59}R_{60}$. El documento WO 98/08505 describe especialmente

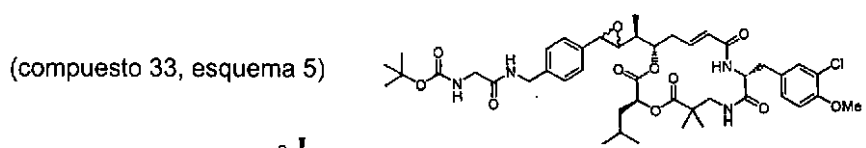
los siguientes compuestos:



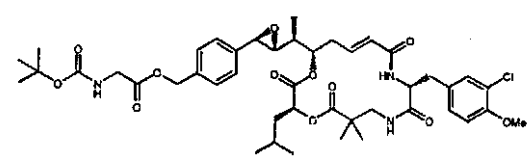
(ej. 34)



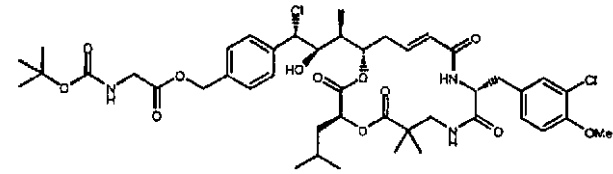
(compuesto 24, esquema 4)



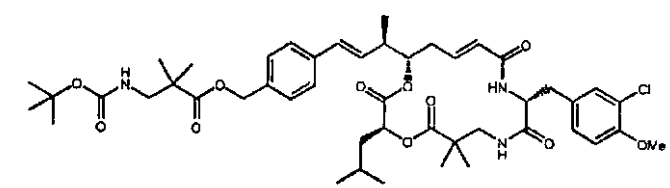
(compuesto 33, esquema 5)



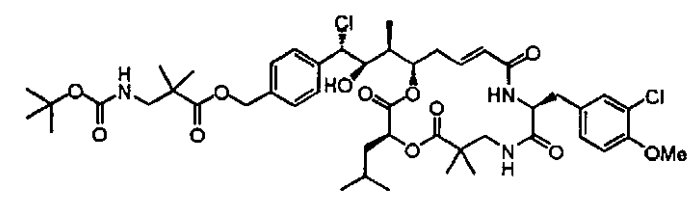
(ej. 42)



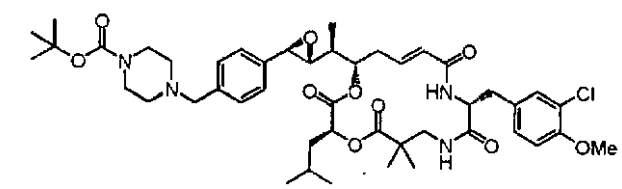
(ej. 43)



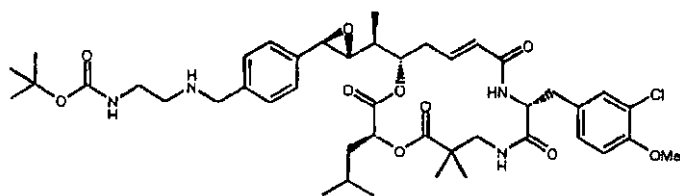
(ej. 47)



(ej. 48)



(ej. 74)



(ej. 77)

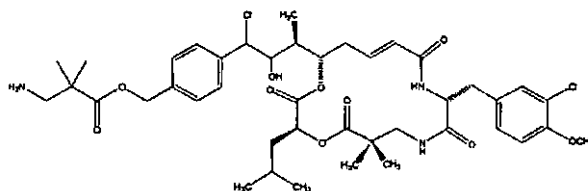
que se caracterizan por el grupo terminal -NHC(=O)Ot-Bu . El documento **WO 98/08505** no precisa que estos compuestos sean aptos o destinados a ser conjugados.

- 5 El documento **US 2007/0213511** describe inmunoconjugados de caliqueamicina. Entre estos, se menciona el **MYLOTARG®** (o CMA-676) que es un inmunoconjugado de caliqueamicina utilizado en el tratamiento de la AML (anti-CD33-caliqueamicina). Véase también a propósito de los conjugados: el documento **WO 2006/042240**.
- 10 Al-awar R.S., et al., *J. Med. Chem.* **2003**, 46(14), 2985-3007 y Al-awar R.S., et al., *Mol. Cancer Ther.* **2004**, 3(9), 1061-1067 describen derivados de criptoficina, así como sus evaluaciones *in vivo*.

- El documento **WO 08010101** describe un anticuerpo monoclonal anti-EphA2 así como los conjugados correspondientes que comprenden una o varias moléculas de un compuesto citotóxico unidas al anticuerpo monoclonal. El documento **WO 08047242** describe un anticuerpo monoclonal anti-CD38 así como los conjugados correspondientes que comprenden una o varias moléculas de un compuesto citotóxico unidas al anticuerpo monoclonal. El compuesto citotóxico se puede elegir entre los maitansinoides, los taxanos, las tomamicinas, las leptomicinas, el
- 15
- 20 **CC-1065** y sus análogos.

- El documento **WO 2009/126934** describe los anticuerpos anti-CD70 y sus conjugados con compuestos citotóxicos; entre los citotóxicos se cita la criptoficina. El documento **WO 2009/134976** describe los conjugados con una tasa de sustitución optimizada para administrar la cantidad necesaria de citotóxico en la célula; entre los citotóxicos se cita la criptoficina.
- 25

El documento **WO 2005/116255** describe los conjugados de aptámeros y de un citotóxico que puede ser una criptoficina (véase [0037] y la Tabla 2), pudiendo comprender el conector una cadena de PEG ([0038]). Más particularmente, se describe la criptoficina Cryp-NH₂:



30

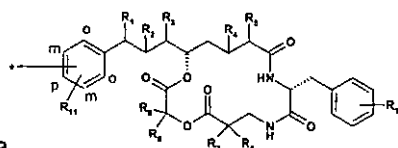
así como sus conjugados de aptámeros con los siguientes conectores: NHS-PEG-eritritol, pNP-

hidrógeno de un alcano. El grupo alquilo puede ser lineal o ramificado. A título de ejemplos, se pueden citar los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *iso*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, 2,2-dimetilpropilo, hexilo;

- 5 • grupo cicloalquilo: un grupo alquilo cíclico que comprende entre 3 y 8 átomos de carbono implicados en la estructura cíclica. A título de ejemplos, se pueden citar los grupos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo;
- 10 • grupo heterocicloalquilo: un grupo cicloalquilo que comprende al menos un heteroátomo (O, S, N) implicado en el ciclo y unido a los átomos de carbono que forman el ciclo;
- grupo alcoxi: un grupo -O-alquilo, en el que el grupo alquilo es tal como se ha definido anteriormente;
- 15 • grupo alcanoiloxi: un grupo -O-CO-alquilo, en el que el grupo alquilo es tal como se ha definido anteriormente;
- grupo alquileno: un grupo divalente saturado de fórmula bruta $-C_nH_{2n}-$, obtenido quitando dos átomos de hidrógeno de un alcano. A título de ejemplos, se pueden citar los grupos metileno ($-CH_2-$), etileno ($-CH_2CH_2-$), propileno ($-CH_2CH_2CH_2-$), butileno ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$), hexileno ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$) o los grupos ramificados siguientes
- 20 • con preferencia, el grupo alquileno es de fórmula $-(CH_2)_n-$, representando n un número entero;
- en los intervalos de valores, están incluidos los límites (por ejemplo, un intervalo del tipo «siendo n de 1 a 6» o bien «comprendido entre 1 y 6» incluye los límites 1 y 6).

Abreviaturas utilizadas:

- AcOEt: acetato de etilo; ALK: grupo alquileno(C_1-C_{12}), más particularmente alquileno(C_1-C_6), más particularmente de la forma $-(CH_2)_n-$ siendo n un número entero de 1 a 12, con preferencia de 1 a 6; aq.: acuoso; CCF: cromatografía en capa fina (TLC en inglés); CMS: cloruro de

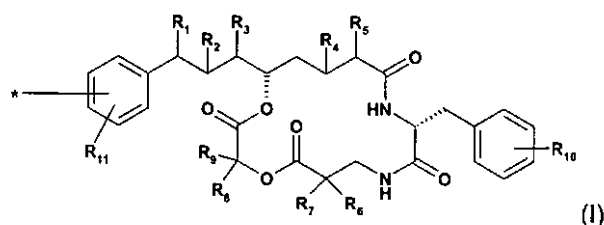


- metanosulfonilo;cripto indica el motivo de la fórmula ,cripto indica especialmente uno de los derivados de criptoficina D₁-D₈ descritos más adelante o un derivado de criptoficina de un ejemplo; Rf: factor de retención; DAR: tasa de sustitución (relación fármaco-anticuerpo); DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno; DCC: N,N'-diciclohexilcarbodiimida; DCM: diclorometano; DEAD: dietilazodicarboxilato; DIC: N,N'-diisopropilcarbodiimida; DIPEA: N,N-diisopropiletilamina; DMA: dimetilacetamida; DMAP: 4-dimetilaminopiridina; DME: dimetoxietano; DMF: dimetilformamida; DMSO: dimetilsulfóxido; EEDQ: 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina; EDCI: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida; EDTA: ácido etilen-diamino-tetraacético; eq.: equivalente; Fmoc: fluorenilmetoxycarbonilo; HOBt: 1-hidroxibenzotriazol; HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-

piperazinetanosulfónico; mCPBA: ácido *m*-cloroperbenzoico; NHS: N-hidroxisuccinimida; NMP: N-metilpirrolidinona; PA: presión atmosférica; PABAC: « carbonato de alcohol *para*-aminobencílico »; PR: presión reducida; SEC: cromatografía de exclusión estérica; SPE: extracción sobre fase sólida; TA: temperatura ambiente; TBDMS: *terc*-butildimetilsililo; TCEP: 5 hidrocloreuro de tris-(2-carboxietil)-fosfina; TEA: trietilamina; TFA: ácido trifluoroacético; TIPS: triisopropilsililo; THF: tetrahidrofurano; t_R : tiempo de retención.

[Descripción detallada de la invención]

La invención se refiere a un agente de selección de la diana, con el que está unido al menos un derivado de criptoficina de la fórmula (I):

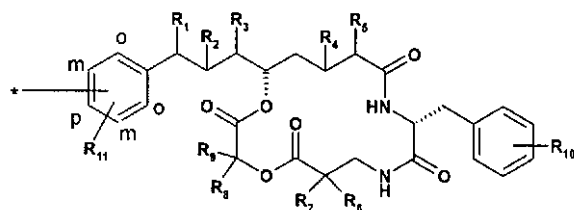


en la que:

- R_1 representa un átomo de halógeno y R_2 representa un grupo -OH, un grupo acilo derivado de un aminoácido AA o un grupo alcaniloilo(C₁-C₄);
- o bien R_1 y R_2 forman conjuntamente un motivo epóxido;
- AA indica un aminoácido natural o no natural;
- R_3 representa un grupo alquilo(C₁-C₆);
- R_4 y R_5 representan los dos H o forman conjuntamente un doble enlace CH=CH entre C13 y C14;
- R_6 y R_7 representan independientemente uno de otro H o un grupo alquilo(C₁-C₆);
- R_8 y R_9 representan independientemente uno de otro H o un grupo alquilo(C₁-C₆);
- R_{10} representa al menos un sustituyente del núcleo fenilo elegido entre: H, un grupo -OH, alcoxi(C₁-C₄), un átomo de halógeno o bien un grupo -NH₂, -NHalquilo(C₁-C₆) o -N(alquilo(C₁-C₆))₂;
- R_{11} representa al menos un sustituyente del núcleo fenilo elegido entre H o un grupo alquilo(C₁-C₄);

estando unidos el agente de selección de la diana y el derivado de criptoficina de forma covalente, situándose la unión en posición orto (o), meta (m) o para (p) del núcleo fenilo portador del motivo CR₁.

posiciones orto (o), meta (m) o para (p):



- R₁** representa un átomo de halógeno, más particularmente Cl. **R₃** representa un grupo alquilo(C₁-C₆), más particularmente Me. **R₆** y **R₇** representan independientemente uno de otro H o un grupo alquilo(C₁-C₆); más particularmente representan independientemente uno de otro H o un grupo Me. **R₈** et **R₉** representan independientemente uno de otro H o un grupo alquilo(C₁-C₆); más particularmente **R₈** representa H y **R₉** representa isobutilo.
- R₁₀** representa al menos un sustituyente del núcleo fenilo elegido entre H, un grupo OH, alcoxi(C₁-C₄), un átomo de halógeno. Se puede tratar también de un grupo -NH₂, -NHalquilo(C₁-C₆) o -N(alquilo(C₁-C₆))₂ tal como por ejemplo -NH₂ o -NMe₂, con preferencia en la posición 3 o 4 sobre el núcleo fenilo. Más particularmente, el núcleo fenilo comprende dos sustituyentes en la posición 3 y 4 sobre el núcleo fenilo. Con preferencia, se trata de 3-Cl y 4-metoxi. **R₁₁** representa al menos un sustituyente del núcleo fenilo elegido entre H o un grupo alquilo(C₁-C₄); más particularmente H.

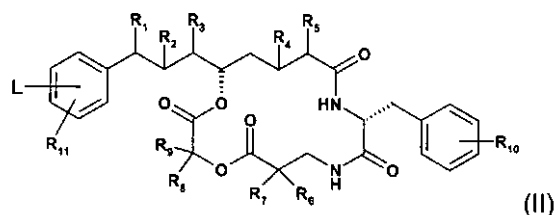
Más particularmente, se podrá elegir uno de los sustituyentes **R₁** a **R₁₁** entre los descritos en los ejemplos. Cada sustituyente **R₁** a **R₁₁** podrá adoptar también una de las configuraciones espaciales (por ejemplo, R o S o bien Z o E) tal como se describe en los ejemplos.

AA representa un aminoácido natural o no natural. Se puede tratar de un aminoácido α , β o γ . Se pueden citar especialmente los aminoácidos siguientes: alanina (Ala), β -alanina, ácido 2-amino-2-ciclohexilacético, ácido 2-amino-2-fenilacético, arginina (Arg), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), triptófano (Trp), tirosina (Tyr), valina (Val), ácido γ -aminobutírico, ácido α,α -dimetil- γ -aminobutírico, ácido β,β -dimetil γ -aminobutírico, ornitina (Orn), citrulina (Cit) así como las formas protegidas de dichos aminoácidos (por ejemplo, por acetilo, formilo, tosilo, nitro). Con preferencia, se trata de un aminoácido natural. Más particularmente, se trata de la glicina.

R₁ y **R₂** pueden formar también conjuntamente un motivo epóxido.

La unión entre el derivado de criptoficina y el agente de selección de la diana se realiza por intermedio de un conector **L** situado en posición orto (o), meta (m) o para (p) del núcleo fenilo

portador del motivo CR₁; así, el derivado de criptoficina apto para la conjugación tiene la fórmula (II):

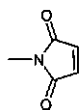


La unión al nivel del agente de selección de la diana se sitúa en el otro extremo del conector L al nivel de un grupo reactivo presente sobre el agente de selección de la diana. Así, L comprende al menos un grupo químico reactivo (GCR1) frente a un grupo químico reactivo (GCR2) presente sobre el agente de selección de la diana. La reacción entre GCR1 y GCR2 asegura la unión del compuesto de la fórmula (II) sobre el agente de selección de la diana mediante la formación de un enlace covalente. Así, el derivado de criptoficina de la fórmula (II) es apto para ser conjugado con un agente de selección de la diana.

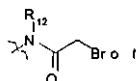
Los derivados de criptoficina de la presente invención, incluyendo los de los ejemplos, pueden existir en estado de bases o de sales de adición a ácidos, especialmente a los ácidos farmacéuticamente aceptables.

Como ejemplos de GCR1, se pueden citar:

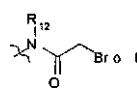
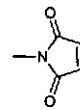
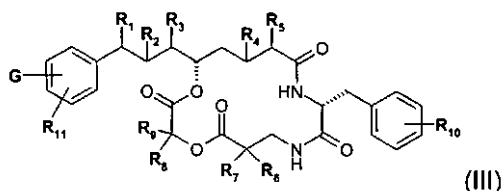
- (i) el grupo reactivo $-SZ_a$ para el cual Z_a representa H o el grupo $-SR_a$, con R_a representando un grupo alquilo(C₁-C₆), cicloalquilo(C₃-C₇), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo(C₃-C₇);
- (ii) el grupo reactivo $-C(=O)-Z_bR_b$ para el cual Z_b representa un enlace simple, $-O-$ o $-NH-$, más particularmente $-O-$, con R_b representando H o un grupo alquilo(C₁-C₆), cicloalquilo(C₃-C₇), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo(C₃-C₇);
- (iii) uno de los grupos reactivos siguientes: $-Cl$, $-N_3$, $-OH$, $-NH_2$, el grupo reactivo maleimido



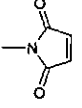
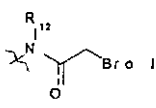
o haloacetamido



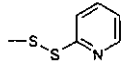
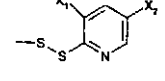
con R_{12} representando H o un grupo alquilo(C₁-C₆), más particularmente Me en el caso de los compuestos de la fórmula (III):

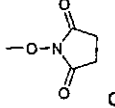
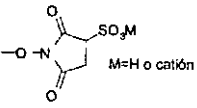
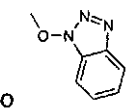
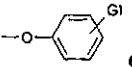


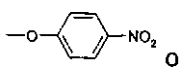
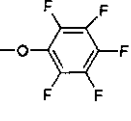
que comprende el grupo $G = -(CH_2)_nY$ con $Y = -Cl$, $-N_3$, $-OH$, $-NH_2$, con R_{12} representando H o un grupo alquilo(C₁-C₆), más particularmente Me;

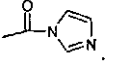
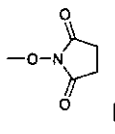
(iv) el grupo reactivo maleimido  o haloacetamido  con R_{12} representando H o un grupo alquilo (C_1-C_6), más particularmente Me.

Más particularmente, $-SZ_a$ puede representar $-SH$ o $-SSalquilo(C_1-C_6)$, especialmente $-SSMe$, o

5 $-SS-heteroarilo$, especialmente  o  (siendo definidos X_1 y X_2 más adelante). Más particularmente, $-Z_bR_b$ puede representar $-OH$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH=CH_2$,

 o  o  o el grupo  en el que Gl representa al menos un grupo electroinductivo tal como $-NO_2$ o $-Hal$, especialmente $-F$. Se puede tratar por

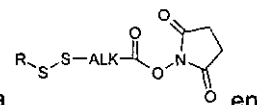
ejemplo de los grupos siguientes:  o  . Otro tipo de grupo $-C(=O)Z_bR_b$

10 es el siguiente:  . Los grupos reactivos $-SH$ y  presentan una buena reactividad. Más particularmente, GCR1 podrá ser elegido entre uno de los descritos en los ejemplos.

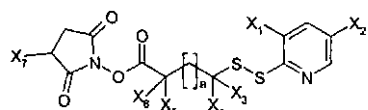
A título de ejemplo de GCR2, se pueden citar los grupos ϵ -amino de las lisinas portados por las cadenas laterales de los residuos de lisina que están presentes en la superficie de un anticuerpo, 15 los grupos sacáridos de la región bisagra o los tioles de las cisteínas por reducción de los enlaces disulfuros intra-cadenas (Gamett M.C., et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 53, 171-216). Más recientemente se han considerado otros métodos como la introducción de cisteínas por mutación (Junutula J.R., et al., *Nature Biotechnology* **2008**, 26, 925-932; **WO 09026274**) o la introducción de aminoácidos no naturales que permitan otro tipo de reacciones 20 químicas (de Graaf A.J., et al., *Bioconjugate Chem.* **2009**, Publication Date (Web): February 3, 2009 (Review); DOI: 10.1021/bc800294a; **WO 2006/069246** y según Chin J.W., et al., *JACS* **2002**, 124, 9026-9027 (tecnología ReCode®)). Estos modos de unión utilizados con los anticuerpos son aplicables al conjunto de los agentes de selección de la diana conocidos, en función de su estructura.

25 Es igualmente posible modificar químicamente el agente de selección de la diana para introducir nuevos grupos químicos reactivos GCR2. Así, es bien conocido por los expertos en la técnica cómo modificar un anticuerpo con ayuda de un agente de modificación (véase especialmente el documento **WO 2005/077090** página 14). La modificación permite mejorar la reacción de 30 conjugación y utilizar una mayor variedad de grupos GCR1.

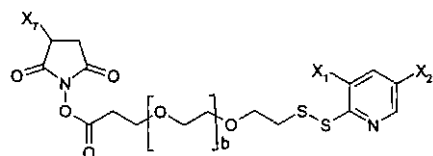
Agentes de modificación que permiten introducir grupos disulfuros



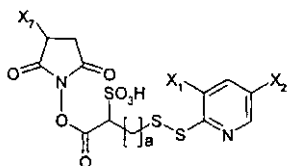
El agente de modificación puede ser un éster activado de NHS de fórmula la que R representa un grupo alquilo(C₁-C₆), arilo, heteroarilo, cicloalquilo(C₃-C₇), heterocicloalquilo(C₃-C₇) y ALK representa un grupo alquilen(C₁-C₆); por ejemplo, se puede utilizar el piridilditiopropionato de N-succinimidilo (SPDP) o el piridilditiobutirato de N-succinimidilo (SPDB o éster N-hidroxi-succinimidilo del ácido 4-(2-piridilditio)butanoico) de forma que se introduzcan los grupos reactivos GCR2 de ditiopiridilo (véase Bourdon M.A., et al., *Biochem. J.* **1978**, 173, 723-737; **US 5208020**) los cuales pueden reaccionar a continuación con un grupo químico reactivo GCR1 de tipo -SH presente sobre el conector del derivado de criptoficina con el fin de formar un nuevo enlace -S-S- (véase el ej. 9 para un conjugado que presenta un enlace disulfuro). El grupo N-hidroxisuccinimida reacciona preferiblemente con los grupos amino presentes sobre el anticuerpo de manera que se forman enlaces amidas. Otro ejemplo de agente de modificación está descrito en el documento **WO 2004/016801**, de fórmula



o un análogo pegilado de fórmula



está descrito en el documento **WO 2009/134976** o un



análogo sulfónico de fórmula

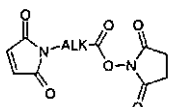
está descrito en el documento **WO**

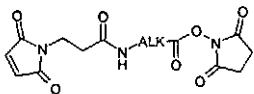
2009/134977 en los cuales:

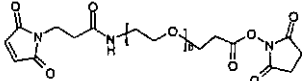
- X₃, X₄, X₅, X₆ representan H o un grupo alquilo(C₁-C₆),
- X₁ y X₂ representan -H, -CONX₈X₉, -NO₂, representando X₈ y X₉, H o un grupo alquilo(C₁-C₆),
- X₇ representa -SO₃⁻M⁺ o H o bien un grupo de amonio cuaternario
- a indica un número entero que va de 0 a 4 y b indica un número entero que va de 0 a 2000, con preferencia entre 1 y 200; a y b pueden tomar todos los valores entre 0 y 4 o entre 0 y 2000 respectivamente.

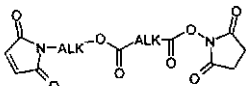
Agentes de modificación que permiten introducir grupos maleimido

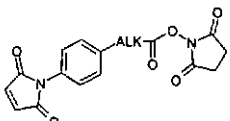
Otro ejemplo de agente de modificación es el succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), un compuesto similar descrito en el documento **EP 0306943** o un sulfo-SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo). Se pueden citar

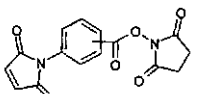
como otros ejemplos:  como el 3-maleimido-propionato de N-succinimidilo;

 como el 6-(3-maleimidopropionamido)hexanoato de N-succinimidilo;

 siendo b un número entero comprendido entre 0 y 2000, con preferencia entre 1 y 200 (b puede tomar todos los valores entre 0 y 2000), como el 3-(2-{2-[3-maleimido-propionilamino]-etoxy}-etoxy)-propanoato de N-succinimidilo o SM(PEG)₂;

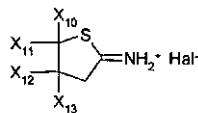
 como el succinato de maleimidoetilo y de N-succinimidilo;

 como el 4-(4-maleimidofenil)butanoato de N-succinimidilo o

 como el 3-maleimido-benzoato de N-succinimidilo.

10 Agentes de modificación que permiten introducir grupos tioles

Otro ejemplo de agente de modificación descrito en el documento **WO 90/06774** es de fórmula



en la que:

- Hal representa un átomo de halógeno;
- X₁₀ representa un átomo de halógeno o el grupo COOX₁₄, nitro, alquilo(C₁-C₈) no sustituido o halogenado, alcoxi(C₁-C₈) no sustituido o halogenado, alqueno(C₂-C₈) no sustituido o halogenado, alquino(C₂-C₈) no sustituido o halogenado, cicloalquilo(C₃-C₈) no sustituido, arilo no sustituido o sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados entre amino, átomo de halógeno, grupo alquilo(C₁-C₈) no sustituido o halogenado, alcoxi(C₁-C₈) no sustituido o halogenado;
- cada uno de los X₁₁, X₁₂, X₁₃ representa independientemente un átomo de hidrógeno o bien puede representar X₃;
- o X₁₀ y X₁₁ forman conjuntamente un ciclo alquileo(C₂-C₅), no sustituido o sustituido con uno a cinco grupos alquilo(C₁-C₄);
- o X₁₀ o X₁₁ forman conjuntamente con X₁₂ un ciclo alquileo(C₁-C₅), no sustituido o sustituido con uno a cinco grupos alquilo(C₁-C₄)
- y X₁₄ es -H o un grupo alquilo(C₁-C₈).

Con preferencia, Hal representa un átomo de cloro o de bromo. En la tabla que sigue se encontrarán posibilidades para X₁₀-X₁₃:

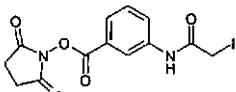
X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	Hal
Me	H	H	H	Cl
Ph	H	H	H	Cl
t-Bu	H	H	H	Cl
Me	Me	H	H	Cl
(-CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₂ -)		H	H	Cl
H	(-CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₂ -)		H	Cl
Et	H	H	H	Br
Et	Me	H	H	Cl
-CH-CH ₂ -CH	H	H	H	Cl
Me	H	Me	H	Cl
H	H	Me	Me	Cl
Ph	Me	H	H	Cl
4-ClPh	H	H	H	Cl
3-furanilo	H	H	H	Cl
i-Pr	H	H	H	Cl
Me	Me	Me	Me	Cl
C ₆ H ₁₁	H	H	H	Cl
CH ₂ Br	H	H	H	Cl
CF ₃	H	H	H	Cl
CH=CH ₂	H	H	H	Cl
2-NH ₂ Ph	H	H	H	Cl

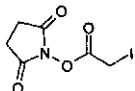


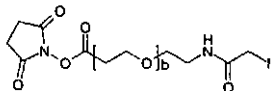
Un ejemplo de iminotiolano preferido es el siguiente:

5 Agentes de modificación que permiten introducir grupos haloacetamido

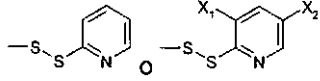
Otro ejemplo de agente de modificación es el succinimidil-4-(N-yodoacetil)-aminobenzoato

(SIAB)  , o compuestos similares entre los cuales están el succinimidil-N-

yodoacetato (SIA)  , el succinimidil-N-bromoacetato (SBA), o el succinimidil-3-(N-bromoacetamido)propionato (SBAP) o un compuesto pegilado similar descrito en el documento

10 **WO 2009/134976**  , siendo b tal como se ha descrito precedentemente. Las figuras 1 y 2 ilustran la modificación de un grupo amino de un agente de selección de la diana por el SPDP o bien por el iminotiolano preferido anteriormente.

Así, se pueden introducir sobre el agente de selección de la diana grupos GCR2 disulfuros

(-SSR), especialmente de tipo piridil-disulfuros , en el caso en que GCR1 representa -SH. Igualmente, se pueden introducir sobre el agente de selección de la diana grupos GCR2 tiol (-SH), por ejemplo, con un iminotiolano, en el caso en que GCR1 representa disulfuro (es decir GCR1= -SZ_a con Z_a≠H, por ejemplo Z_a= -S-). En los dos casos, el enlace covalente que se forma por reacción entre GCR1 y GCR2 es un enlace disulfuro escindible.

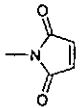
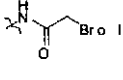
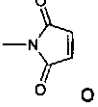
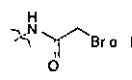
Es igualmente posible, en el caso en que GCR1 representa -SH, introducir en la superficie del agente de selección de la diana grupos GCR2 de tipo maleimido () o haloacetamido (por ejemplo, bromo- o yodoacetamido ). Recíprocamente, se pueden introducir sobre el agente de selección de la diana grupos GCR2 tiol (-SH), por ejemplo, con un iminotiolano, en el caso en que GCR1 representa  o haloacetamido . En este caso, el enlace covalente que se forma por reacción entre GCR1 y GCR2 es un enlace sulfuro no escindible.

Tabla 1: ejemplos de modificaciones del agente de selección de la diana cuando GCR1=-SZ_g

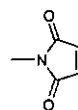
agente de modificación	GCR2 en la superficie del agente de selección de la diana	ejemplo después de reacción sobre un grupo amino, especialmente lisina, de un anticuerpo calificado MAb	conjugado
SPDP= 			
SPDB= 			
SMCC= 			
sulfo-SMCC= 			

g: número de funciones GCR2 sobre un agente de selección de la diana modificado; d: número de derivados de criptoficina sobre el agente de selección de la diana MAb
L* = fragmento de un conector L que comprende GCR1=SZa y tal como L= -L*SZ_a

L* = fragmento de un conector L que comprende GCR1--SZa y tal como L = -L*SZ_a.

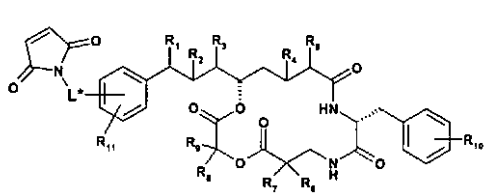
Más particularmente en el caso en que GCR1 sea del tipo (iii) anterior, es posible modificar químicamente el agente de selección de la diana con ayuda de un agente de modificación adecuado o introducir uno de los aminoácidos no naturales a fin de introducir las funciones GCR2 adecuadas. Por ejemplo,

- 5
- con una función $-N_3$: GCR2 puede ser un grupo $-C\equiv CH$;
 - con una función $-OH$ o $-NH_2$: GCR2 puede ser una función ácido carboxílico;
 - con una función $-Cl$: GCR2 puede ser un grupo $-SH$.

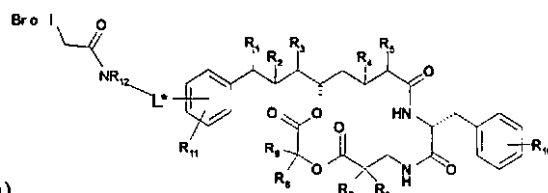


En el caso en que GCR1 representa un grupo reactivo maleimido o haloacetamido

- 10
- con R_{12} representando H o alquilo (C_1-C_6), más particularmente Me, el derivado de criptocina puede ser representado por la fórmula (IIa) o (IIb) que siguen:



(IIa)

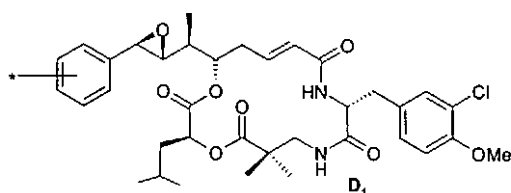
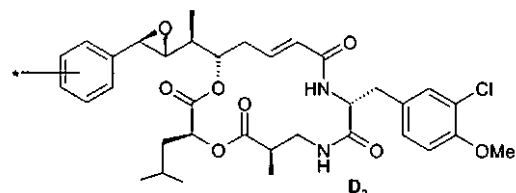
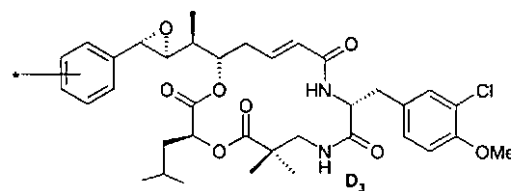
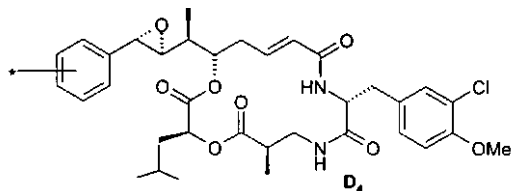
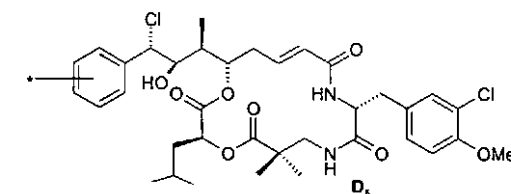
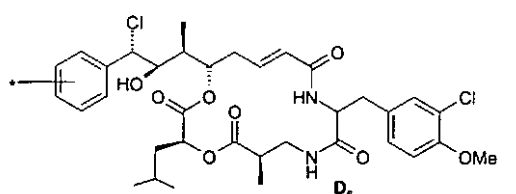


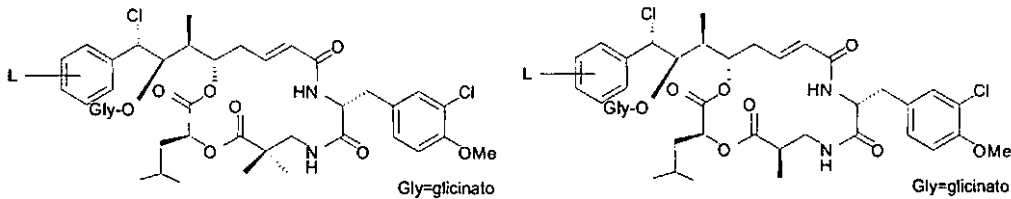
(IIb)

(L^* representa un fragmento de un conector L tal como $L = -L^*$ -maleimido o bien $L = -L^*$ -haloacetamido)

15

El derivado de criptocina podrá ser, en serie C-52 y C-1, uno de los siguientes D_1-D_8 :

 D_1  D_2  D_3  D_4  D_5  D_6



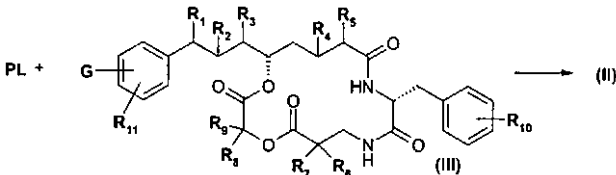
o un motivo equivalente descrito en uno de los ejemplos.

Más particularmente, **L** está en posición para del motivo CR₁.

5

Procedimiento de preparación de los derivados de criptoficina

Los compuestos de la fórmula (II) se preparan según el **Esquema 1** a partir de un derivado de criptoficina de la fórmula (III) y de un precursor del conector (PL):



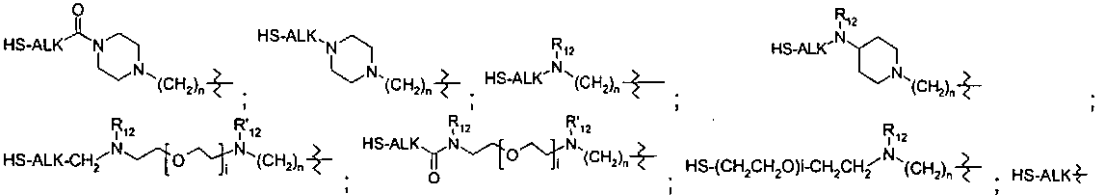
Esquema 1

G representa el grupo -CH=CH₂, -(CH₂)_nY o bien -alquileo(C₁-C₆)-Y siendo n un número entero que va de 1 a 6 y representando Y -OH, -SH, -Cl, -OGP en el que GP indica un grupo saliente tal como por ejemplo el grupo mesilato (OMs) o tosilato, o bien representando Y -N₃, -NH₂, -COOH, -NR₁₂-CH₂-C=CH en el que R₁₂ representa H o un grupo alquilo(C₁-C₆), más particularmente el grupo metilo. El precursor de conector **PL** tiene por función introducir el conector **L** al nivel del derivado de criptoficina después de la reacción entre el grupo **G** y una función química presente sobre **PL**.

10

15

G puede representar también el grupo $\text{HS}-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2)_n-\text{Z}$ (es decir que Y representa el grupo $\text{HS}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Z}$) elegido entre uno de los 9 grupos siguientes (**R**₁₂ y **R'**₁₂ representan H o un grupo alquilo(C₁-C₆)):

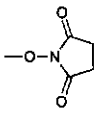


25

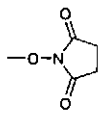
Sobre el **Esquema 1**, varias etapas y/o reacciones pueden ser necesarias para llegar al derivado de criptoficina (II) a partir del derivado de criptoficina (III). Así, por ejemplo, en el caso en que Z_a=H, se prefiere introducir un conector **L** para el que Z_a=-Salquilo(C₁-C₆) utilizando el precursor

de conector correspondiente, reducir después la función disulfuro –SSalquilo(C₁-C₆) a función tiol –SH. Se puede utilizar para esto por ejemplo el TCEP: véase a este propósito Burns J.A., et al., *J. Org. Chem.* **1991**, 56(8), 2648-2650. Esta transformación –SSalquilo(C₁-C₆) → -SH se puede aplicar por ejemplo a los conectores L₁₋₄ y L₂₁₋₂₃ de la **Tabla II**.

5

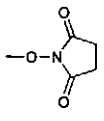


Del mismo modo, en el caso en que Z_bR_b= , se puede introducir un conector L para el que Z_bR_b=O-alilo utilizando el precursor de conector correspondiente, y después desproteger la



función –COOH e introducir . La desprotección se puede realizar por un tratamiento con un catalizador de paladio, por ejemplo Pd(PPh₃)₄ en presencia de una amina « captora », por ejemplo la morfolina; la activación se puede realizar con el carbonato de N-N'-disuccinimidilo en presencia de una base, por ejemplo la DIPEA o con la NHS en presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo el DCC. Esta transformación de un grupo Z_bR_b en otro grupo Z_bR_b

10



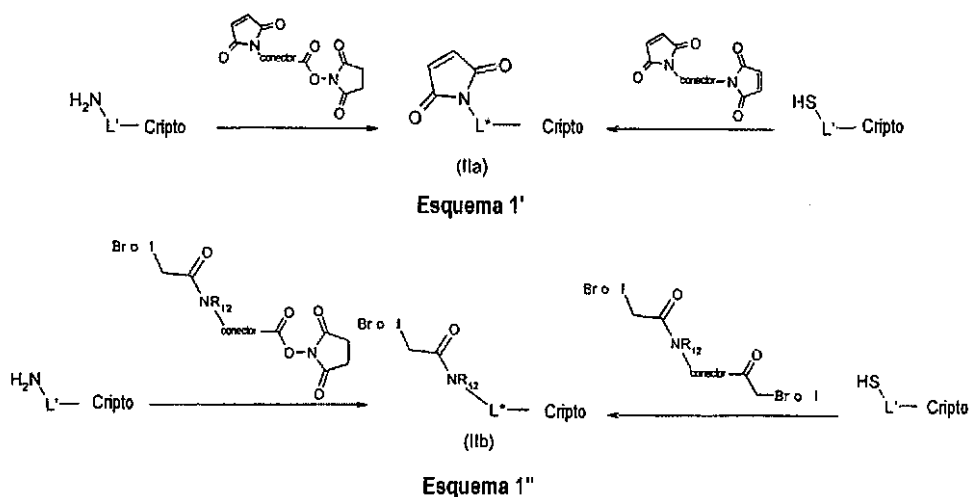
(por ejemplo, -O-alilo →) se puede aplicar para obtener otros grupos Z_bR_b, especialmente los descritos anteriormente.

15

En el caso en que R₁ representa un átomo de halógeno y R₂ un grupo acilo, se prefiere preparar en primer lugar un compuesto de la fórmula (II) para el que R₂ representa un grupo -OH (una vez introducido el conector), e introducir a continuación el grupo acilo con ayuda del compuesto acilante correspondiente.

20

Los **Esquemas 1'** y **1''** ilustran del mismo modo la preparación de un derivado de criptocina que comprende un conector que comprende respectivamente un grupo maleimido o haloacetamido (L* representa un fragmento de un conector L tal como L= -L*-maleimido o bien L= -L*-haloacetamido).



Estos derivados se obtienen por reacción entre un derivado de criptoficina que comprende un conector L' que comprende un grupo amino o tiol y un agente de modificación que permite introducir respectivamente un grupo maleimido o haloacetamido.

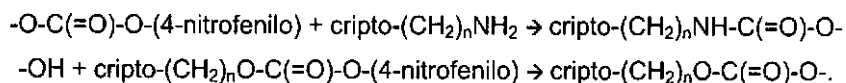
Ejemplos de reacciones entre el grupo G y una función química presente sobre PL

- sustitución nucleófila entre un precursor de conector PL portador de una función amina -NH- (una sal de amina puede ser igualmente adecuada) y $\text{G=-(CH}_2\text{)}_n\text{Cl}$ o $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{OMs}$ (véase por ejemplo, la **Tabla II**, PL_{1-4} , PL_{7a} , PL_{8-10} , PL_{21-23}): esta reacción se puede llevar a cabo en un disolvente polar aprótico en presencia de una base, como por ejemplo la TEA o la DIPEA. véase ej. 1, compuesto 7 o ej. 15, compuesto 48;
- acilación entre un precursor de conector PL portador de una función halogenuro de carbamilo y $\text{G=-(CH}_2\text{)}_n\text{OH}$ (véase por ejemplo, la **Tabla II**, PL_5): esta reacción se puede llevar a cabo en un disolvente polar aprótico en presencia de una base amina como, por ejemplo la TEA.

Según una variante, se puede hacer reaccionar igualmente un precursor de conector PL portador de una función amina -NH- y $\text{G=-(CH}_2\text{)}_n\text{O-C(=O)-O-(4-nitrofenilo)}$ obtenido a partir de $\text{G=-(CH}_2\text{)}_n\text{OH}$ y de p-nitrofenilcloroformiato (activación del alcohol bajo la forma de carbonato) según el esquema que sigue ($\text{R}_{12} = \text{H}$ o alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$)):



- la activación de un alcohol bajo la forma de carbonato se puede utilizar también para hacer reaccionar un precursor de conector portador de una función -OH y $\text{G=-(CH}_2\text{)}_n\text{NH}_2$ o $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{OH}$ para obtener respectivamente una función carbamato (-O-C(=O)-NH-) o carbonato (-O-C(=O)-O-) según los esquemas respectivos siguientes:



(véase por ejemplo, la **Tabla II**, PL_{6a-6b}, PL₂₄₋₂₅)

- esterificación entre un precursor de conector PL portador de una función ácido –COOH y G=-(CH₂)_nOH (véase por ejemplo, la **Tabla II**, PL_{14b}): esta reacción se puede llevar a cabo en un disolvente polar aprótico en presencia de una base amina como, por ejemplo la DMAP y de un agente de acoplamiento, por ejemplo el DCC;
- amidificación entre un precursor de conector PL portador de una función ácido –COOH y G=-(CH₂)_nNH₂ (véase por ejemplo, la **Tabla II**, PL_{14a}): esta reacción se puede llevar a cabo en un disolvente polar aprótico en presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo el EDCI o el HOBt;
- amidificación entre un precursor de conector PL portador de una función –NH₂ y G=-(CH₂)_nCOOH (véase por ejemplo, la **Tabla II**, PL_{7c}): esta reacción se puede llevar a cabo en un disolvente polar aprótico en presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo el EDCI o el HOBt;
- cicloadición 1,3-dipolar (llamada también química « click ») entre un precursor de conector PL portador de una función alcina terminal y G=-(CH₂)_nN₃ o bien entre un precursor de conector PL portador de una función azida y G=-(CH₂)_nNR₁₂-CH₂C≡CH (véase por ejemplo, la **Tabla II**, PL₁₅₋₁₈): esta reacción se puede llevar a cabo en un disolvente polar en presencia de Cu(I) como catalizador (véase a este propósito, sobre la cicloadición de Huisgen: Rostovtsev V.V., et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599; Tornøe C.W., et al., *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064);
- metátesis entre un precursor de conector PL portador de una función etilénica terminal y G=CH=CH₂ (véase la **Tabla II**, PL₁₉, PL₂₀): esta reacción se puede llevar a cabo en un disolvente polar aprótico en presencia del catalizador de Grubbs de segunda generación (CAS N°246047-72-3, véase a este propósito, Poelaut-Palena A.A., et al., *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2024-2027).

A propósito del conector L

- El conector **L** se podrá elegir entre uno de los siguientes:
- G' X (CR₁₃R₁₄)_l(OCH₂CH₂)_y(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l(OCH₂CH₂)_y-Y'-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_y Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l(OCH₂CH₂)_y(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l-fenil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-fúril-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l-oxazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-tiazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l-tienil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-imidazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;

- G' X (CR₁₃R₁₄)_t-piperazinil-CO(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-metil-NR₁₂-CO(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-NR₁₂-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-triazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-triazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
- 5 -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-fenil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-fúril-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-oxazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-tiazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-tienil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-imidazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-piperazinil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-metil-NR₁₂-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-NR₁₂-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G' X (CR₁₃R₁₄)_t-triazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
- 10 o
- G" Y (CR₁₃R₁₄)_t(OCH₂CH₂)_y(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
- G" Y (CR₁₃R₁₄)_t(OCH₂CH₂)_y-Y'-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
- G" Y (CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_y Q GCR₁;
- 15 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t(OCH₂CH₂)_y(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
- G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-fenil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-fúril-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-oxazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-tiazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-tienil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-imidazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-piperazinil-CO(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-metil-NR₁₂-CO(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-NR₁₂-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-triazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
- 20 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-fenil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-fúril-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-oxazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-tiazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-tienil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-imidazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-piperazinil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-piperazinil-(CR₁₅R₁₆)_u Q CCR₁; G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-metil-NR₁₂-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-NR₁₂-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁; -G" Y (CR₁₃R₁₄)_t-triazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
- 25
- 30 G' representa un grupo -CH=CH- o -(CH₂)_n;
- G" representa un grupo -(CH₂)_n;
- n representa un número entero que va de 1 a 6;
- X representa un enlace simple o un grupo -CO-, -COO-, o -CONR₁₂-, estando el grupo CO unido a G';
- 35 Y representa un grupo -O-, -OCO-, -OCOO-, -OCONR₁₂-, -NR₁₂-, -NR₁₂CO-, -NR₁₂CONR'₁₂-, -NR₁₂COO- o -S(O)_q-, estando el átomo O o el grupo NR₁₂ unidos a G";
- Y' representa un grupo -O-, -OCO-, -OCOO-, -OCONR₁₂-, -NR₁₂-, -NR₁₂CO-, -NR₁₂CONR'₁₂-, -NR₁₂COO-, -S(O)_q-, -CO-, -COO-, o -CONR₁₂-;

R_{12} , R'_{12} , R_{13} , R_{14} , R_{15} y R_{16} , R_{17} y R_{18} representan independientemente uno de otro H o un grupo alquilo(C_1 - C_6);

t , u e y representan números enteros que pueden ir de 0 (en el caso de grupo ausente) a 20 y tales que $t+u+y$ sea superior o igual a 1;

5 q representa un número entero que puede valer 0, 1 o 2;

Q representa un enlace simple, un grupo alquileo(C_1 - C_{10}) o un grupo $(OCH_2CH_2)_i$, siendo i un número entero que va de 1 a 20, más particularmente de 1 a 10, más particularmente aún de 1 a 8, o de 1 a 6 y aún más particularmente de 2 a 5. i puede tomar cada uno de los valores de estos intervalos, especialmente valor 2, 3, 4 o 5.

10

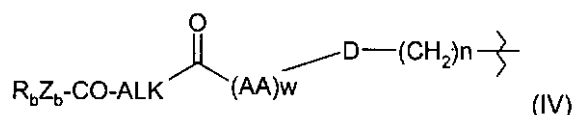
En el caso del conector de fórmula $-G'' Y (CR_{13}R_{14})_t(OCH_2CH_2)_y-Y'-(CR_{15}R_{16})_u Q GCR_1$, si y vale 0 (sin grupo PEG) y cuando Q representa un enlace simple, entonces u no puede valer 0. Más particularmente, se excluyen los conectores que comprenden el motivo terminal $-NR_{12}-C(=O)-O-$ ($Y'=NR_{12}$; $u=0$; Q =enlace simple y $GCR_1=-C(=O)Z_bR_b$).

15

y representa un número entero que va de 0 a 20, más particularmente de 1 a 20, más particularmente aún de 1 a 10, de 1 a 8, o de 1 a 6 y aún más particularmente de 2 a 5. y puede tomar cada uno de los valores de estos intervalos, especialmente valor 2, 3, 4 o 5.

20 Algunos de estos conectores han sido descritos en las solicitudes **WO 07085930** y **WO 09016516**.

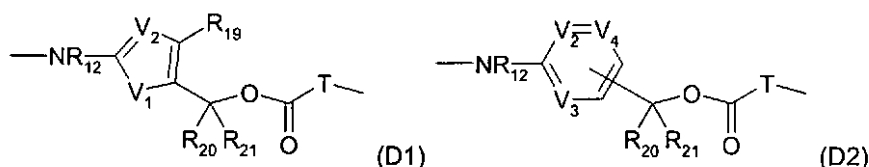
El conector L podrá ser elegido entre uno de los de la fórmula (IV):

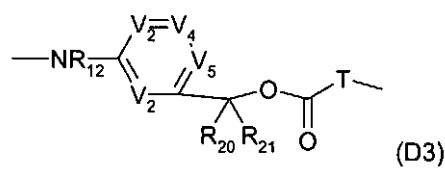


25 en la que:

- $(AA)_w$ representa una cadena de w aminoácidos AA unidos entre sí por enlaces peptídicos;
- w representa un número entero que va de 1 a 12, con preferencia de 1 a 6;
- n representa un número entero que va de 1 a 6;
- D representa uno de los motivos siguientes:

30

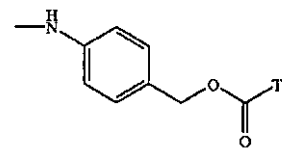




para los que:

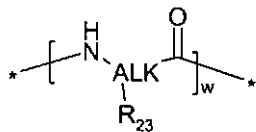
- R_{12} representa H o un grupo alquilo (C_1-C_6);
- $R_{19}, R_{20}, R_{21}, R_{22}$ representan independientemente uno de otro H, un átomo de halógeno, -OH, -CN o un grupo alquilo (C_1-C_4);
- T unido a $(CH_2)_n$ representa NR_{12} u O;
- V_1 representa O, S, NR_{12} ;
- V_2 representa CR_{22} o N;
- V_3, V_4, V_5 se eligen independientemente uno de otro entre CR_{22} o N.

Un ejemplo de D2 es el siguiente:



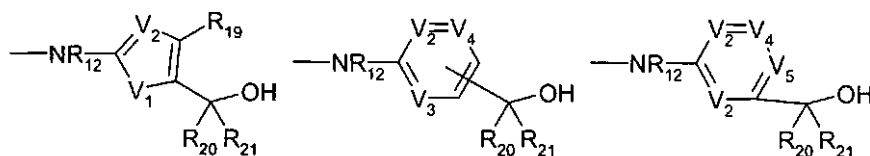
AA indica un aminoácido natural o no natural, más particularmente elegido entre: alanina (Ala), β -alanina, ácido 2-amino-2-ciclohexilacético, ácido 2-amino-2-fenilacético, arginina (Arg), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), triptófano (Trp), tirosina (Tyr), valina (Val), ácido γ -aminobutírico, ácido α,α -dimetil γ -aminobutírico, ácido β,β -dimetil γ -aminobutírico, ornitina (Orn), citrulina (Cit).

La formación de cadenas $(AA)_w$ tiene por fórmula:



en la que R_{23} representa un residuo de uno de los aminoácidos descritos anteriormente. Ejemplos de formación de cadenas son los siguientes: Gly-Gly, Phe-Lys, Val-Lys, Val-Cit, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Ala-Lys, Val-Cit, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Ala-Phe, Gly-Gly-Gly, Gly-Ala-Phe, Gly-Val-Cit, Gly-Phe-Leu-Cit, Gly-Phe-Leu-Gly, Ala-Leu-Ala-Leu.

Los precursores de conectores son aquellos que comprenden los motivos -OH correspondientes:

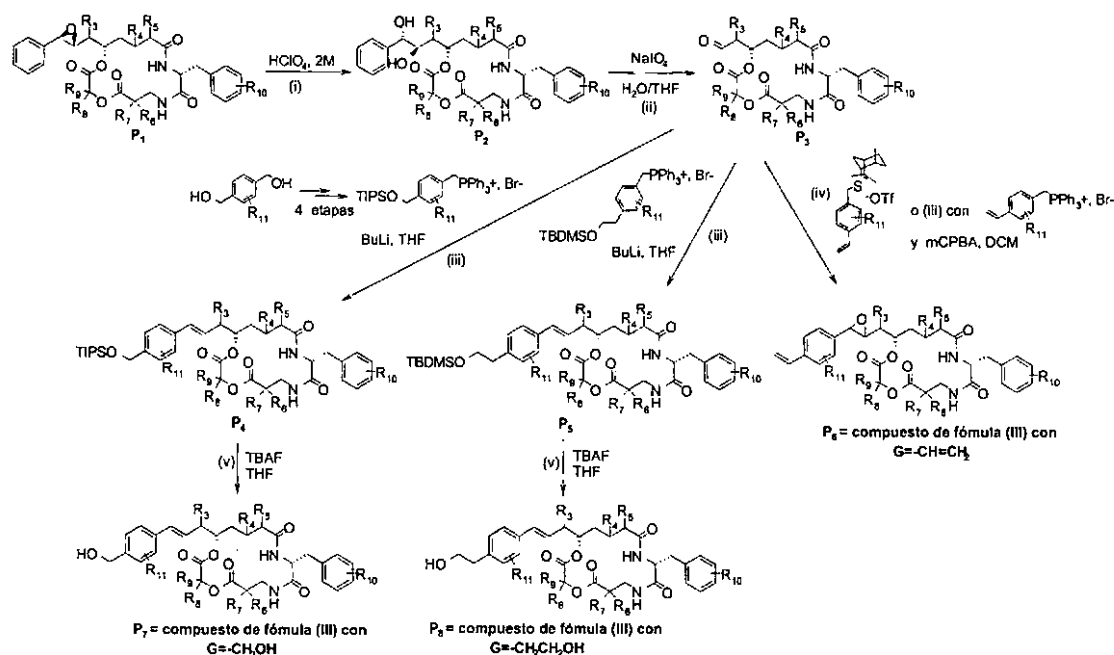


El documento **WO 2005/082023** (véase especialmente las páginas 61-64) describe cómo obtener ciertos precursores de conectores. Las preparaciones de los precursores de conectores **PL25** y **PL26** descritos antes se pueden utilizar igualmente para obtener otros precursores de conectores similares que comprenden otra formación de cadenas (AA)_w.

El conector **L** podrá ser elegido igualmente entre uno de los descritos en la **Tabla II** o entre los compuestos de los ejemplos. En todas las fórmulas de conectores, **NR₁₂** o **NR'₁₂** representa más particularmente NH o NMe.

Preparación de los compuestos de la fórmula (III)

Caso en que G=-(CH₂)_nOH o -CH=CH₂



Esquema 2

15

P₁ se prepara según indican las solicitudes **WO 98/08505**, **WO 00/23429** o **WO 00/34252** así como las publicaciones siguientes Rej R., et al., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6289-6295; Salamonczyk G.M., et al., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6893-6900 o *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (14), 2588-2603 (incorporadas aquí como referencia). En las páginas 158-159 de « The isolation, characterization and development of a novel class of potent antimitotic macrocyclic depsipeptides: the criptophycins », Chap.9, en « Anticancer agents from natural products », Tailor&Francis, CRC press book, isbn=0-8493-1863-7 se dan los esquemas de síntesis que

20

permiten preparar los diferentes fragmentos (A, B, C y D) de criptoficina y llegar a **P₁**. Rej R., et al., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6289-6295 describe sobre los esquemas 1-6 la vía de acceso a uno de los derivados de criptoficina de la Figura 1 pero estos esquemas se pueden aplicar a la preparación de **P₁** utilizando los reactivos de partida idóneos.

5

P₁ permite preparar otros derivados de criptoficina con ayuda de las etapas detalladas a continuación:

Etapas (i): abertura del ciclo epóxido de **P₁** en medio ácido que permite obtener la función diol. Se puede utilizar por ejemplo el ácido perclórico concentrado;

10

Etapas (ii): corte oxidante del diol con ayuda por ejemplo del peryodato de sodio;

Etapas (iii): reacción de Wittig utilizando un halogenuro de fosfonio adecuado, por ejemplo un bromuro, y una base fuerte tal como por ejemplo BuLi;

Etapas (iv): reacción de epoxidación de Corey-Chaykovsky haciendo intervenir una sal de sulfonio quiral, por ejemplo un triflato, en presencia de una base tal como por ejemplo KOH.

15

Etapas (v): desprotección del éter sililado utilizando por ejemplo una solución de fluoruro de tetrabutilamonio.

El bromuro de 4-(triisopropilsiloximetil)benciltrifenilfosfonio se obtiene a partir del 1-(bromometil)-4-(triisopropilsiloximetil)benceno (CAS N° 934667-38-6) cuya preparación a partir de 1,4-benzenodimetanol (CAS N° 589-29-7, producto comercial) está descrita por Potter R.G., et al., *Organic Letters* **2007**, *9*(7), 1187-1190. Los compuestos para los cuales R₁₁ representa un grupo alquilo(C₁-C₄) se obtienen de forma semejante a partir del diol correspondiente que es o bien un producto comercial o bien se obtiene por C-alkilación de Friedel-Crafts a partir del 1,4-benzenodimetanol.

25

A partir del 1-(bromometil)-4-(triisopropilsiloximetil)benceno (CAS N°135408-73-0), cuya preparación está descrita en el esquema 4a del documento **EP 0496548** o en la página 83 del artículo de Nevill C.R. Jr., et al., *Bioorganic & Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*(1), 83-86, se puede obtener el bromuro de fosfonio correspondiente. Los compuestos para los cuales R₁₁ representa un grupo alquilo(C₁-C₄) se obtienen de forma semejante a partir de un compuesto equivalente al compuesto 1 descrito en la página 83 del artículo de Nevill C.R. Jr., et al., *Bioorganic & Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*(1), 83-86 que es o bien un producto comercial o bien se obtiene por C-alkilación de Friedel-Crafts a partir del ácido *p*-tolilacético.

30

35

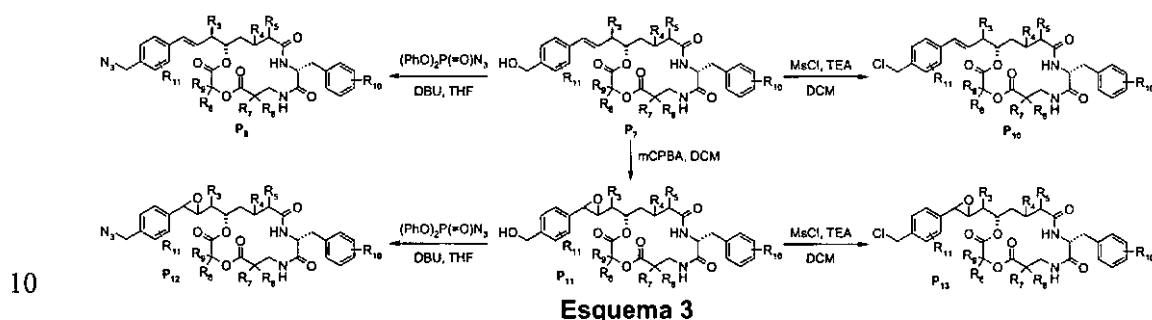
El trifluorometanosulfonato de (1R,4R,5R,6R)-4,7,7-trimetil-6-(4-vinil-bencil)-6-tionia-biciclo[3.2.1]octano utilizado en la etapa (iv) se obtiene a partir del (1R,4R,5R)-isotiocineol (véase Aggarwal V. et al., *JACS* **2010**, *132*, 1828-1830) cuya preparación a partir del (R)-limoneno (CAS N°95327-98-3, producto comercial) está descrita en esta misma referencia.

El bromuro de trifenil(*p*-vinilbencil)fosfonio (CAS N°118766-51-1) se obtiene a partir del derivado bromado correspondiente (véase Drefahl G., et al., *Chem. Ber.* **1961**, 94(8), 2002-2010) cuya preparación a partir del alcohol 4-vinilbencilico (CAS N°1074-61-9, producto comercial) está descrita en el artículo de Shimomura O., et al., *Tetrahedron* **2005**, 61, 12160-12167.

5

A partir de **P**₇ o de **P**₈ que son compuestos de la fórmula (III) para los cuales G=-(CH₂)_nOH, se pueden obtener otros compuestos de la fórmula (III) que tienen otros grupos G.

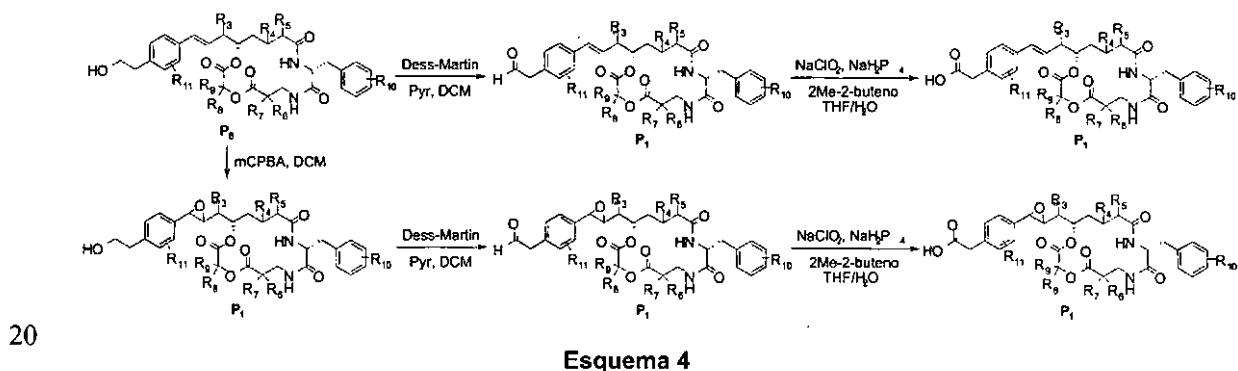
Caso en que G=-(CH₂)_nCl o -(CH₂)_nN₃



A partir del grupo G=CH₂OH, se pueden obtener los grupos G=CH₂Cl o -CH₂N₃:

- la introducción de -Cl se puede realizar en presencia de CMS: véase ej. 1-compuesto 2;
- 15 - la azidación se puede realizar en presencia de difenilfosforazida (PhO)₂P(=O)N₃ y de una base, por ejemplo el DBU. El **Esquema 3** describe estas reacciones para el caso en que n=1 pero se puede aplicar igualmente para n>1.

Caso en que G=-(CH₂)_nCOOH

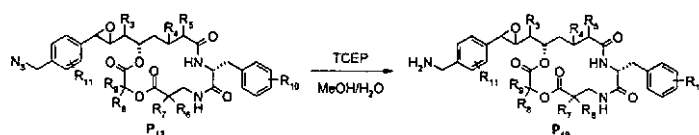


- A partir del grupo G=-(CH₂)₂OH, se puede obtener el grupo G=CH₂COOH por una oxidación. El **Esquema 4** describe una doble oxidación: primera oxidación con ayuda del reactivo de Dess-Martin (véase "Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis"; Paquette L. A., Ed.; Wiley: Chichester, UK, **1995**, Vol. 7, 4982-4987 o Boeckman R.K. Jr., et al., J.J. "The Dess-Martin Periodinane" *Org. Synth.* **2004**, 10, 696-702) seguida de una segunda oxidación de tipo Pinnick en presencia de 2-metil-2-buteno (Pinnick H.W., *Tetrahedron* **1981**, 37, 2091-2096). El **Esquema**
- 25

4 describe estas reacciones para el caso de un compuesto de partida para el que $n=2$ pero se puede aplicar igualmente para $n>2$.

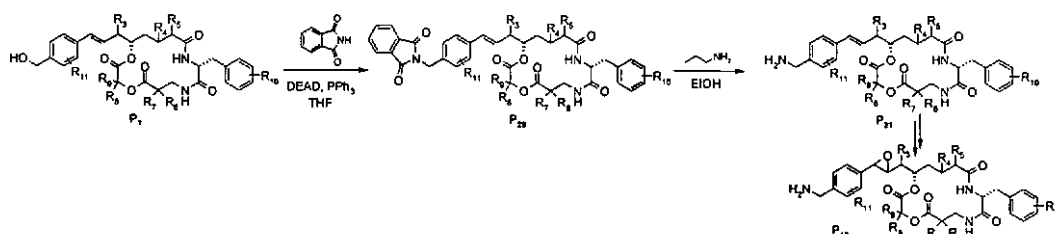
5

Caso en que $G=-(CH_2)_nNH_2$



Esquema 5

- 10 A partir del grupo $G=CH_2N_3$ cuya preparación está descrita en el **Esquema 3**, se puede obtener el grupo $G=CH_2NH_2$ con ayuda de una reacción de reducción utilizando una fosfina como el TCEP. A este propósito, véase: Faucher A.-M. et al., *Synthetic Comm* **2003**, 33, 3503-3511:



Esquema 5'

15

Según una variante, a partir del grupo $G=CH_2OH$, se puede obtener el grupo $G=CH_2NH_2$ con ayuda de una reacción de Mitsunobu utilizando la trietilfosfina y el DEAD. A este propósito, véase: Mitsunobu O., *Synthesis* **1981**, 1-28; Hughes D.L., *Org. Reactions* **1992**, 42, 335-656; Hughes D.L., *Org. Prep.* **1996**, 28, 127-164. Los **Esquemas 5 y 5'** describen el caso en que $n=1$ pero se pueden aplicar igualmente para $n>1$.

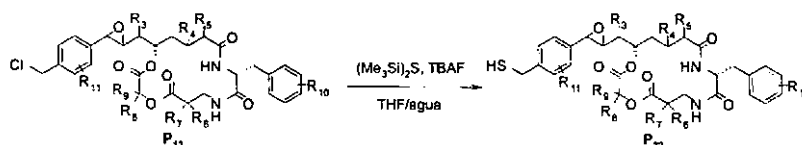
20

Caso en que $G=-(CH_2)_n-NR_{12}-CH_2C=CH$

A partir del grupo $G=-(CH_2)_nCl$, se puede obtener el grupo $G=-(CH_2)_n-NR_{12}-CH_2C=CH$ con ayuda de una sustitución nucleófila utilizando el compuesto de la fórmula $NHR_{12}-CH_2C=CH$ ($R_{12}=H$: propargilamina; R_{12} = alquilo (C_1-C_6): preparado según Mock W.L., et al., *J.Org. Chem.* **1989**, 54 (22), 5302-8).

25

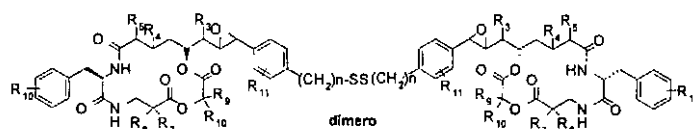
Caso en que $G=-(CH_2)_n-SH$



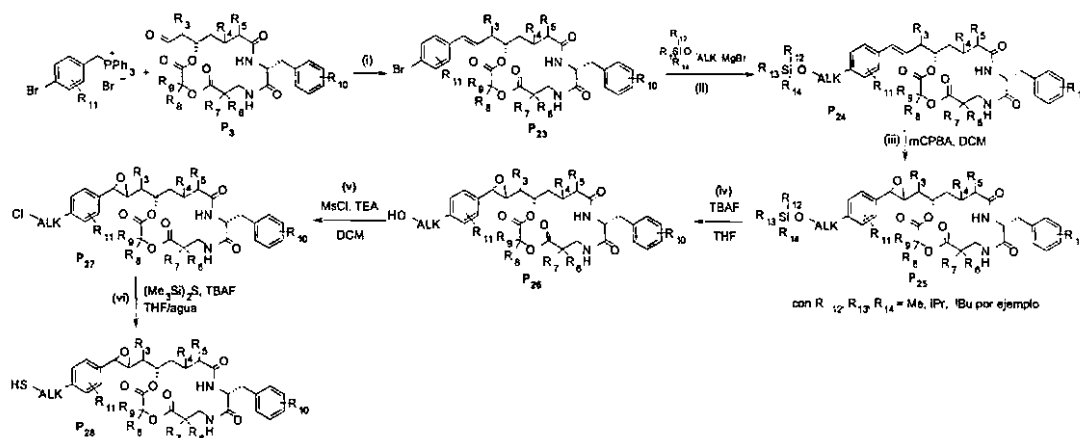
Esquema 6

30

A partir del grupo $G=-(CH_2)_nCl$, se puede obtener el grupo $G=-(CH_2)_nSH$ por una funcionalización directa con ayuda de trimetilsililtiolato de tetrabutilamonio preparado *in situ* a partir de fluoruro de tetrabutilamonio y de hexametildisilatioano según Hu J. et al., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4959-4961 (véase ej. 8). El Esquema 6 describe esta reacción para el caso en que $n=1$ pero se puede aplicar igualmente para $n>1$. A lo largo de esta reacción, se puede formar el dímero intermedio de fórmula:



Caso en que $G=ALK-SH$



Esquema 7

P_3 permite preparar otros derivados de criptoficina según el Esquema 7:

Etapas (i): reacción de Wittig utilizando un halogenuro de fosfonio adecuado, por ejemplo un bromuro, y una base fuerte tal como por ejemplo BuLi;

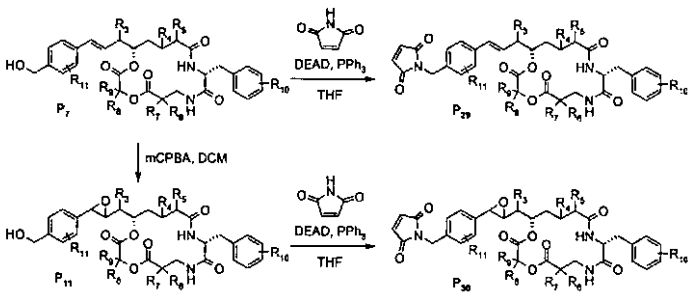
Etapas (ii): acoplamiento de Kumada utilizando un reactivo de Grignard adecuado, por ejemplo un bromuro de alcoximagnesio protegido bajo la forma de éter sililado, en presencia de un catalizador de paladio o de níquel (véase por ejemplo *Organic Letters* **2009**, *11*, 5686-5689 o *Synthesis* **2009**, *141*, 2408-2412).

Las etapas (iii) a (v) se describen en el Esquema 2 y la etapa (vi) en el Esquema 6.

El bromuro de (4-bromobencil)trifenilfosfonio es un producto comercial (CAS N° 51044-13-4). Los bromuros de alcoximagnesio protegidos bajo la forma de éter sililado se pueden preparar a partir de los bromoalcoholes correspondientes mediante protección de la función alcohol con el clorosilano adecuado y después formación del organomagnesiano en presencia de magnesio en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF (véase por ejemplo *Organic Letters* **2005**, *7*, 183-186). Los bromoalcoholes, lineales o ramificados comprenden 1 a 6 átomos de carbono,

están comercialmente disponibles, como el 3-bromo-1-propanol (CAS N° 627-18-9) o el 1-bromo-2-propanol (CAS N° 19686-73-8) o se pueden preparar a partir de los bromoésteres o bromocetonas correspondientes según métodos descritos en la bibliografía. El clorosilano puede ser, por ejemplo, el *tert*-butildimetilclorosilano (CAS N°18162-48-6) o el triisopropil-clorosilano (CAS N°13154-24-0).

Caso en que G=-(CH₂)_n-maleimido



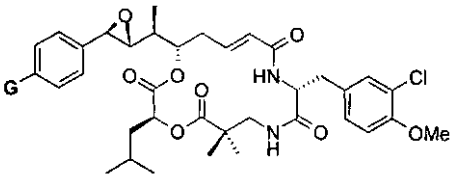
Esquema 8

Como complemento del esquema 1' que describe un método de preparación de derivados de criptoficina que comprenden un motivo maleimido, a partir del grupo G=CH₂OH, se puede

obtener el grupo G=  por una reacción de Mitsunobu en presencia de trifenilfosfina y de DEAD según Matuszak N. et al., *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7410-7420. El **Esquema 8** describe esta reacción para el caso en que n=1 pero se puede aplicar igualmente para n>1.

Los **Esquemas 1-8** anteriores se dan para un conector en posición para, pero se podrían aplicar de modo idéntico para las posiciones orto o meta. Del mismo modo, se dan para un derivado de criptoficina pero se podrían aplicar a la preparación de otros derivados de la fórmula (II), especialmente D₁-D₈.

Más particularmente, en el caso de la **C-52**, se podrán utilizar los compuestos siguientes cuyas preparaciones están descritas en Al-awar R.S., et al., *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2985-3007 o en el documento **WO 9808505**:



- G=CH₂OH: compuesto 31b del esquema 5
- G=CH₂CH₂OH: compuesto 49 del esquema 9
- G=CH₂COOH: compuesto 51 del esquema 9 o ej. 81 del documento **WO 9808505**
- G=C(=O)H: ej. 80 del documento **WO 9808505**

Por otra parte, a partir del compuesto 31b para el que G=CH₂OH, es posible obtener los compuestos para los cuales G=CH₂Cl o -CH₂N₃:

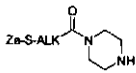
- G=CH₂Cl: véase ejemplo 1, compuesto 2;

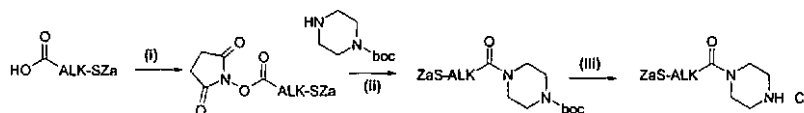
- $G=-CH_2N_3$: la conversión de $-CH_2OH$ en $-CH_2N_3$ se puede realizar en un disolvente polar aprótico en presencia de difenilfosforazida y de una base como el DBU, véase ejemplo 19, compuesto 60.
- $G=-CH_2maleimido$: la conversión de $-CH_2OH$ en $-CH_2maleimido$ se puede realizar en un disolvente polar aprótico en presencia de maleimida, de trietilfosfina y de DEAD.

La enseñanza de *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2985-3007 se podría aplicar a otros derivados de criptoficina que comprenden otros sustituyentes R_8-R_9 .

Preparación de los precursores de conector PL

- 10 PL podrá ser uno de los siguientes:

PL₁  preparado según el esquema que sigue:

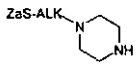


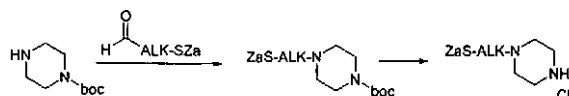
- Etapas (i):** activación del ácido con ayuda de NHS; la activación se realiza a temperatura ambiente en presencia de un agente de acoplamiento como por ejemplo el hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida en solución en un disolvente aprótico anhidro como el DCM. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 1, compuesto 4.

- Etapas (ii):** amidificación con la piperidina N-Boc; el acoplamiento peptídico se realiza en un disolvente polar aprótico a temperatura ambiente en presencia de una base, que puede ser una amina terciaria como la TEA o la DIPEA. El disolvente puede ser la DMF. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 1, compuesto 5.

Etapas (iii): desprotección de la amina con ayuda de una solución de ácido, por ejemplo ácido clorhídrico (por ejemplo, en solución en dioxano). Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 1, compuesto 6.

- El ácido de partida, por ejemplo el ácido 4-metil-4-(metiliditio)-pentanoico, puede ser comercial o se puede preparar a partir de un ácido carboxílico halogenado por tratamientos sucesivos con el tioacetato de potasio y un derivado de tipo metanotiosulfonato. Véase también el documento **US 2719170**.

PL₂  preparado según el esquema que sigue:



Etapas (i): aminación reductora con un aldehído; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF en dos etapas: formación de un complejo intermedio en presencia de isopropóxido de titanio y después reducción *in situ* con un

agente reductor como por ejemplo el cianoborohidruro de sodio. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 5, compuesto 17.

Etapla (ii): desprotección de la amina con ayuda de una solución de ácido, por ejemplo ácido clorhídrico (por ejemplo, en solución en dioxano). Se podrán seguir las condiciones del ejemplo

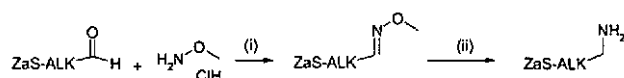
5, compuesto 18.

El aldehído de partida, por ejemplo el 2-metil-2-(metilditio)-propanal, puede ser comercial o se puede preparar por oxidación de un alcohol portador de un motivo disulfuro obtenido a partir de un alcohol halogenado convenientemente protegido (por ejemplo bajo la forma de éter sililado) por tratamientos sucesivos con el tioacetato de potasio y un derivado de tipo metanotiosulfonato.

10

PL₃ ZaS-ALK-NHR_{12} preparado según los esquemas que siguen:

Caso en que $R_{12}=H$



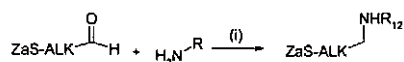
Etapla (i): formación de una oxima; el aldehído precedentemente descrito se disuelve en un disolvente polar prótico como el etanol y después se trata con hidrocloreuro de O-metilhidroxilamina a reflujo en presencia de una base como hidróxido de sodio. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 3, compuesto 11.

15

Etapla (ii): reducción de la oxima; la oxima se reduce por un tratamiento a reflujo con una solución de dimetilsulfuro de borano en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 3, compuesto 12.

20

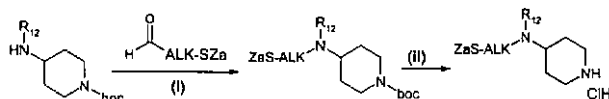
Caso en que $R_{12} \neq H$



Etapla (i): aminación reductora con un aldehído; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF en presencia de un agente reductor como por ejemplo el triacetoxiborohidruro de sodio.

25

PL₄ $\text{ZaS-ALK-N(R}_{12}\text{)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ preparado según el esquema que sigue:

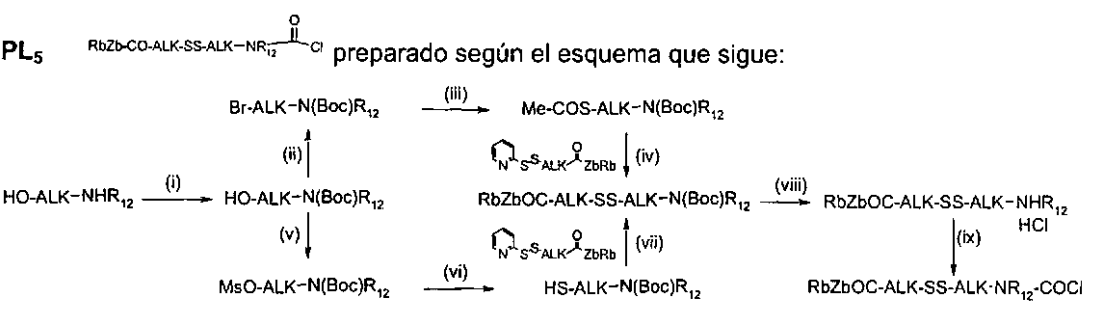


30 Este conector se prepara de forma similar a la que se presenta para PL₂.

Etapla (i): aminación reductora con un aldehído; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF en dos etapas: formación de un complejo intermedio en presencia de isopropóxido de titanio y después reducción *in situ* con un

agente reductor como el cianoborohidruro de sodio. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 5, compuesto 17.

Etapla (ii): desprotección de la amina con ayuda de una solución de ácido, por ejemplo ácido clorhídrico (por ejemplo, en solución en dioxano). Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 5, compuesto 18.



Etapla (i): protección de la amina; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el DCM por tratamiento de la amina con el dicarbonato de di-*terc*-butilo en presencia de una base como por ejemplo la TEA.

Etapla (ii): transformación del alcohol en bromuro; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el THF por tratamiento de la función alcohol con CBr₄ en presencia de una fosfina por ejemplo la trifenilfosfina; véase a este propósito Appel R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 801-811 o Desmaris N., et al., *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*(41), 7589-7591.

Etapla (iii): sustitución del bromuro por el tioacetato; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico anhidro como la DMF utilizando como nucleófilo el tioacetato de potasio.

Etapla (iv): formación del enlace disulfuro; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el metanol en presencia de una base como por ejemplo el metanolato de sodio y de un reactivo que comprende un motivo piridil-disulfuro.

Según una variante:

Etapla (v): activación del alcohol bajo la forma de mesilato; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el DCM por tratamiento con el cloruro de mesilo en presencia de una base como por ejemplo la TEA.

Etapla (vi): formación del tiol libre; la reacción se lleva a cabo a reflujo en un disolvente polar aprótico como una mezcla de etanol/agua en dos etapas sucesivas: desplazamiento del mesilato por la tiourea y después hidrólisis *in situ* de la sal de isotiuronio por adición de una base como NaOH.

Etapla (vii): activación del tiol bajo la forma de piridil-disulfuro; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el etanol por tratamiento con un

reactivo que comprende un motivo piridil-disulfuro en presencia de un ácido como el ácido acético.

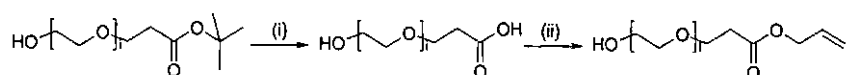
Etapla (viii): desprotección de la amina con ayuda de una solución de ácido, por ejemplo ácido clorhídrico (por ejemplo, en solución en dioxano).

Etapla (ix): activación de la amina bajo la forma de cloruro de carbamoilo; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el DCM por tratamiento con difosgeno en presencia de una base como la TEA.

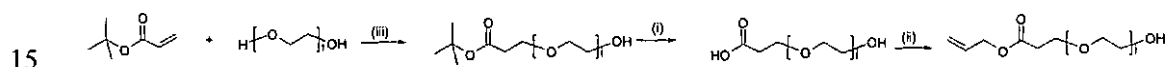
10 **PL₆** $\text{RbZb-OC-ALK-(OCH}_2\text{CH}_2)_i\text{-OH}$ preparado según el esquema que sigue:

Caso en que $\text{ALK}=\text{CH}_2\text{CH}_2$

Ruta A:



Ruta B:

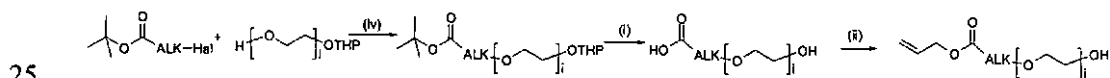


Etapla (i): desprotección con ayuda de una solución de ácido clorhídrico (por ejemplo, solución en dioxano) o de ácido trifluoroacético.

Etapla (ii): protección del ácido carboxílico bajo la forma de éster alílico; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como la DMF en presencia de bromuro alílico y de una base como el carbonato de potasio.

Etapla (iii): elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF por tratamiento de un ácido insaturado protegido bajo la forma de éster con el alcoholato generado por la acción de sodio en cantidad catalítica.

Caso en que $\text{ALK}\neq\text{CH}_2\text{CH}_2$



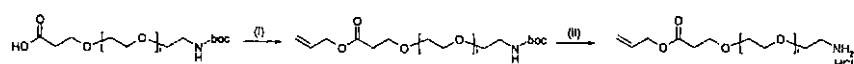
Etapla (iv): elongación de la cadena PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF o la DMF por tratamiento de un éster halogenado con el alcoholato de un diol PEG monoprotegido bajo la forma de éter de tetrahidropirano (THP). La preparación de este tipo de diol PEG monoprotegido está bien descrita en la bibliografía, véase por ejemplo, Richard A. et al. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 7315-7321 o Sakellariou E.G., et al. *Tetrahedron* **2003**, 59, 9083-9090.

Los alcoholes PEG que tienen una función ácido protegida bajo la forma de éster *terc*-butilico están comercialmente disponibles (como el 12-hidroxi-4,7,10-trioxadodecanoato de *terc*-butilo) o se preparan a partir del acrilato de *terc*-butilo y de un diol PEG. Los dioles PEG de partida están comercialmente disponibles para $i=3$ a 12.

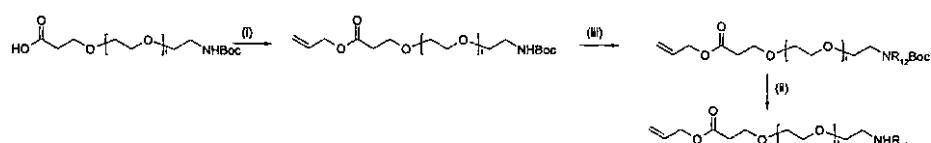
PL₇ $\text{RbZbOC-ALK-(OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{-NHR}_{12}$ preparado según los esquemas que siguen:

Caso en que $\text{ALK}=\text{CH}_2\text{CH}_2$

5 Caso en que $\text{R}_{12}=\text{H}$

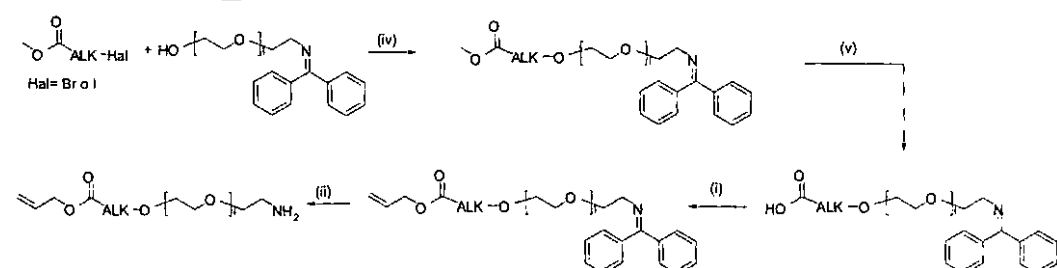


Caso en que $\text{R}_{12}\neq\text{H}$

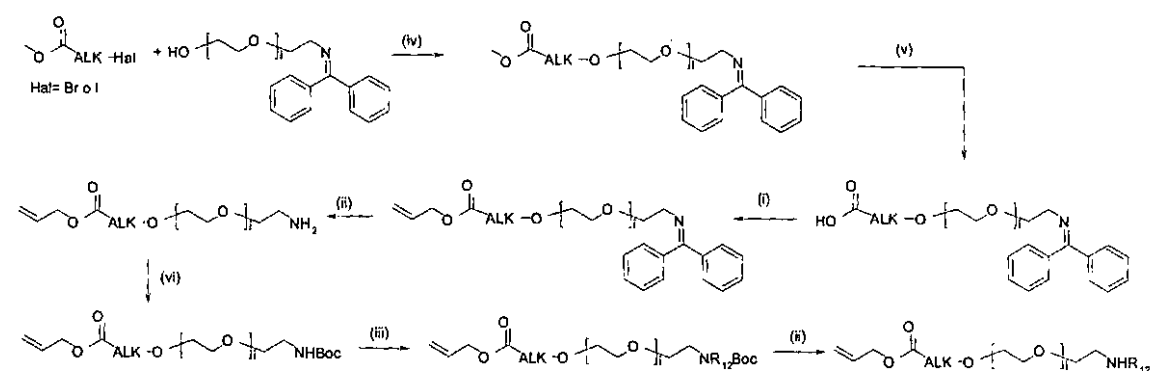


Caso en que $\text{ALK}\neq\text{CH}_2\text{CH}_2$

10 Caso en que $\text{R}_{12}=\text{H}$



Caso en que $\text{R}_{12}\neq\text{H}$



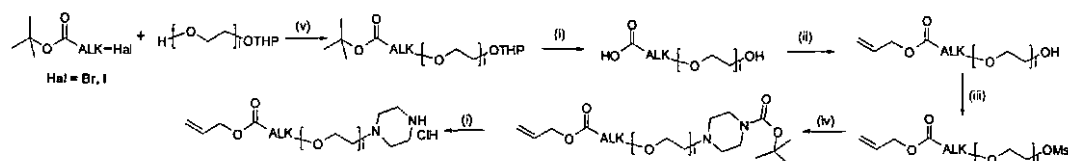
15 Etapas (i): protección del ácido carboxílico bajo la forma de éster alílico; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el DCM en presencia de alcohol alílico, de un agente de acoplamiento como el EDCI y de una base como la DMAP. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 14, compuesto 42.

20 Etapas (ii): desprotección con ayuda de una solución de ácido clorhídrico (por ejemplo, solución en dioxano) o de ácido trifluoroacético. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 14, compuesto 43.

Etapas (iii): alquilación del átomo de nitrógeno; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF por tratamiento con una base como NaH en presencia de un

aprótico anhidro como el DCM en presencia de una base como la TEA. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 16, compuesto 52.

Caso en que $ALK \neq CH_2CH_2$

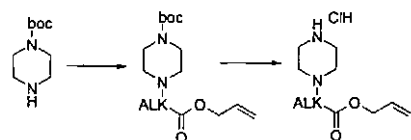


- 5 **Etapla (v):** elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF o la DMF por tratamiento de un éster halogenado con el alcoholato de un diol PEG monoprotegido bajo la forma de éter de tetrahidropirano (THP). La preparación de este tipo de diol PEG monoprotegido está bien descrita en la bibliografía, véase por ejemplo, Richard A. et al. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 7315-7321 o Sakellariou E.G., et al. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9083-9090.

Los alcoholes PEG que comprenden una función ácido protegida bajo la forma de éster *terc*-butílico están comercialmente disponibles (como el 12-hidroxi-4,7,10-trioxadodecanoato de *terc*-butilo) o se preparan a partir del acrilato de *terc*-butilo y de un diol PEG. Los dioles PEG de partida están comercialmente disponibles para $i=3$ a 12.

15

PL₉ preparado según el esquema que sigue:



- 20 **Etapla (i):** alquilación de la amina; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el acetonitrilo con un halogenoalquilcarboxilato de alilo como el bromoacetato de alilo en presencia de una base como por ejemplo la TEA. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 13, compuesto 38.

Etapla (ii): desprotección de la amina con ayuda de una solución de ácido, por ejemplo ácido clorhídrico (por ejemplo, en solución en dioxano). Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 13, compuesto 39.

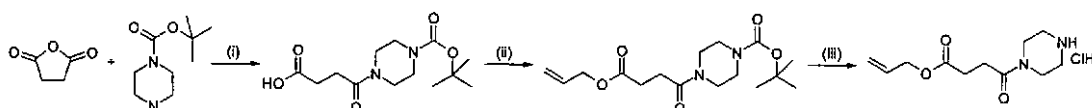
- 25 El halogenoalquilcarboxilato de alilo se puede obtener a partir del alcohol alílico y del halogenuro de halogenoacilo correspondiente y comercialmente disponible para $ALK=-(CH_2)_{1-6}$ (como el bromuro de bromoacetilo o el cloruro de 4-butanoilo).

PL₁₀ preparado según los esquemas que siguen:

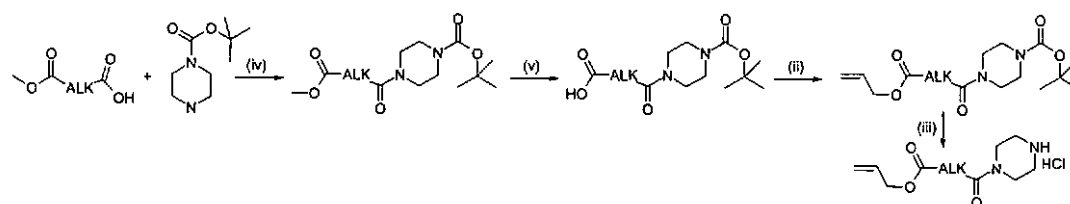
30

Caso en que $ALK=CH_2CH_2$

5



Caso en que $ALK \neq CH_2CH_2$



Etapas (i): abertura del anhidrido cíclico; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico anhidro como el DCM en presencia de una base como la TEA.

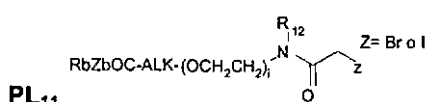
- 10 Etapas (ii): protección del ácido carboxílico bajo la forma de éster alílico; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el DCM en presencia de alcohol alílico, de un agente de acoplamiento como el EDCI y de una base como la DMAP.

Etapas (iii): desprotección con ayuda de una solución de ácido clorhídrico (por ejemplo, solución en dioxano).

- 15 Etapas (iv): acoplamiento péptico; la reacción entre el ácido carboxílico y la amina se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el DCM en presencia de un agente de acoplamiento como el sistema DIC / HOBt.

Etapas (v): saponificación del éster metílico; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en una mezcla de disolventes polares como una mezcla de THF/agua en presencia de litina.

- 20 Los diácidos monoprottegidos bajo la forma de éster metílico están comercialmente disponibles para $ALK=-(CH_2)_{1-6}-$ (como el éster monometílico del ácido 1,6-hexanodioico).



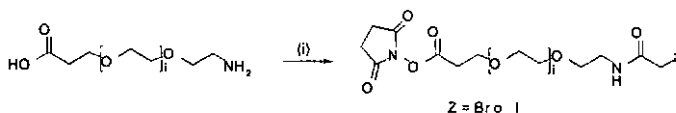
PL₁₁

preparado según los esquemas que siguen:

Caso en que $ALK=CH_2CH_2$

25

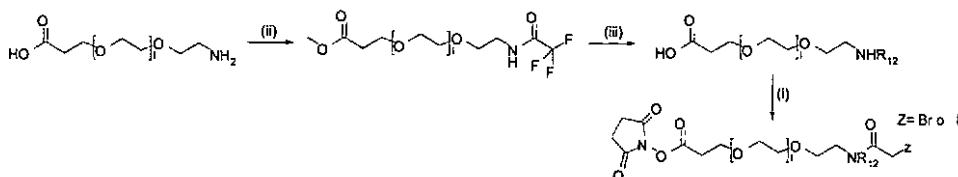
Caso en que $R_{12}=H$



Etapas (i): formación de la amida y activación del ácido; las dos etapas se realizan sucesivamente en un disolvente polar aprótico como el DCM: reacción entre la función amina y el halogenoacetato de N-hidroxisuccinimidilo y después adición *in situ* de un agente de

acoplamiento como el DIC. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 17, compuesto 56.

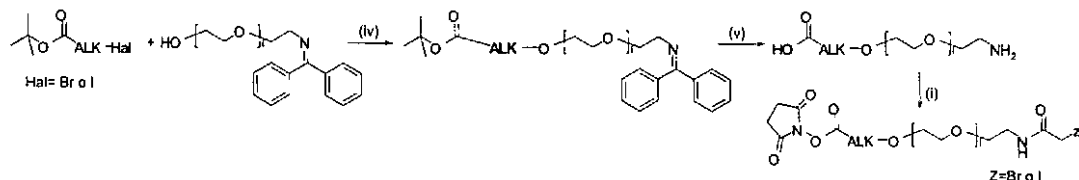
Caso en que $R_{12} \neq H$



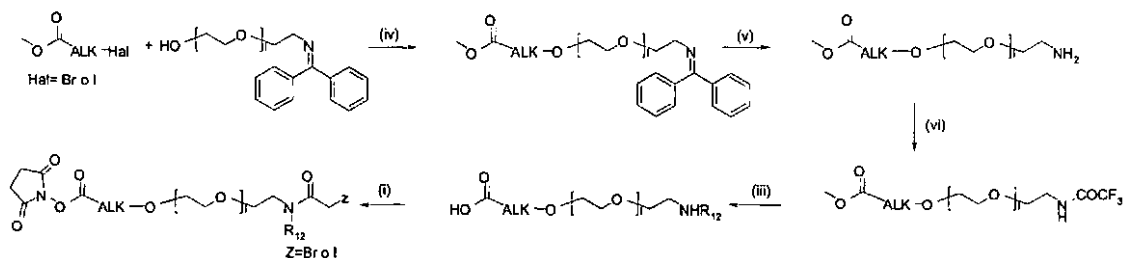
- 5 Etapla (ii): protecciones del ácido carboxílico bajo la forma de éster metílico y de la amina bajo la forma de trifluoroacetamida; la reacción se lleva a cabo en dos etapas sucesivas en un disolvente polar aprótico como el DCM: protección del ácido por tratamiento con el trimetilsilildiazometano en presencia de metanol y después protección de la amina por adición de anhídrido trifluoroacético y de una base como la TEA.
- 10 Etapla (iii): alquilación de la amina y saponificación del éster; la reacción se lleva a cabo en dos etapas sucesivas en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF: alquilación de la amina por tratamiento con una base como NaH en presencia de un reactivo portador de un grupo nucleófilo como un halogenuro de alquilo $R_{12}Hal$ y después adición de litina y de agua.
- Etapla (i): a continuación de la etapa (iii), se repiten las reacciones de la etapa (i) para el caso
- 15 $R_{12} = H$.

Caso en que $ALK \neq CH_2CH_2$

Caso en que $R_{12} = H$



20 Caso en que $R_{12} \neq H$



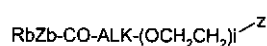
- Etapla (iv): elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF o la DMF por tratamiento de un éster halogenado con el alcoholato de un benzofenona-imina-PEG-alcohol generado por la acción de NaH o del naftalenuro de potasio (véase el documento **WO 2007/127440**);
- 25 Etapla (v): escisión selectiva de la imina por hidrogenación en presencia de paladio sobre carbón (véase Wessjohann, L. et al., *Synthesis* **1989**, 5, 359-63);

Etapla (vi): protección de la amina por adición de anhídrido trifluoroacético y de una base como la TEA.

Los amino-PEG-ácidos están comercialmente disponibles para $i=3, 5, 6, 10$ o se pueden preparar a partir del acrilato de *terc*-butilo y del amino-PEG-alcohol correspondiente.

- 5 Los amino-PEG-alcoholes están comercialmente disponibles por ejemplo para $i=3, 4, 7, 8$ o se pueden preparar a partir de los dioles PEG, comercialmente disponibles para $i=3$ a 12, según el procedimiento descrito en el documento **US 7230101**. La protección de la función amina por la benzofenona se puede realizar por deshidratación azeotrópica en presencia de un ácido de Lewis como el eterato de BF_3 .

10

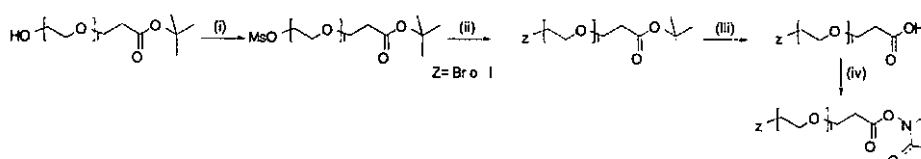


PL₁₂

Z= Br o I preparado según los esquemas que siguen:

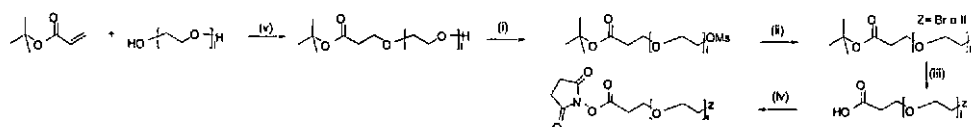
Caso en que $\text{ALK}=\text{CH}_2\text{CH}_2$

Ruta A:

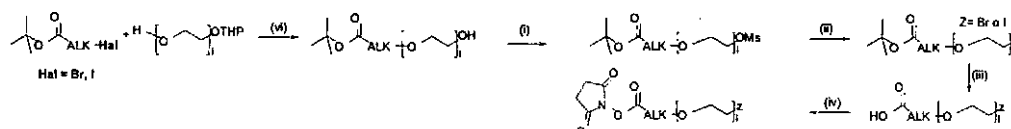


15

Ruta B:



Caso en que $\text{ALK} \neq \text{CH}_2\text{CH}_2$



Etapla (i): activación del alcohol bajo la forma de mesilato; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el DCM por tratamiento con el cloruro de mesilo en presencia de una base como la TEA.

Etapla (ii): intercambio mesilato / halógeno; la reacción se lleva a cabo a reflujo en un disolvente polar aprótico como la acetona con un halogenuro de sodio como el yoduro de sodio.

Etapla (iii): desprotección con ayuda de una solución de ácido clorhídrico (por ejemplo, solución en dioxano) o de ácido trifluoroacético.

Etapla (iv): activación del ácido; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el DCM por tratamiento con la NHS en presencia de un agente de acoplamiento como el DCC.

Etapla (v): elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF por tratamiento de un ácido insaturado protegido bajo la forma de

30

éster con el alcoholato generado por la acción de sodio en cantidad catalítica.

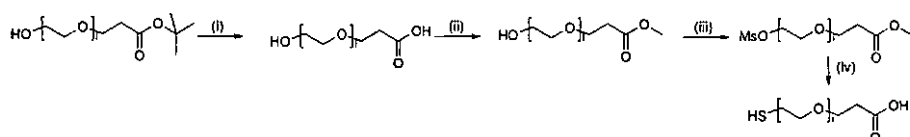
Etapla (vi): elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF o la DMF por tratamiento de un éster halogenado con el alcoholato del diol PEG monoprotegido en éter de tetrahidropirano (THP). La preparación de este tipo de diol PEG monoprotegido está bien descrita en la bibliografía, véase por ejemplo Richard A. et al. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 7315-7321 o Sakellariou E.G., et al. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9083-9090. El intermedio formado se hidroliza selectivamente a pH 5 en hidroxi éster.

Los alcoholes PEG que tienen una función ácido protegida bajo la forma de éster *terc*-butílico están comercialmente disponibles (como el 12-hidroxi-4,7,10-trioxadodecanoato de *terc*-butilo) o se preparan a partir del acrilato de *terc*-butilo y de un diol PEG. Los dioles PEG de partida están comercialmente disponibles para $i=3$ a 12.

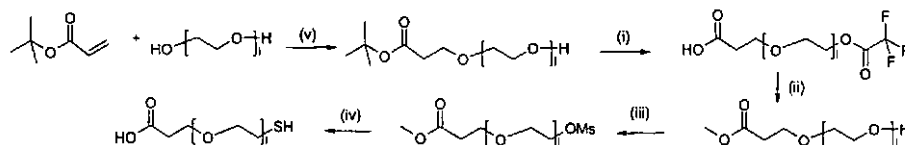
PL₁₃ $\text{RbZb-CO-ALK-(OCH}_2\text{CH}_2)_i\text{-SH}$ preparado según los esquemas que siguen:

Caso en que $\text{ALK}=\text{CH}_2\text{CH}_2$

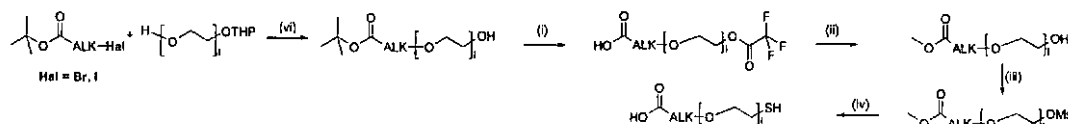
15 **Ruta A:**



Ruta B:



Caso en que $\text{ALK}\neq\text{CH}_2\text{CH}_2$



Etapla (i): desprotección con ayuda de una solución de ácido clorhídrico (por ejemplo, solución en dioxano) o de ácido trifluoroacético. En este último caso, se puede formar trifluoroacetato de la función hidroxi. Se escinde entonces de la etapa siguiente (ii).

Etapla (ii): protección del ácido carboxílico bajo la forma de éster metílico; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el metanol por tratamiento con el trimetilsilildiazometano.

Etapla (iii): activación del alcohol bajo la forma de mesilato; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el DCM por tratamiento con el cloruro de mesilo en presencia de una base como la TEA.

Etapla (iv): formación del tiol libre y saponificación del éster metílico; la reacción se lleva a cabo a reflujo en un disolvente polar prótico como una mezcla de etanol/agua en dos etapas sucesivas:

desplazamiento del mesilato por la tiourea y después hidrólisis *in situ* de la sal de isotiuronio por adición de una base como el hidróxido de sodio.

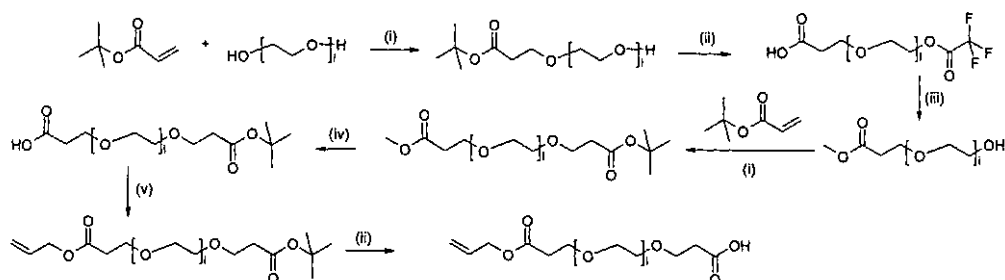
Etapla (v): elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF por tratamiento de un ácido insaturado protegido bajo la forma de éster con el alcoholato generado por la acción de sodio en cantidad catalítica.

Etapla (vi): elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF o la DMF por tratamiento de un éster halogenado con el alcoholato del diol PEG monoprotegido en éter de tetrahidropirano (THP). La preparación de este tipo de diol PEG monoprotegido está bien descrita en la bibliografía, véase por ejemplo Richard A. et al. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 7315-7321 o Sakellariou E.G., et al. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9083-9090.

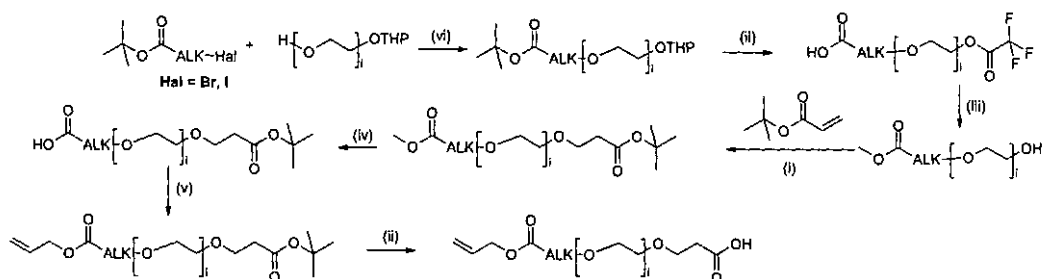
El conector con $n = 8$ (el ácido 3-[2-mercaptoetoxi-hepta-(etilenoxi)]propiónico) está disponible comercialmente. Los alcoholes PEG que tienen una función ácido protegida bajo la forma de éster *terc*-butilico están comercialmente disponibles (como el 12-hidroxi-4,7,10-trioxadodecanoato de *terc*-butilo) o se preparan a partir del acrilato de *terc*-butilo y de un diol PEG. Los dioles PEG de partida están comercialmente disponibles para $i=3$ a 12.

PL₁₄ $\text{RbZbOC-ALK(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_{i+1}\text{COOH}$ preparado según el esquema que sigue:

Caso en que $\text{ALK}=\text{CH}_2\text{CH}_2$



Caso en que $\text{ALK}\neq\text{CH}_2\text{CH}_2$



Etapla (i): elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF por tratamiento de un ácido insaturado protegido bajo la forma de éster con el alcoholato generado por la acción de sodio en cantidad catalítica.

Etapla (ii): desprotección con ayuda de una solución de ácido clorhídrico (por ejemplo, solución en dioxano) o de ácido trifluoroacético. En este último caso, se puede formar el trifluoroacetato

de la función alcohol eventualmente presente sobre la estructura. Este trifluoroacetato se escinde entonces en la etapa siguiente (iii).

Etapa (iii): protección del ácido carboxílico bajo la forma de éster metílico; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el metanol por tratamiento con el trimetilsilildiazometano.

Etapa (iv): saponificación del éster metílico; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en una mezcla de disolventes polares como una mezcla de THF/agua en presencia de litina.

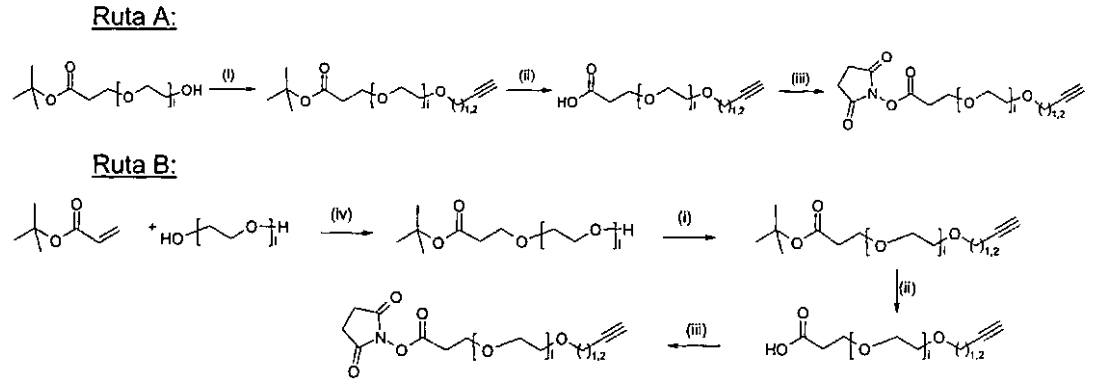
Etapa (v): protección del ácido carboxílico bajo la forma de éster alílico; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el DCM en presencia de alcohol alílico, de un agente de acoplamiento como el EDCI y de una base como la DMAP.

Etapa (vi): elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF o la DMF por tratamiento de un éster halogenado con el alcoholato del diol PEG monoprotegido en éter de tetrahidropirano (THP). La preparación de este tipo de diol PEG monoprotegido está bien descrita en la bibliografía, véase por ejemplo Richard A. et al.

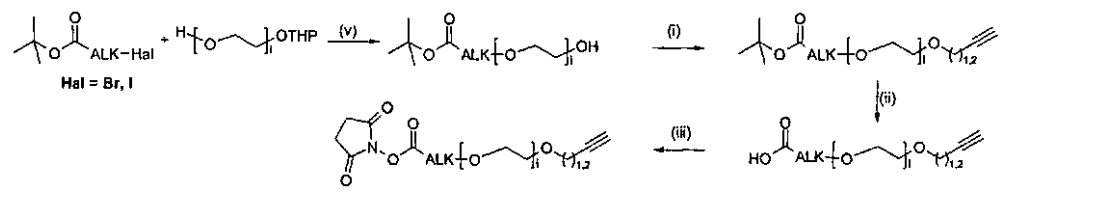
Chem. Eur. J. **2005**, *11*, 7315-7321 o Sakellariou E.G., et al. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9083-9090. Los dioles PEG de partida están comercialmente disponibles para i=3 a 12.

PL₁₅ $\text{RbZb-CO-ALK-(OCH}_2\text{CH}_2)_i\text{O-}$ preparado según los esquemas que siguen:

Caso en que ALK=CH₂CH₂



Caso en que ALK≠CH₂CH₂



Etapa (i): sustitución nucleófila; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF en presencia de una base como NaH y de un halogenuro de alquínilo como el bromuro de propargilo o el 4-bromo-1-butino. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 20, compuesto 63.

Etapla (ii): desprotección con ayuda de una solución de ácido clorhídrico (por ejemplo, solución en dioxano) o de ácido trifluoroacético. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 20, compuesto 65.

Etapla (iii): activación del ácido carboxílico bajo la forma de éster de NHS; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el DCM por tratamiento con la NHS en presencia de un agente de acoplamiento como el DCC sobre soporte.

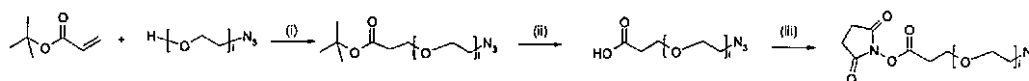
Etapla (iv): elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF por tratamiento de un ácido insaturado protegido bajo la forma de éster con el alcoholato generado por la acción de sodio en cantidad catalítica. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 20, compuesto 64.

Etapla (v): elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF o la DMF por tratamiento de un éster halogenado con el alcoholato del diol PEG monoprotegido en éter de tetrahidropirano (THP). La preparación de este tipo de diol PEG monoprotegido está bien descrita en la bibliografía, véase por ejemplo Richard A. et al. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 7315-7321 o Sakellariou E.G., et al. *Tetrahedron* **2003**, 59, 9083-9090.

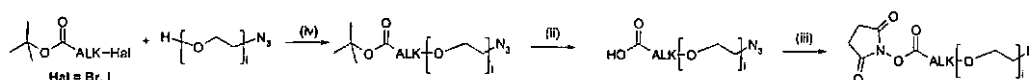
Los alcoholes PEG que tienen una función ácido protegida bajo la forma de éster *terc*-butilico están comercialmente disponibles (como el 12-hidroxi-4,7,10-trioxadodecanoato de *terc*-butilo) o se preparan a partir del acrilato de *terc*-butilo y de un diol PEG. Los dioles PEG de partida están comercialmente disponibles para $i=3$ a 12.

PL₁₆ $\text{RbZbOC-ALK-(OCH}_2\text{CH}_2)_i\text{-N}_3$ preparado según los esquemas que siguen

Caso en que $\text{ALK}=\text{CH}_2\text{CH}_2$



Caso en que $\text{ALK} \neq \text{CH}_2\text{CH}_2$



Etapla (i): elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF por tratamiento de un ácido insaturado protegido bajo la forma de éster con el alcoholato generado por la acción de sodio en cantidad catalítica.

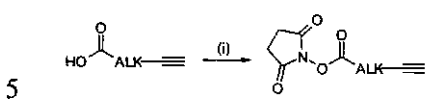
Etapla (ii): desprotección con ayuda de una solución de ácido clorhídrico (por ejemplo, solución en dioxano) o de ácido trifluoroacético.

Etapla (iii): activación del ácido carboxílico bajo la forma de éster de NHS; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el DCM por tratamiento con la NHS en presencia de un agente de acoplamiento como el DCC sobre soporte.

Etapla (iv): elongación de la cadena de hidroxí azido PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF o la DMF por tratamiento de un éster halogenado con el alcoholato del hidroxí azido PEG.

Los alcoholes azido PEG están comercialmente disponibles o se pueden preparar a partir de los dioles PEG correspondientes comercialmente disponibles para i=3 a 12.

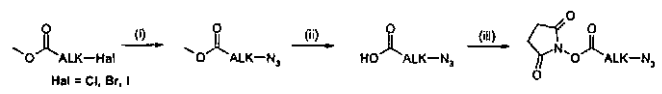
PL₁₇ RbZb-CO-ALK- preparado según el esquema que sigue:



Etapla (i): activación del ácido carboxílico bajo la forma de éster de NHS; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el DCM por tratamiento con la NHS en presencia de un agente de acoplamiento como el DCC sobre soporte.

10 Los ácidos portadores de un grupo acetilénico están comercialmente disponibles para ALK=-(CH₂)_m- con m=1 a 10 (como el ácido 3-butinoico).

PL₁₈ RbZb-CO-ALK-N₃ preparado según el esquema que sigue:



15 Etapla (i): sustitución nucleófila del halogenuro por la azida; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico como la acetona en presencia de azida de sodio.

Etapla (ii): saponificación del éster metílico; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en una mezcla de disolventes polares como una mezcla de THF/agua en presencia de litina.

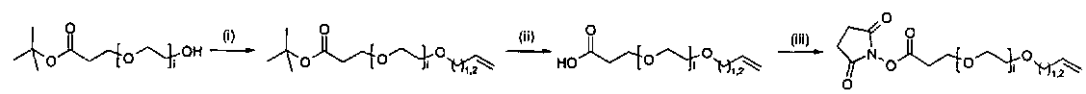
20 Etapla (iii): activación del ácido carboxílico bajo la forma de éster de NHS; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el DCM por tratamiento con la NHS en presencia de un agente de acoplamiento como el DCC sobre soporte.

Los ésteres metílicos portadores de un motivo halogenoalquilo están comercialmente disponibles para ALK = -(CH₂)_m- con m=1 a 6 (como el bromoacetato de metilo).

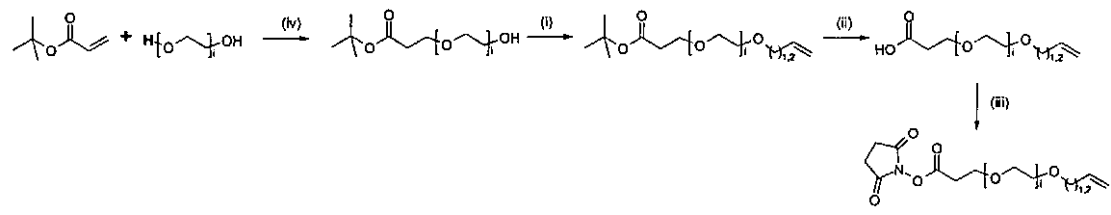
PL₁₉ RbZb-CO-ALK-(OCH₂CH₂)_iO- preparado según los esquemas que siguen:

25 Caso en que ALK=CH₂CH₂

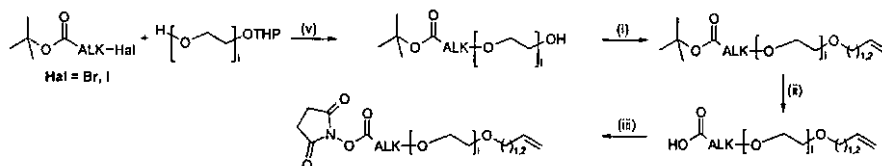
Ruta A:



Ruta B:



Caso en que $ALK \neq CH_2CH_2$



Etapla (i): sustitución nucleófila; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF en presencia de una base como NaH y de un halogenuro de alqueno como el bromuro de alilo o el 4-bromo-1-buteno.

Etapla (ii): desprotección con ayuda de una solución de ácido clorhídrico (por ejemplo, solución en dioxano) o de ácido trifluoroacético.

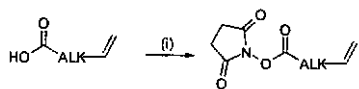
Etapla (iii): activación del ácido carboxílico bajo la forma de éster de NHS; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el DCM por tratamiento con la NHS en presencia de un agente de acoplamiento como el DCC sobre soporte.

Etapla (iv): elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF por tratamiento de un ácido insaturado protegido bajo la forma de éster con el alcoholato generado por la acción de sodio en cantidad catalítica.

Etapla (v): elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF o la DMF por tratamiento de un éster halogenado con el alcoholato del diol PEG monoprotegido en éter de tetrahidropirano (THP). La preparación de este tipo de diol PEG monoprotegido está bien descrita en la bibliografía, véase por ejemplo Richard A. et al. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 7315-7321 o Sakellariou E.G., et al. *Tetrahedron* **2003**, 59, 9083-9090.

Los alcoholes PEG que tienen una función ácido protegida bajo la forma de éster *tert*-butilico están comercialmente disponibles (como el 12-hidroxi-4,7,10-trioxadodecanoato de *tert*-butilo) o se preparan a partir del acrilato de *tert*-butilo y de un diol PEG. Los dioles PEG de partida están comercialmente disponibles para $i=3$ a 12.

PL₂₀ $RbZn-OC-ALK-CH=CH_2$ preparado según el esquema que sigue:

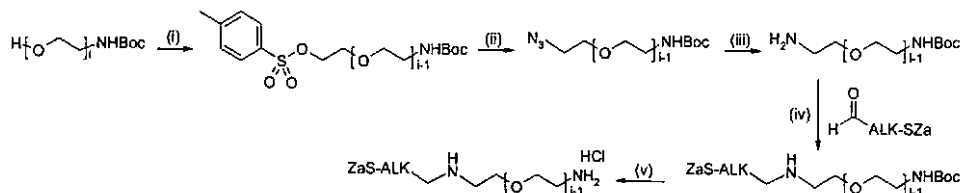


Etapla (i): activación del ácido carboxílico bajo la forma de éster de NHS; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el DCM por tratamiento con la NHS en presencia de un agente de acoplamiento como el DCC sobre soporte.

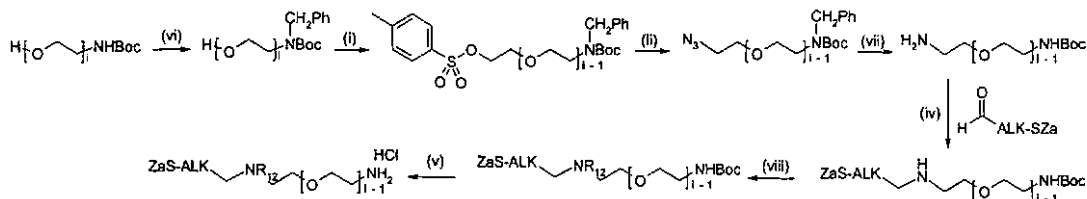
Los ácidos portadores de un grupo etilénico están comercialmente disponibles para $ALK = (CH_2)_m-$ con $m=1$ a 10 (como el ácido 3-butenico).

PL₂₁ $ZnS-ALK-CH_2-NR_{12}-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-NHR'_{12}$ preparado según los esquemas que siguen:

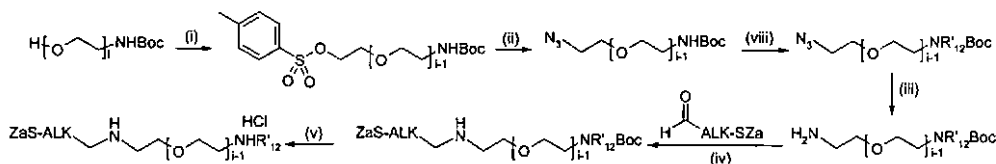
Caso en que R_{12} et $R'_{12}=H$



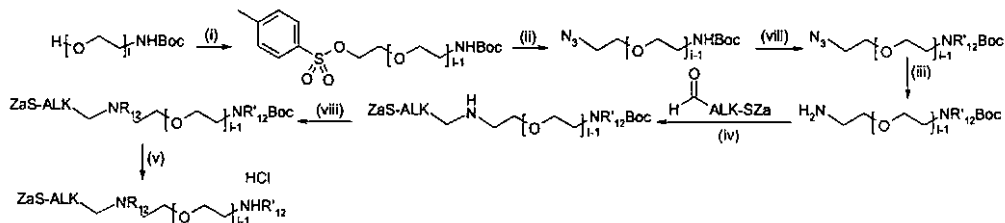
Caso en que $R_{12}\neq H$ et $R'_{12}=H$



5 Caso en que $R_{12}=H$ et $R'_{12}\neq H$



Caso en que R_{12} et $R'_{12}\neq H$



- 10 Etapas (i): activación del alcohol bajo la forma de tosilato; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico como el DCM por tratamiento con el cloruro de tosilato en presencia de óxido de plata y de yoduro de potasio. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 6, compuesto 23.

- 15 Etapas (ii): sustitución nucleófila del tosilato; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico como el acetonitrilo por tratamiento con la azida de sodio. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 6, compuesto 24.

Etapas (iii): reducción de la azida; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar como una mezcla de THF/agua en presencia de trifenilfosfina. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 6, compuesto 26.

- 20 Etapas (iv): aminación reductora con un aldehído; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico anhidro como el DCM en presencia de un agente reductor como el triacetoxiborohidruro de sodio y si es necesario de ácido acético como catalizador. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 6, compuesto 27.

Etapla (v): desprotección con ayuda de una solución de ácido clorhídrico (por ejemplo, solución en dioxano) o de ácido trifluoroacético. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 6, compuesto 29.

- 5 Etapla (vi): protección de la función NHBoc; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico como el THF o la DMF por tratamiento con 1 equivalente de base como el hidruro de sodio seguido por un halogenuro de bencilo como el cloruro de bencilo.

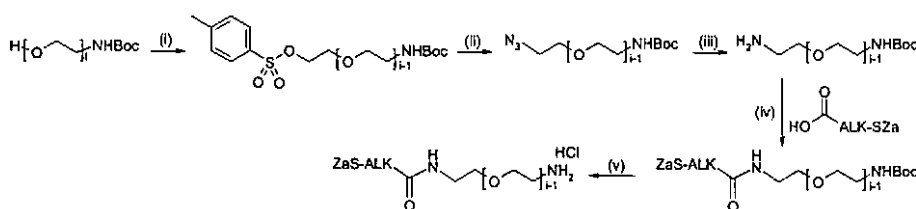
Etapla (vii): escisión del grupo bencilo y reducción de la función azido; la reacción se lleva a cabo en un disolvente prótico como el metanol mediante el hidrógeno en presencia de un catalizador como el hidróxido de paladio.

- 10 Etapla (viii): alquilación de la amina; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF por tratamiento con una base como el hidruro de sodio en presencia de un reactivo portador de un grupo nucleófilo como un halogenuro de alquilo. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 6, compuesto 25.

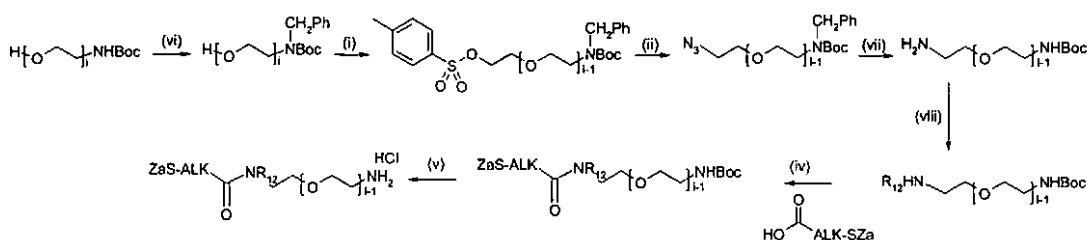
- 15 Los amino-PEG-alcoholes protegidos o no por un grupo Boc sobre la función amina están comercialmente disponibles (como el N-Boc-aminoetoxi-etoxi-etanol o el 1-amino-3,6,9-trioxaundecanil-11-ol) o se pueden preparar a partir de los dioles PEG, comercialmente disponibles para $i=3$ a 12, según el procedimiento descrito en el documento **US 7230101**. El aldehído ZaSS-ALK-CHO, por ejemplo el 2-metil-2-(metilditio)-propanal, es comercial o se puede preparar por oxidación de un alcohol portador de un motivo disulfuro obtenido a partir de un
- 20 alcohol halogenado convenientemente protegido (por ejemplo bajo la forma de éter sililado) por tratamientos sucesivos con el tioacetato de potasio y un derivado de tipo metanotiosulfonato.

PL₂₂ $\text{ZaS-ALK} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{NR}_{12}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_i-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NHR}'_{12} \end{array}$ preparado según los esquemas que siguen:

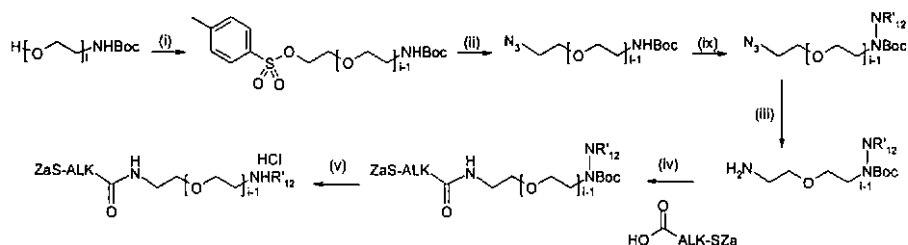
Caso en que R_{12} y $R'_{12}=\text{H}$



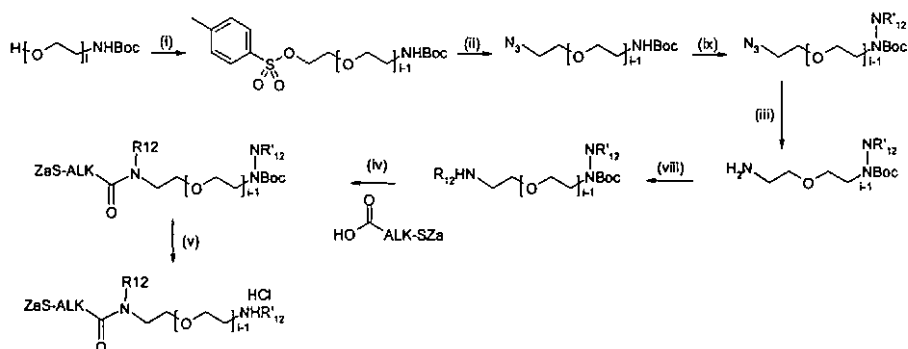
Caso en que $R_{12} \neq \text{H}$ y $R'_{12}=\text{H}$



Caso en que $R_{12}=H$ y $R'_{12}\neq H$



Caso en que R_{12} y $R'_{12}\neq H$



- 5 Etapa (i): activación del alcohol bajo la forma de tosilato; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico como el DCM por tratamiento con el cloruro de tosilo en presencia de óxido de plata y de yoduro de potasio. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 6, compuesto 23.
- 10 Etapa (ii): sustitución nucleófila del tosilato; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico como el acetonitrilo por tratamiento con la azida de sodio. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 6, compuesto 24.
- 15 Etapa (iii): reducción de la azida; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar como una mezcla de THF/agua en presencia de trietilfosfina. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 6, compuesto 26.
- 20 Etapa (iv): acoplamiento peptídico; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico como la dimetilformamida en presencia de agentes de acoplamiento como el sistema N,N'-diisopropilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol y de una base como la TEA.
Etapa (v): desprotección con ayuda de una solución de ácido clorhídrico (por ejemplo, solución en dioxano) o de ácido trifluoroacético. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 7, compuesto 32.
- 25 Etapa (vi): protección de la función NHBoc; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico como el THF o la DMF por tratamiento con 1 equivalente de base como el hidruro de sodio seguido por un halogenuro de bencilo como el cloruro de bencilo.
Etapa (vii): escisión del grupo bencilo y reducción de la función azido; la reacción se lleva a cabo en un disolvente prótico como el metanol mediante el hidrógeno en presencia de un catalizador como el hidróxido de paladio.

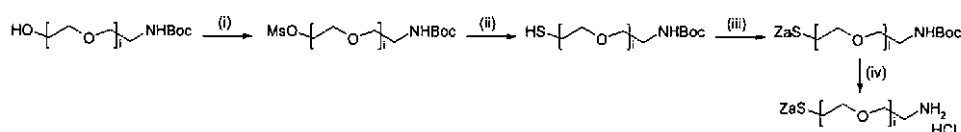
Etapa (viii): alquilación de la amina por aminación reductora con un aldehído; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico anhidro como el DCM en presencia de un agente reductor como el triacetoxiborohidruro de sodio y si es necesario de ácido acético como catalizador.

- 5 Etapa (ix): alquilación del grupo NHBoc; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF por tratamiento con una base como el hidruro de sodio en presencia de un reactivo portador de un grupo nucleóforo como un halogenuro de alquilo. Se podrán seguir las condiciones del ejemplo 6, compuesto 25.

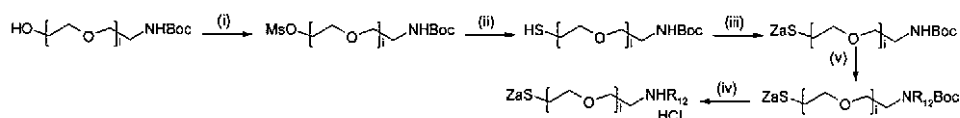
- 10 Los amino-PEG-alcoholes protegidos o no por un grupo Boc sobre la función amina están comercialmente disponibles (como el N-Boc-aminoetoxi-etoxi-etanol o el 1-amino-3,6,9-trioxaundecanil-11-ol) o se pueden preparar a partir de los dioles PEG, comercialmente disponibles para $i=3$ a 12, según el procedimiento descrito en el documento **US 7230101**. El ácido carboxílico $ZaS-ALK-CO_2H$, por ejemplo el ácido 4-metil-4-(metilditio)-pentanoico, puede ser comercial o se puede preparar a partir de un ácido carboxílico halogenado por tratamientos sucesivos con el tioacetato de potasio y un derivado de tipo metanotiosulfonato.

PL₂₃ $ZaS-(CH_2CH_2O)_i-CH_2CH_2-NHR_{12}$ preparado según los esquemas que siguen

Caso en que $R_{12}=H$



- 20 Caso en que $R_{12} \neq H$



Etapa (i): activación del alcohol bajo la forma de mesilato; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el DCM por tratamiento con el cloruro de mesilo en presencia de una base como la TEA.

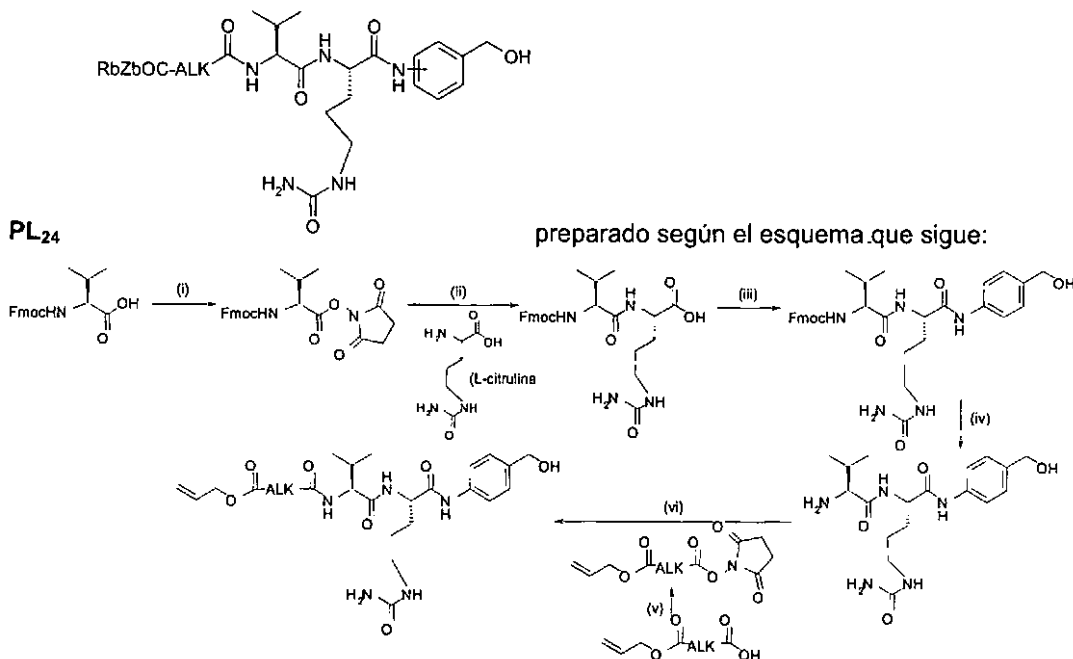
- 25 Etapa (ii): formación del tiol libre; la reacción se lleva a cabo a reflujo en un disolvente polar aprótico como una mezcla de etanol/agua en dos etapas sucesivas: desplazamiento del mesilato por la tiourea y después hidrólisis *in situ* de la sal de isotiuronio por adición de una base como el hidróxido de sodio.

- 30 Etapa (iii): protección del tiol; la reacción se lleva a cabo en una mezcla de disolventes polares como una mezcla de etanol/agua con un reactivo que comprende una función metanotiosulfonato como el metil-metanotiosulfonato en presencia de una base como el carbonato de sodio.

Etapa (iv): desprotección con ayuda de una solución de ácido clorhídrico (por ejemplo, solución en dioxano) o de ácido trifluoroacético.

Etapla (v): alquilación de la amina; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF por tratamiento con una base como el hidruro de sodio en presencia de un reactivo portador de un grupo nucleófilo como un halogenuro de alquilo.

- Los amino-PEG-alcoholes protegidos o no por un grupo Boc sobre la función amina están comercialmente disponibles (como el N-Boc-aminoetoxi-etoxi-etanol o el 1-amino-3,6,9-trioxaundecanil-11-ol) o se pueden preparar a partir de los dioles PEG, comercialmente disponibles para $i=3$ a 12, según el procedimiento descrito en el documento **US 7230101**.



- Etapla (i):** activación de la Fmoc-L-valina bajo la forma de éster de NHS; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF por tratamiento con la NHS en presencia de un agente de acoplamiento como el DCC.

- Etapla (ii):** acoplamiento peptídico entre la Fmoc-L-valina-NHS y la L-citrulina; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar como una mezcla de dimetoxietano/THF/agua en presencia de una base como el bicarbonato de sodio.

Etapla (iii): acoplamiento peptídico con el alcohol 4-aminobencílico; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar como una mezcla de DCM/metanol en presencia de un agente de acoplamiento como la EEDQ.

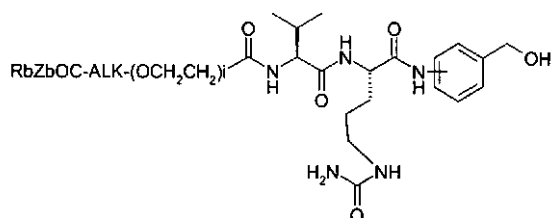
- Etapla (iv):** desprotección de la amina Fmoc; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar como una mezcla de DCM/metanol en presencia de una base como la dietilamina.

Etapla (v): activación del ácido carboxílico bajo la forma de éster de NHS; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico como el DCM por tratamiento con la NHS en presencia de un agente de acoplamiento como el hidrocloreuro de EDCI.

- Etapla (vi):** acoplamiento peptídico entre el dipéptido y el éster de NHS; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como una mezcla de

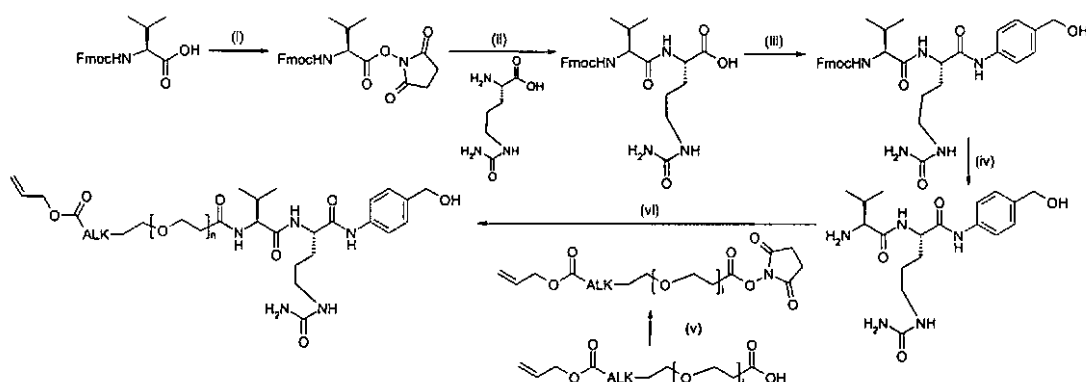
DCM/acetonitrilo.

Los diácidos monoprottegidos bajo la forma de éster alílico están comercialmente disponibles para $n=2$ (succinato de monoalilo) o se pueden preparar por transesterificación de los monoésteres metílicos o *terc*-butílicos que están comercialmente disponibles para $n = 2$ a 6.



5 **PL₂₅**

preparado según el esquema que sigue:



Etapla (i): activación de la Fmoc-L-valina bajo la forma de éster de NHS; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF por tratamiento con la NHS en presencia de un agente de acoplamiento como el DCC.

10 **Etapla (ii):** acoplamiento peptídico entre la Fmoc-L-valina-NHS y la L-citrulina; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar como una mezcla de DME/THF/agua en presencia de una base como el bicarbonato de sodio.

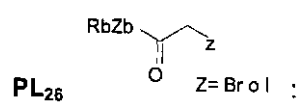
15 **Etapla (iii):** acoplamiento peptídico con el alcohol 4-aminobencílico; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar como una mezcla de DCM/metanol en presencia de un agente de acoplamiento como la EEDQ.

Etapla (iv): desprotección de la amina Fmoc; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar como una mezcla de DCM/metanol en presencia de una base como la dietilamina.

20 **Etapla (v):** activación del ácido carboxílico bajo la forma de éster de NHS; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como el DCM por tratamiento con la NHS en presencia de un agente de acoplamiento como el DCC sobre soporte.

Etapla (vi): acoplamiento peptídico entre el dipéptido y el éster de NHS; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico como una mezcla de DCM/acetonitrilo.

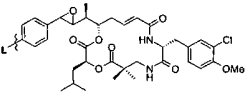
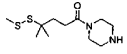
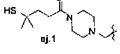
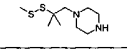
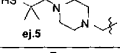
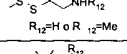
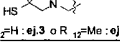
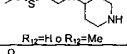
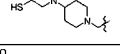
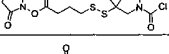
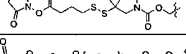
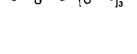
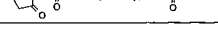
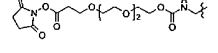
25 Los diácidos PEG monoprottegidos bajo la forma alilo se preparan según la descripción de preparación del conector L₁₄.

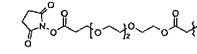
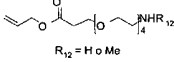
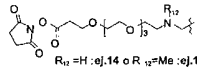
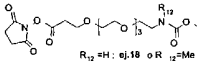
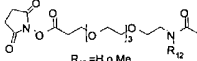


PL₂₆

El bromoacetato y el yodoacetato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo son productos comerciales cuyos números CAS son respectivamente 42014-51-7 y 39028-27-8.

Tabla II

Precusores de conectores		G	Reacciones ¹	Derivados de criptoficina de la fórmula (II) ^{2, 5}		
PL	ejemplos de PL			L	Familia de conectores derivada del precursor PL	
PL ₁		-(CH ₂) _n Cl	sustitución nucleófila [para Z _n =H, suplementaria reducción] etapa de	L ₁	$ZnS-ALK-\overset{O}{\parallel}N(CH_2)_n-\text{polymer}$	
PL ₂		-(CH ₂) _n Cl		L ₂	$ZnS-ALK-N(CH_2)_n-\text{polymer}$	
PL ₃		-(CH ₂) _n Cl		L ₃	$ZnS-ALK-N^{R_{12}}(CH_2)_n-\text{polymer}$	
PL ₄		-(CH ₂) _n Cl		L ₄	$ZnS-ALK-N^{R_{12}}(CH_2)_n-\text{polymer}$	
PL ₅		-(CH ₂) _n OH	acilación	L ₅	$RbZb-CO-ALK-SS-ALK-N^{R_{12}}O-(CH_2)_n-\text{polymer}$	
PL ₆		-(CH ₂) _n OH	activación, acoplamiento, [transformación eventual de un Z _n R ₆ en otro Z _n R ₆ , por ejemplo, para  Z _n R ₆ =desprotección, activación por NHS)	L _{6a}	$RbZb-CO-ALK-(OCH_2CH_2)_n-O-CO-O-(CH_2)_n-\text{polymer}$	
		-(CH ₂) _n NH ₂		L _{6b}	$RbZb-CO-ALK-(OCH_2CH_2)_n-O-CO-N^{R_{12}}(CH_2)_n-\text{polymer}$	

		$-(CH_2)_nCO_2H$	esterificación, [transformación eventual de un Z_6R_6 en otro Z_6R_6 , por ejemplo, para  Z_6R_6 = desprotección, activación por NHS]	L6c	$RbZb-CO-ALK-(OCH_2CH_2)_j-O-C(=O)(CH_2)_n-\text{polímero}$	 4
PL7	 $R_{12} = H \text{ o } Me$	$-(CH_2)_nCl$	sustitución nucleófila, [transformación eventual de un Z_6R_6 en otro Z_6R_6 , por ejemplo, para  Z_6R_6 = desprotección, activación por NHS]	L7a	$RbZb-CO-ALK-(OCH_2CH_2)_j-N^{R_{12}}(CH_2)_n-\text{polímero}$	 $R_{12} = H : ej. 14 \text{ o } R_{12} = Me : ej. 15$
		$-(CH_2)_nOH$	activación, acoplamiento, [transformación eventual de un Z_6R_6 en otro Z_6R_6 , por ejemplo, para  Z_6R_6 = desprotección, activación por NHS]	L7b	$RbZb-CO-ALK-(OCH_2CH_2)_j-N^{R_{12}}C(=O)O-C(=O)(CH_2)_n-\text{polímero}$	 $R_{12} = H : ej. 18 \text{ o } R_{12} = Me$
		$-(CH_2)_nCO_2H$	amidificación, [transformación eventual de un Z_6R_6 en otro Z_6R_6 , por ejemplo, para  Z_6R_6 = desprotección, activación por NHS]	L7c	$RbZb-CO-ALK-(OCH_2CH_2)_j-N^{R_{12}}C(=O)(CH_2)_n-\text{polímero}$	 $R_{12} = H \text{ o } Me$

PL ₈		-(CH ₂) _n Cl	sustitución nucleófila, transformación eventual de un Z ₄ R ₆ en otro Z ₄ R ₆ , por ejemplo, para	L ₈	RbZb-CO-ALK-(OCH ₂ CH ₂) _n N(CH ₂) _n -(CH ₂) _n -Z	
PL ₉		-(CH ₂) _n Cl		L ₉	RbZb-CO-ALK-N(CH ₂) _n -(CH ₂) _n -Z	
PL ₁₀		-(CH ₂) _n Cl		L ₁₀	RbZb-CO-ALK-N(CH ₂) _n -(CH ₂) _n -Z	
PL ₁₁			sustitución nucleófila	L ₁₁	RbZb-CO-ALK-(OCH ₂ CH ₂) _n N(R ₁₂)C(=O)S(CH ₂) _n -Z	
PL ₁₂			sustitución nucleófila	L ₁₂	RbZb-CO-ALK-(OCH ₂ CH ₂) _n S(CH ₂) _n -Z	
PL ₁₃		-(CH ₂) _n Cl	sustitución nucleófila	L ₁₃	RbZb-CO-ALK-(OCH ₂ CH ₂) _n S(CH ₂) _n -Z	
PL ₁₄		(CH ₂) _n NH ₂	amidificación, desprotección, activación	L _{14a}	RbZb-CO-ALK-(OCH ₂ CH ₂) _n N(R ₁₂)C(=O)N(CH ₂) _n -Z	
		-(CH ₂) _n OH	esterificación, desprotección, activación	L _{14b}	RbZb-CO-ALK-(OCH ₂ CH ₂) _n OC(=O)N(CH ₂) _n -Z	
PL ₁₅		-(CH ₂) _n N ₃	cicloadición	L ₁₅	RbZb-CO-ALK-(OCH ₂ CH ₂) _n OC(=O)N(CH ₂) _n N=N-N(CH ₂) _n -Z	

PL ₁₆		$(\text{CH}_2)_n\text{NR}_{12}$ $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$	cicloaddición	L ₁₆	$\text{RbZb-CO-ALK-(OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-N=N-CH=CH-NR}_{12}\text{-N(CH}_2\text{)}_n\text{-}$	
PL ₁₇	 o ácido 5-hexinoico	$(\text{CH}_2)_n\text{N}_3$	cicloaddición	L ₁₇	$\text{RbZb-CO-ALK-N=N-CH=CH-N(CH}_2\text{)}_n\text{-}$	 ej.19
PL ₁₈		$(\text{CH}_2)_n\text{NR}_{12}$ $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$	cicloaddición	L ₁₈	$\text{RbZb-CO-ALK-N=N-CH=CH-NR}_{12}\text{-N(CH}_2\text{)}_n\text{-}$	 $\text{R}_{12}=\text{Me}$: ej.21
PL ₁₉		$-\text{CH}=\text{CH}_2$	metátesis	L ₁₉	$\text{RbZb-CO-ALK-(OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH=CH-}$	
PL ₂₀		$-\text{CH}=\text{CH}_2$	metátesis	L ₂₀	$\text{RbZb-CO-ALK-CH=CH-}$	
PL ₂₁	 $\text{R}'_{12}=\text{H o Me}$ $i=3$	$(\text{CH}_2)_n\text{Cl}$	sustitución nucleófila [para $\text{Z}_n=\text{H}$, etapa suplementaria de reducción]	L ₂₁	$\text{ZaS-ALK-CH}_2\text{-N(CH}_2\text{)}_n\text{-N(CH}_2\text{)}_n\text{-}$	 $\text{R}_{12}=\text{H o R}'_{12}=\text{Me}$: ej.6
PL ₂₂	 $\text{R}'_{12}=\text{H o Me}$ $i=3$	$(\text{CH}_2)_n\text{Cl}$		L ₂₂	$\text{ZaS-ALK-N(CH}_2\text{)}_n\text{-N(CH}_2\text{)}_n\text{-}$	 $\text{R}_{12}=\text{H o R}'_{12}=\text{Me}$: ej.7
PL ₂₃	 $\text{R}_{12}=\text{H o Me}$	$(\text{CH}_2)_n\text{Cl}$		L ₂₃	$\text{ZaS-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-N(CH}_2\text{)}_n\text{-}$	 $\text{R}_{12}=\text{H o Me}$
PL ₂₄		$(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$	activación, acoplamiento, desprotección, activación	L ₂₄		

PL₂₅		$(CH_2)_nNH_2$	activación, acoplamiento, desprotección, activación
PL₂₆		$HS-(CH_2)_n-$	sustitución nucleófila
L₂₅			
L₂₆			

¹ para más detalles, véase también la parte « ejemplos de reacciones » anterior.
² los ejemplos se dan para un derivado de criptoficina particular, pero se pueden aplicar a todo derivado de criptoficina de la fórmula (II), especialmente D₁-D₈.

³ $\text{---S---(CH}_2\text{)}_n\text{---}$ corresponde a una estructura de conector escindible de disulfuro elegido entre los conectores L₁ a L₄ o L₂₁ a L₂₃.
⁴ **R**₁₂ y **R**'₁₂: H o grupo alquilo(C₁-C₈), por ejemplo, metilo; n: número entero que va de 1 a 6; i: número entero que va de 1 a 20, más particularmente de 1 a 10, más particularmente de 1 a 8, o de 1 a 6 y aún más particularmente de 2 a 5. i puede tomar cada uno de los valores de estos intervalos, especialmente valor 2, 3, 4 o 5.

⁵ en la **Tabla II**, L se da aquí en posición para, pero es posible obtener compuestos con L en orto o en meta de forma similar.

Procedimiento de preparación del conjugado

El conjugado se obtiene por el procedimiento que consiste en:

- (i) poner en contacto y dejar reaccionar una solución acuosa del agente de selección de la diana eventualmente tamponada y una solución del derivado de criptoficina de la fórmula (II);
- 5 (ii) separar después opcionalmente el conjugado formado en la etapa (i) del derivado de criptoficina y/o del agente de selección de la diana que no haya reaccionado y/o de los agregados que se hayan formado.

- 10 Más particularmente, no se separa en la etapa (ii) el conjugado de la etapa (i) del derivado de criptoficina que no haya reaccionado ni de los agregados que se hayan formado y se deja en la solución el agente de selección de la diana que eventualmente no haya reaccionado.

- 15 La puesta en contacto tiene por función dejar reaccionar los grupos químicos GCR1 y GCR2 con el fin de asegurar la unión del derivado de criptoficina sobre el agente de selección de la diana mediante formación de un enlace covalente; con preferencia,

- cuando GCR1 representa $-SZ_a$: se modifica el agente de selección de la diana con ayuda de un agente de modificación de forma que se introduzcan sobre el agente de selección de la diana los grupos GCR2 adaptados, especialmente los descritos en la segunda columna de la **Tabla I**:
 - 20 ○ grupos químicos disulfuros en el caso en que GCR1 representa $-SH$;
 - grupos químicos tiol en el caso en que GCR1 representa $-SZ_a$ con $Z_a \neq H$;
 - grupos químicos maleimido o yodoacetamido en el caso en que GCR1 representa $-SH$;

- 25 En el caso de un anticuerpo (MAb), se encuentran las fórmulas de los conjugados en la cuarta columna de la Tabla I;

- cuando GCR1 representa $-C(=O)-Z_bR_b$: la reacción tiene lugar preferiblemente sobre las funciones amino del agente de selección de la diana, especialmente los grupos ϵ -amino portados por las cadenas laterales de los residuos de lisina (Lys) de un anticuerpo. En el caso de un anticuerpo (MAb), se obtiene en este caso un conjugado de la fórmula: MAb-
 30 $[NH-C(=O)-L^*-cripto]_d$ con L^* = fragmento de un conector L que comprende $GCR1=-C(=O)-Z_bR_b$ y tal como $L=-L^*C(=O)-Z_bR_b$;
- en presencia de un derivado de criptoficina de la fórmula (III) con $G=-(CH_2)_nY$, el agente de selección de la diana comprende grupos $-SH$ cuando $Y=-Cl$, grupos $-C\equiv CH$ cuando $Y=-N_3$ o grupos ácido carboxílico cuando $Y=-OH$ o $-NH_2$;
- 35 ▪ en presencia de un derivado de criptoficina que comprende un grupo químico reactivo GCR1 de tipo maleimido o haloacetamido, el agente de selección de la diana comprende grupos químicos tioles.

Se entiende por « agregados » las asociaciones que se pueden formar entre dos agentes de selección de la diana o más, habiendo sido o no modificados los agentes de selección de la diana por conjugación. Los agregados son susceptibles de formarse bajo la influencia de un gran número de parámetros tales como una concentración elevada de agente de selección de la diana en la solución, el pH de la solución, fuerzas de cizallamiento elevadas, el número de dímeros injertados y su carácter hidrófobo, la temperatura (véase las referencias citadas en la introducción de *J. Membrane Sci.* **2008**, 318, 311–316), no habiéndose aclarado a veces con precisión la influencia de algunos de ellos. En el caso de las proteínas o de los anticuerpos, se puede referir a *AAPS Journal*, « Protein Aggregation and Bioprocessing » **2006**, 8(3), E572-E579. El contenido en agregados se puede determinar con ayuda de técnicas conocidas tales como la SEC (véase a este propósito, *Analytical Biochemistry* **1993**, 212 (2), 469–480).

La solución acuosa del agente de selección de la diana puede ser tamponada por ejemplo con ayuda de tampones tales como por ejemplo el fosfato de potasio o el ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico (tampón HEPES) o una mezcla de tampones tal como el tampón A descrito más adelante. El tampón depende de la naturaleza del agente de selección de la diana. El derivado de criptoficina se disuelve en un disolvente orgánico polar, por ejemplo el DMSO o la DMA.

La reacción tiene lugar a una temperatura comprendida generalmente entre 20 y 40 °C. La duración de la reacción puede variar entre 1 a 24 h. La reacción entre el anticuerpo y el derivado de criptoficina puede ser seguida por SEC con un detector refractométrico y/o ultravioleta con el fin de determinar el progreso. Si la tasa de sustitución es insuficiente, se puede dejar reaccionar durante un tiempo más largo y/o añadir el derivado de criptoficina. Se puede referir al método general dado en la parte de los ejemplos para más detalles sobre las condiciones particulares. Modos particulares están descritos en los ejemplos 9, 10, 11, 25, 26 o 27.

Los expertos en la técnica disponen de diferentes métodos cromatográficos para la separación de la etapa (ii): el conjugado puede ser purificado por ejemplo por cromatografía de exclusión estérica (SEC), por cromatografía de adsorción (como la de intercambio de iones, IEC), por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), por cromatografía de afinidad, por cromatografía sobre soportes mixtos como la hidroxiapatita cerámica o por HPLC. Se puede utilizar igualmente la purificación por diálisis o diafiltración.

Después de la etapa (i) o (ii), la solución del conjugado puede sufrir una etapa (iii) de ultrafiltración y/o de diafiltración. Se obtiene así como resultado de estas etapas el conjugado en solución acuosa.

Anticuerpo

El anticuerpo (véase a este propósito, Janeway et al. « Immunobiology », 5^{ème} édition, 2001, Garland Publishing, New York) se podrá elegir entre los descritos especialmente en los documentos **WO 04043344**, **WO 08010101**, **WO 08047242**, **WO 05009369** (anti CA6) o **WO 2010014812**. El anticuerpo puede ser eventualmente modificado con ayuda de un agente de modificación con el fin de favorecer la unión del derivado de criptoficina (véase anteriormente). El anticuerpo puede ser especialmente monoclonal, policlonal o multiespecífico. Se puede tratar también de un fragmento de anticuerpo. Se puede tratar también de un anticuerpo murino, humano, humanizado o quimérico.

Conjugado

Un conjugado comprende generalmente del orden de 1 a 10 derivados de criptoficina unidos de forma covalente al agente de selección de la diana (se trata de la tasa de injertos o "relación fármaco-a-anticuerpo" o "DAR" en inglés). Este número varía en función de la naturaleza del agente de selección de la diana y del derivado de criptoficina así como de las condiciones de trabajo utilizadas en el procedimiento de conjugación (por ejemplo número de equivalentes de derivado de criptoficina con respecto al agente de selección de la diana, tiempo de reacción, naturaleza del disolvente y del eventual codisolvente). La puesta en contacto del agente de selección de la diana y del derivado de criptoficina lleva a una mezcla que comprende varios conjugados que se distinguen individualmente unos de otros por DAR diferentes; eventualmente el agente de selección de la diana que no haya reaccionado; eventualmente los agregados. La DAR que se determina sobre la solución final corresponde por tanto a una DAR media.

En el caso en que el agente de selección de la diana sea un anticuerpo, la espectroscopía UV puede ser un método utilizado para determinar la DAR. Este método se inspira en el presentado en Antony S. Dimitrov (ed), LLC, 2009, « Therapeutic Antibodies and Protocols », vol. 525, 445, Springer Science. Consiste en medir la absorbancia de una solución de conjugado después de la etapa de separación (ii) a dos longitudes de onda denominadas λ_1 y λ_2 . Se utilizan los coeficientes de extinción molares siguientes del anticuerpo desnudo y del derivado de criptoficina medidos previamente a la conjugación.

Las absorbancias de la solución de conjugado a λ_1 et λ_2 (A_{λ_1}) y (A_{λ_2}) se miden sobre el pico correspondiente del espectro SEC (esto permite calcular una "DAR(SEC)") o utilizando un espectrofotómetro UV clásico (esto permite calcular una "DAR(UV)"). Las absorbancias se pueden expresar bajo la forma:

$$A_{\lambda_1} = (C_D \times \epsilon_{D \lambda_1}) + (C_A \times \epsilon_{A \lambda_1})$$

$$A_{\lambda_2} = (C_D \times \epsilon_{D \lambda_2}) + (C_A \times \epsilon_{A \lambda_2})$$

ecuaciones para las que:

- c_D y c_A indican respectivamente las concentraciones en la solución de la parte del conjugado relativa al derivado de criptoficina y de la parte del conjugado relativa al anticuerpo;
- $\epsilon_{D\lambda1}$ y $\epsilon_{D\lambda2}$ indican respectivamente los coeficientes de absorción molares del derivado de criptoficina antes de la conjugación a las dos longitudes de onda $\lambda1$ y $\lambda2$, coeficientes medidos sobre los compuestos de la fórmula (II) de tipo SZ_a con $Z_a = -SMe$ o de tipo $-C(=O)-Z_bR_b$ con $Z_bR_b = OMe$ o $OCH_2-CH=CH_2$;
- $\epsilon_{A\lambda1}$ et $\epsilon_{A\lambda2}$ indican respectivamente los coeficientes de absorción molares del anticuerpo desnudo a las dos longitudes de onda $\lambda1$ y $\lambda2$.

10

Se entiende por anticuerpo desnudo, el anticuerpo al que no está unido ningún derivado de criptoficina, es decir el anticuerpo antes de la etapa de conjugación.

La resolución de estas dos ecuaciones lleva a:

15

$$c_D = [(\epsilon_{A\lambda1} \times A_{\lambda2}) - (\epsilon_{A\lambda2} \times A_{\lambda1})] / [(\epsilon_{D\lambda2} \times \epsilon_{A\lambda1}) - (\epsilon_{A\lambda2} \times \epsilon_{D\lambda1})]$$

$$c_A = [A_{\lambda1} - (c_D \times \epsilon_{D\lambda1})] / \epsilon_{A\lambda1}$$

20

La DAR media corresponde entonces a c_D / c_A . En el caso de los derivados de criptoficina, se puede considerar la longitud de onda $\lambda1 = 280$ nm y según la naturaleza del derivado de criptoficina, $\lambda2$ se elige en la gama de longitudes de onda específicas 246 nm - 252 nm. La DAR(UV) es con preferencia superior a 0,5, más particularmente está comprendida entre 1 y 10, aún más particularmente entre 2 y 7.

25

El conjugado se puede utilizar como anticanceroso. Por la presencia del agente de selección de la diana, el conjugado se vuelve muy selectivo frente a las células tumorales en vez de las células sanas. Esto permite dirigir el derivado de criptoficina en un entorno próximo a éstas o directamente al interior de las mismas (a este propósito, véanse las publicaciones siguientes que describen la utilización de conjugados de anticuerpos monoclonales en el tratamiento de cánceres: « Antibody-drug conjugates for cancer therapy » Carter P.J., et al., *Cancer J.* **2008**, *14*, 154–169; « Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs » Chari R., *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 98–107). Es posible tratar cánceres sólidos o líquidos. Se puede utilizar el conjugado solo o en combinación con al menos otro agente anticanceroso.

30

35

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

[Ejemplos]**Métodos analíticos utilizados****Cromatografía de líquidos de alta presión – Espectrometría de masas (LCMS)****Método A1**

- 5 El análisis se realiza en un aparato Waters ZQ y una columna XBridge C₁₈ 2,5 µm (3×50 mm) a 70 °C con un caudal de 0,9 ml/min, un gradiente de elución (7 min) de (A) agua/ácido fórmico al 0,1 % y de (B) acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1 % (gradiente: de 5 % a 100 % de B en 5,3 min; 5,5 min: 100 % de B; 6,3 min: 5 % de B) y una ionización en electronebulización en modo positivo y/o negativo.

10

Método A2

- El análisis se realiza en un aparato Waters UPLC-SQD y una columna Acquity BEH C₁₈ 1,7 µm (2,1×50 mm) a 50 °C con un caudal de 1 ml/min, un gradiente de elución (2 min) de (A) agua/ácido fórmico al 0,1 % y de (B) acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1 % (gradiente: de 5 % a 50 % de B en 0,8 min; 1,2 min: 100 % de B; 1,85 min: 100 % de B; 1,95 min: 5 % de B) y una ionización en electronebulización en modo positivo y/o negativo.

15

Método A3

- El análisis se realiza en un aparato Waters UPLC-SQD y una columna Acquity BEH C₁₈ 1,7 µm (2,1×50 mm) a 70 °C con un caudal de 1 ml/min, un gradiente de elución (2 min) de (A) agua/ácido fórmico al 0,1 % y de (B) acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1 % (gradiente: de 5 % a 50 % de B en 1 min; 1,3 min: 100 % de B; 1,45 min: 100 % de B; 1,75 min: 5 % de B) y una ionización en electronebulización en modo positivo y/o negativo.

20

Método A4

- El análisis se realiza en un aparato Waters ZQ y una columna Phenomenex Kinetex C₁₈ 100A 2,6 µm (3×50 mm) a 45 °C con un caudal de 1 ml/min, un gradiente de elución (6 min) de (A) agua/ácido fórmico al 0,1 % y de (B) acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1 % (gradiente: 6 % de B: 0,8 min; de 6 % a 100 % de B en 4,1 min; 4,8 min: 100 % de B; 5,0-6,0 min: 6 % de B) y una ionización en electronebulización en modo positivo y/o negativo.

30

Método A5

- El análisis se realiza en un aparato Waters ZQ y una columna Phenomenex Kinetex C₁₈ 2,6 µm (3×1000 mm) a 50 °C con un caudal de 0,8 ml/min, un gradiente de elución (8 min) de (A) agua/ácido fórmico al 0,1 % y de (B) acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1 % (gradiente: 4 % de B: 0,15 min; de 4 % a 100 % de B en 6,85 min; 7,1 min: 100 % de B; 7,4-8,2 min: 4 % de B) y una ionización en electronebulización en modo positivo y/o negativo.

35

Espectrometría de masas (MS)

Los espectros se han realizado por introducción directa sobre un aparato WATERS GCT (introducción directa sin LC).

- 5 Cromatografía de exclusión estérica – Espectrometría de masas de alta resolución (SEC-HRMS)
El análisis puede necesitar una etapa previa de desglicosilación del conjugado. Ésta se realiza añadiendo a la solución de conjugado 2 % en volumen de una solución de enzima PNGasa F (preparada completando hasta 100 ml un frasco de 100 unidades de liofilizado de enzima N-glicanasa con agua milliQ). La solución se homogeniza con ayuda de vórtex y se incuba a 37 °C
- 10 durante 19 h. La muestra desglicosilada está lista para ser analizada por SEC-HRMS. El análisis cromatográfico se realiza en un aparato Agilent HP1100 y una columna Waters Biosuite 250 HR SEC 4 µm (4,6×300 mm) a 30 °C con un caudal de 0,4 ml/min y una elución isocrática de (A) formiato de amonio 25 mM pH=7 / (B) acetonitrilo 70/30, de 15 min. La espectrometría de masas se realiza en un aparato Waters QTOF II con una ionización en electronebulización en modo
- 15 positivo. Los espectros de masas son analizados con el programa informático Waters MaxEnt1.

Cromatografía de exclusión estérica (SEC HPLC)

- El análisis se realiza en un aparato Merck Lachrom Elite HPLC con un detector espectrofotométrico L2455 DAD y una columna Tosoh Bioscience TSKgel G3000 SWXL 5 µm
- 20 (7,8×300 mm) con un caudal de 0,5 ml/min y una elución isocrática de 30 min con un tampón a pH=7 que contiene KCl 0,2 M, KH₂PO₄ 0,052 M, K₂HPO₄ 0,107 M y 20 % en volumen de isopropanol.

Resonancia magnética nuclear ¹H (RMN)

- 25 Los espectros RMN ¹H han sido realizados en un espectrómetro Bruker Avance DRX-300, DRX-400, DRX-500 o DMX-600. Los desplazamientos químicos se dan en ppm.

Método general utilizado para preparar los conjugados en el caso de los derivados de criptoficina que comprenden un conector L terminado por -SZ_a

- 30 Método en dos etapas sucesivas

Primera etapa

- El anticuerpo se modifica en primer lugar por un éster activado de NHS, con el fin de introducir en su superficie los grupos piridildisulfuros. Una solución de anticuerpo hu2H11 en un tampón acuoso a pH=6,5 que contiene fosfato de potasio 0,05 M y NaCl 0,05 M (designado como
- 35 tampón A) se trata con 5 a 10 equivalentes del éster activado de NHS en solución en DMA de tal suerte que la concentración final de anticuerpo esté comprendida entre 5 y 10 mg/ml y el porcentaje de DMA en el tampón acuoso sea de 5 %. La reacción se continúa durante 2 h a temperatura ambiente. Se deposita la mezcla sobre una columna de filtración sobre gel (matriz

- Sephadex™ G25, GE Healthcare) previamente equilibrada en un tampón acuoso a pH=8 que contiene HEPES 0,05 M, NaCl 0,05 M y EDTA 2 mM. El anticuerpo modificado se eluye con el tampón HEPES a pH=8, se recoge y después se valora por espectrometría UV con el fin de determinar la concentración en anticuerpo de la muestra así como el número de grupos piridildisulfuros. Una porción del anticuerpo modificado se trata con el ditioneitol con el fin de reducir el enlace disulfuro, la piridina-2-tiona liberada se valora por espectrometría (coeficientes de extinción: $\epsilon_{343 \text{ nm}}$: $8080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{280 \text{ nm}}$: $5100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para la piridina-2-tiona, y $\epsilon_{280 \text{ nm}}$: $208380 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el anticuerpo). Como media, de 3 a 6 grupos piridildisulfuros son injertados por molécula de anticuerpo.
- 10 **Segunda etapa**
- La solución de anticuerpo modificado de la primera etapa se diluye en el tampón acuoso a pH=8 descrito anteriormente y después se trata con una solución del derivado de criptocina (5 equivalentes) de tal manera que la concentración final en anticuerpo sea de 3 mg/ml y el porcentaje de DMA en el tampón acuoso sea de 20 %; el número de equivalentes de derivado de criptocina se expresa con respecto al número de moléculas de piridildisulfuro introducidas durante la primera etapa. La reacción se continúa durante la noche a 30 °C o bajo una agitación de aproximadamente 2000 rpm. La mezcla se analiza por SEC HPLC con el fin de determinar la tasa de injerto del derivado de criptocina sobre el anticuerpo. Si la tasa de sustitución es insuficiente, se trata la mezcla con 1 a 5 equivalentes suplementarios de derivado de criptocina en DMA durante 3 h a 30 °C o bajo una agitación de aproximadamente 2000 rpm. La mezcla se filtra sobre un filtro Millex®-SV 5 µm (membrana PVDF, Durapore, Millipore) y después se purifica por filtración sobre gel utilizando una matriz Superdex 200 pg (columna HiLoad 16/60 desaladora, GEHealthcare) previamente equilibrada en un tampón acuoso a pH=6,5 que contiene fosfato 0,01 M, NaCl 0,14 M y 10 % a 20 % de NMP. Se recogen las fracciones que contienen el anticuerpo conjugado bajo la forma monomérica, se reúnen y se concentran sobre Amicon Ultra-15 (membrana Ultracel 10k o 50k, Millipore) hasta una concentración comprendida entre 2 y 5 mg/ml. Se realiza finalmente un cambio de tampón con el fin de eliminar el disolvente orgánico del tampón de conservación del conjugado. Se deposita el conjugado sobre una columna de filtración sobre gel compuesta de una matriz Sephadex™ G25 (columnas Nap-5, -10, PD-10, Hiprep 26/10 desaladora, GE Healthcare) previamente equilibrada con un tampón acuoso de composición y pH adaptados a cada conjugado. El conjugado final se valora por espectrometría UV utilizando los coeficientes de extinción determinados para el anticuerpo y el derivado de criptocina correspondiente con el fin de medir la concentración en anticuerpo y el número medio de citotóxico por anticuerpo. La tasa de sustitución se puede calcular igualmente a partir de la desconvolución del espectro SEC-HRMS del conjugado.

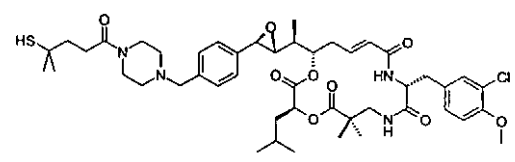
Método en dos etapas de « recipiente único »

El anticuerpo se modifica en primer lugar por un éster activado de NHS, con el fin de introducir

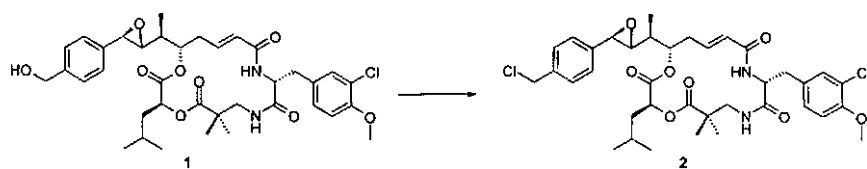
- en su superficie los grupos piridildisulfuros. Una solución de anticuerpo hu2H11 en un tampón acuoso a pH=6,5 que contiene fosfato de potasio 0,05 M y NaCl 0,05 M se diluye con el tampón fosfato a pH=6,5 y una solución acuosa de HEPES 1 N de tal manera que la proporción final de tampón fosfato inicial a pH=6,5 y de HEPES sea de 96/4 con el fin de obtener un pH≈7,5-8. Esta
- 5 solución de anticuerpo se trata con 5 a 10 equivalentes del éster activado de NHS en solución en DMA de tal manera que la concentración final en anticuerpo esté comprendida entre 5 y 10 mg/ml y el porcentaje de DMA en el tampón acuoso sea de 5 %. La reacción se continúa durante 2 h a temperatura ambiente. La solución de anticuerpo así modificado se diluye directamente con una mezcla 96/4 de tampón fosfato a pH=6,5 y de HEPES y después se trata con una solución
- 10 del derivado de criptoficina (4 equivalentes) en DMA de tal manera que la concentración final en anticuerpo sea de 3 mg/ml y el porcentaje de DMA en el tampón acuoso sea de 20 %; el número de equivalentes de derivado de criptoficina se expresa respecto al número de equivalentes de éster activado de NHS introducidos durante la primera etapa. La reacción se continúa durante la noche a 30 °C o bajo una agitación de aproximadamente 2000 rpm. La mezcla se analiza por
- 15 SEC HPLC con el fin de determinar la tasa de injerto del derivado de criptoficina sobre el anticuerpo. Si la tasa de sustitución es insuficiente, se trata la mezcla con 1 a 5 equivalentes suplementarios de derivado de criptoficina en DMA durante 3 h a 30 °C o bajo una agitación de aproximadamente 2000 rpm. La mezcla se filtra sobre un filtro Millex®-SV 5 µm (membrana PVDF, Durapore, Millipore) y después se purifica por filtración sobre gel utilizando una matriz
- 20 Superdex 200 pg (columna HiLoad 16/60 desaladora, GEHealthcare) previamente equilibrada en un tampón acuoso a pH=6,5 que contiene fosfato 0,01 M, NaCl 0,14 M y 10 % a 20 % de NMP. Se recogen las fracciones que contienen el anticuerpo conjugado bajo la forma monomérica, se reúnen y se concentran sobre Amicon Ultra-15 (membrana Ultracel 10k o 50k, Millipore) hasta una concentración comprendida entre 2 y 5 mg/ml. Se realiza finalmente un cambio de tampón
- 25 con el fin de eliminar el disolvente orgánico del tampón de conservación del conjugado. Se deposita el conjugado sobre una columna de filtración sobre gel compuesta de una matriz Sephadex™ G25 (columnas Nap-5, -10, PD-10, Hiprep 26/10 desaladora, GE Healthcare) previamente equilibrada con un tampón acuoso de composición y pH adaptados a cada conjugado. El conjugado final se valora por espectrometría UV utilizando los coeficientes de
- 30 extinción determinados para el anticuerpo y el derivado de criptoficina correspondiente con el fin de medir la concentración en anticuerpo y el número medio de citotóxico por anticuerpo. La tasa de sustitución se puede calcular igualmente a partir de la desconvolución del espectro SEC-HRMS del conjugado.
- 35 **Método general utilizado para preparar los conjugados en el caso de derivados de criptoficina que comprenden un conector terminado por $-C(=O)Z_nR_b$**
- Una solución de anticuerpo hu2H11 en un tampón acuoso a pH=8 que contiene HEPES 0,05 M, NaCl 0,05 M y EDTA 2 mM o que está compuesto de una mezcla 96/4 de un tampón acuoso a

- pH=6,5 que contiene fosfato de potasio 0,05 M y NaCl 0,05 M/ HEPES 1 N se trata con un exceso de una solución en DMA del derivado de criptoficina de tal manera que la concentración final en anticuerpo sea de 3 mg/ml y el porcentaje de DMA en el tampón acuoso sea de 20 %. La reacción se continúa durante 3 h a 30 °C o bajo una agitación de aproximadamente 2000 rpm.
- 5 La mezcla se analiza por SEC HPLC con el fin de determinar la tasa de injerto del citotóxico sobre la población de anticuerpos monoméricos. Si la tasa de sustitución es insuficiente, se trata la mezcla con 1 a 5 equivalentes suplementarios de derivado de criptoficina en DMA durante 3 h a 30 °C o bajo una agitación de aproximadamente 2000 rpm. La mezcla se filtra sobre un filtro Millex®-SV 5 µm (membrana PVDF, Durapore, Millipore) y después se purifica por filtración
- 10 sobre gel utilizando una matriz Superdex 200 pg (columna HiLoad 16/60 desaladora, GEHealthcare) previamente equilibrada en un tampón acuoso a pH=6,5 que contiene fosfato 0,01 M, NaCl 0,14 M y 10 % a 20 % de NMP. Se recogen las fracciones que contienen el anticuerpo conjugado bajo la forma monomérica, se reúnen y se concentran sobre Amicon Ultra-15 (membrana Ultracel 10k o 50k, Millipore) hasta una concentración comprendida entre 2 y 5
- 15 mg/ml. Se realiza finalmente un cambio de tampón con el fin de eliminar el disolvente orgánico del tampón de conservación del conjugado. Se deposita el conjugado sobre una columna de filtración sobre gel compuesta de una matriz Sephadex™ G25 (columnas Nap-5, -10, PD-10 o columna Hiprep 26/10 desaladora, GEHealthcare) previamente equilibrada con un tampón acuoso de composición y pH adaptados a cada conjugado. El conjugado final se valora por
- 20 espectrometría UV utilizando los coeficientes de extinción determinados para el anticuerpo y el derivado de criptoficina correspondiente con el fin de medir la concentración en anticuerpo y la tasa de injerto. La tasa de sustitución se puede calcular igualmente a partir de la desconvolución del espectro SEC-HRMS del conjugado.
- 25 Los métodos descritos para el caso del anticuerpo hu2H11 se podrían aplicar también de forma similar a otros anticuerpos, así como a otros agentes de selección de la diana.

Ejemplo 1: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-(4-mercapto-4-metil-pentanoil)-piperazin-1-ilmetil]-fenil}-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona

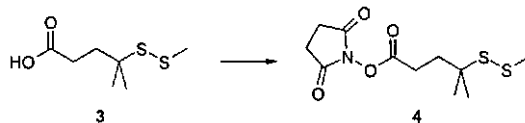


Compuesto 2: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-16-[(S)-1-[(R)-3-(4-cloro-metil-fenil)-oxiranil]-etil]-3-isobutil-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



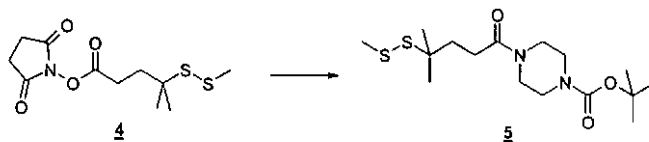
El compuesto **1** (30 mg; 42,9 μmol , preparado según Al-awar R.S., et al., *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2985-3007) se disuelve en DMF anhidra (2 ml) y se enfría la mezcla a 0 °C antes de la adición de la TEA (107 μmol) y después del CMS (64,6 μmol). Después de 15 min, se retira el baño y se continúa la agitación durante 12 h a temperatura ambiente. Se diluye la mezcla por adición de AcOEt (2 ml) y la fase orgánica se lava con agua (2×1 ml), con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (1 ml) y con una solución acuosa saturada de NaCl (1 ml). La fase orgánica se seca sobre MgSO_4 y, después de filtración y evaporación de los disolventes a presión reducida, se obtiene el producto **2** bajo la forma de un aceite incoloro que cristaliza (25 mg; 81 %). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): 0,77 – 0,83 (m, 6 H); 1,02 (s, 3 H); 1,04 – 1,07 (m, 3 H); 1,14 (s, 3 H); 1,29 – 1,36 (m, 1 H); 1,54 – 1,63 (m, 2 H); 1,80 – 1,87 (m, 1 H); 2,24 – 2,33 (m, 1 H); 2,63 – 2,73 (m, 2 H); 2,96 – 3,06 (m, 3 H); 3,28 – 3,32 (m, 1 H); 3,83 (s, 3 H); 3,93 (d, $J = 1,6$ Hz, 1 H); 4,27 (ddd, $J = 11,3, 8,0, 3,6$ Hz, 1 H); 4,78 (s, 2 H); 4,93 (dd, $J = 9,6, 3,6$ Hz, 1 H); 5,13 (dd, $J = 10,8, 5,1$ Hz, 1 H); 5,81 (d, $J = 14,8$ Hz, 1 H); 6,49 (ddd, $J = 15,0, 11,2, 3,7$ Hz, 1 H); 7,07 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H); 7,18 (dd, $J = 8,5, 1,9$ Hz, 1 H); 7,23 (d, $J = 9,6$ Hz, 1 H); 7,29 (d, $J = 1,9$ Hz, 1 H); 7,34 (d, $J = 8,2$ Hz, 2 H); 7,47 (d, $J = 8,2$ Hz, 2 H); 8,35 (d, $J = 8,2$ Hz, 1 H). LCMS (A1): ES $m/z = 713$ $[\text{M} + \text{H}]^+$; $m/z = 715$ $[\text{M} - \text{H}]^-$; $t_R = 5,17$ min.

Compuesto 4: 4-Metil-4-metildisulfanil-pentanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo



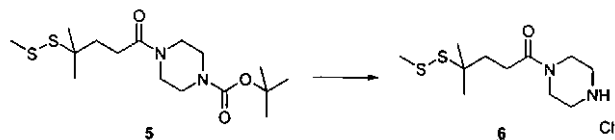
A una solución, purgada con argón, del compuesto **3** (3,05 g, 15,7 mmol, preparado según el documento **WO 2007085930**) en DCM (30 ml) se añaden sucesivamente NHS (17,3 mmol) y cloruro de EDCI (17,3 mmol). Se agita la mezcla durante 3 h a temperatura ambiente antes de lavarla con un tampón fosfato a pH=6 (2×30 ml) y después con una solución saturada de NaCl (30 ml), se seca sobre MgSO_4 y se concentra a sequedad. El aceite ámbar obtenido que cristaliza, se lava con una mezcla de heptano/AcOEt 75/25 y se filtra sobre un vidrio sinterizado para dar el compuesto **4** bajo la forma de un sólido blanco (2,08 g, 45 %). El filtrado se concentra a sequedad y el producto bruto obtenido se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla de heptano/AcOEt de 50/50 a 0/100. Las fracciones que contienen el producto esperado se concentran a sequedad y se recogen en éter isopropílico (5 ml); el precipitado se filtra por vidrio sinterizado para dar el compuesto **4** esperado (1 g, 22 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,29 (s, 6 H); 1,92 a 1,98 (m, 2 H); 2,41 (s, 3 H); 2,72 a 2,78 (m, 2 H); 2,81 (s, 4 H). LCMS (A4): EI, $m/z = 291$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Compuesto 5: 4-(4-Metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-carboxilato de *terc*-butilo



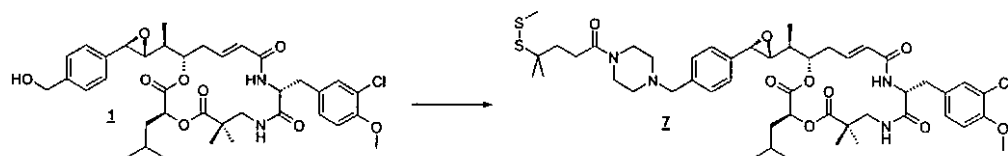
En un tubo Wheatton se cargan el compuesto **4** (200 mg, 686 μmol), la 1-Boc-piperazina (686 μmol), la TEA (755 μmol) y la DMF (1,6 ml). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante la noche y después se diluye con AcOEt (5 ml), se lava con agua (2x5 ml), se seca sobre MgSO_4 y se concentra a sequedad. Se recoge el producto bruto en éter isopropílico (3 ml); el precipitado se filtra sobre vidrio sinterizado para dar el compuesto **5** (213 g, 86 %). RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 1,27 (s, 6 H); 1,41 (s, 9 H); 1,73 a 1,87 (m, 2 H); 2,34 a 2,41 (m, 2 H); 2,40 (s, 3 H); 3,23 a 3,36 (m parcialmente enmascarado, 4 H); 3,39 a 3,45 (m, 4 H). LCMS (A2): ES m/z = 363 $[\text{M} + \text{H}]^+$; m/z = 307 $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_4\text{H}_8]^+$; t_R = 1,08 min.

Compuesto 6: Hidrocloruro de la 4-metil-4-metildisulfanil-1-piperazin-1-il-pentan-1-ona



A una solución del compuesto **5** (213 mg, 588 μmol) en dioxano (4,4 ml) se añade una solución de HCl 4 M en dioxano (4,4 ml). La agitación se continúa durante 4 h a temperatura ambiente. Se filtra la mezcla sobre vidrio sinterizado, el sólido obtenido se lava con dioxano (2 ml) y después con éter isopropílico (2 ml) para dar el compuesto **6** (132 mg, 75 %) bajo la forma de un sólido crema. RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 1,27 (s, 6 H); 1,73 a 1,85 (m, 2 H); 2,37 a 2,45 (m, 2 H); 2,40 (s, 3H); 2,98 a 3,15 (m, 4 H); 3,62 a 3,73 (m, 4H); 9,39 (m extendido, 2 H). LCMS (A1): ES m/z = 263 $[\text{M} + \text{H}]^+$; t_R = 2,40 min.

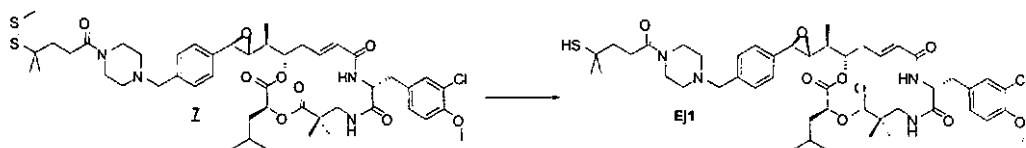
Compuesto 7: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-ilmetil]-fenil}-oxiranil)-etil]-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



El compuesto **1** (20,3 mg; 29,0 μmol) se disuelve en DMF anhidra (0,77 ml) y se añaden la TEA (72,6 μmol) y después el CMS (43,6 μmol). Después de 12 h a temperatura ambiente, el producto **2** formado no se aísla y se añaden la TEA (58,0 μmol) y después el hidrocloruro de la 4-metil-4-metildisulfanil-1-piperazin-1-il-pentan-1-ona **6** (34,8 μmol). Se agita la mezcla durante 72 h suplementarias a temperatura ambiente antes de diluirla con AcOEt (10 ml). La fase

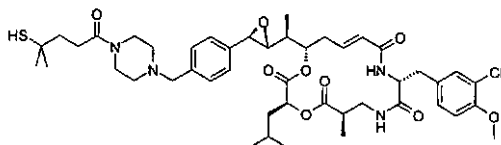
orgánica se lava con agua (2x2 ml), con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (2 ml) y con una solución acuosa saturada de NaCl (2 ml). Después de secado sobre MgSO_4 y filtración, se evaporan los disolventes a presión reducida. El producto bruto de la reacción se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 99/1 a 98/2. Se obtiene un sólido blanco, **7** (5,7 mg; 21 %). CCM (DCM 90/MeOH 10): R_f : 0,6; RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 0,75 – 0,81 (m, 6 H); 1,01 (s, 3 H); 1,05 (d, J = 6,8 Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,26 (s, 6 H); 1,28 – 1,33 (m, 1 H); 1,52 – 1,61 (m, 2 H); 1,76 – 1,83 (m, 2 H); 2,27 – 2,38 (m, 4 H); 2,39 (s, 3 H); 2,64 – 2,74 (m, 2 H); 2,95 – 3,05 (m, 2 H); 3,24 – 3,34 (m, 6 H); 3,44 (br. s., 4 H); 3,49 (s, 2 H); 3,81 (s, 3 H); 3,88 (d, J = 1,7 Hz, 1 H); 4,22 – 4,29 (m, 1 H); 4,92 (dd, J = 9,9, 3,5 Hz, 1 H); 5,08 – 5,15 (m, 1 H); 5,81 (d, J = 14,2 Hz, 1 H); 6,48 (ddd, J = 15,2, 11,3, 3,5 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,6 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J = 8,4, 2,3 Hz, 1 H); 7,22 (d, J = 9,3 Hz, 1 H); 7,25 – 7,34 (m, 5 H); 8,34 (d, J = 8,1 Hz, 1 H); LCMS (A1): ES m/z = 943 $[\text{M} + \text{H}]^+$; m/z = 941 $[\text{M} - \text{H}]^-$; t_R = 4,03 min.

Ejemplo 1: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,3-dimetil-16-((S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-(4-mercapto-4-metil-pentanoil)-piperazin-1-ilmetil]-fenil}-oxiranil)-etil)-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona

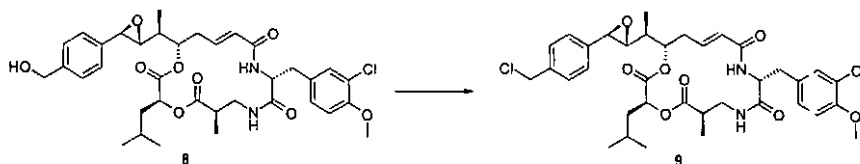


El producto **7** (9,6 mg; 10,2 μmol) se disuelve en una mezcla de etanol (1,2 ml) / agua (1 ml) y se agita la mezcla. Se añade a continuación el TCEP (25,4 μmol) y la mezcla se agita durante 5 h a temperatura ambiente. Se diluye la mezcla por adición de AcOEt y la fase orgánica se lava con una mezcla 1/1 de agua y de una solución acuosa saturada de NH_4Cl (1 ml). Después de secado de la fase orgánica sobre MgSO_4 , filtración y evaporación de los disolventes a presión reducida, el producto final, **Ej1**, se obtiene bajo la forma de un sólido blanco (6,5 mg; 71 %). CCM (DCM 90/MeOH 10): R_f = 0,56; RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): 0,76 – 0,81 (m, 6 H); 1,01 (s, 3 H); 1,06 (d, J = 6,8 Hz, 3 H); 1,13 (s, 3 H); 1,24 (s, 6 H); 1,27 – 1,31 (m, 1 H); 1,56 – 1,64 (m, 2 H); 1,73 – 1,85 (m, 3 H); 2,26 – 2,33 (m, 3 H); 2,36 – 2,45 (m, 4 H); 2,63 – 2,75 (m, 2 H); 2,95 – 3,06 (m, 3 H); 3,34 – 3,36 (m, 1 H); 3,42 – 3,51 (m, 6 H); 3,82 (s, 3 H); 3,89 (s, 1 H); 4,22 – 4,29 (m, 1 H); 4,92 (dd, J = 9,8, 3,4 Hz, 1 H); 5,12 (dd, J = 10,8, 4,9 Hz, 1 H); 5,81 (d, J = 15,2 Hz, 1 H); 6,48 (ddd, J = 15,0, 11,4, 3,4 Hz, 1 H); 7,06 (d, J = 8,3 Hz, 1 H); 7,18 (dd, J = 8,3, 1,5 Hz, 1 H); 7,24 (d, J = 9,8 Hz, 1 H); 7,26 – 7,36 (m, 5 H); 8,37 (d, J = 7,8 Hz, 1 H); LCMS (A2): ES m/z = 397 $[\text{M} + \text{H}]^+$; m/z = 895 $[\text{M} - \text{H}]^-$; t_R = 0,97 min.

Ejemplo 2: (E)-(3S,6R,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-(4-mercapto-4-metil-pentanoil)-piperazin-1-ilmetil]-fenil}-oxiranil)-etil]-4-metil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona

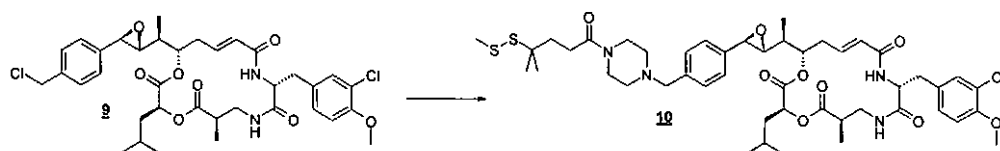


- 5 **Compuesto 9:** (E)-(3S,6R,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-16-[(S)-1-[(R)-3-(4-cloro-metil-fenil)-oxiranil]-etil]-3-isobutil-6-metil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



- El compuesto **8** (49 mg; 71,4 μ mol, que se puede preparar según Al-awar R.S., et al., *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2985-3007) se disuelve en DCM anhidro (5 ml) y se enfría la mezcla a 0 °C
- 10 antes de añadir la DIPEA (428 μ mol) y después el CMS (214 μ mol). Se deja que la mezcla vuelva a temperatura ambiente y se continúa la agitación durante 40 h a temperatura ambiente. Se hidroliza la mezcla con 5 ml de agua y la fase acuosa se extrae con DCM (3x5 ml). Se reúnen las fases orgánicas, se lavan con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (10 ml) y con una solución acuosa saturada de NaCl (10 ml) y se secan sobre MgSO_4 . Después de filtración y
- 15 evaporación de los disolventes a presión reducida, se purifica el producto bruto por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/MeOH de 10(v/v) a 90/10. El compuesto **9** se obtiene bajo la forma de un sólido blanco (37 mg; 79 %). RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6): 0,78 (d, J = 6,6 Hz, 3 H); 0,80 (d, J = 6,6 Hz, 3 H); 1,01 (d, J = 6,9 Hz, 3 H); 1,05 (d, J = 6,9 Hz, 3 H); 1,30 (m, 1 H); 1,54 (m, 1 H); 1,60 (m, 1 H); 1,82 (m, 1 H); 2,27 (m, 1 H); 2,60 a
- 20 2,78 (m, 3 H); 2,97 a 3,05 (m, 2 H); 3,15 (m, 1 H); 3,41 (m, 1 H); 3,81 (s, 3 H); 3,92 (d, J = 1,6 Hz, 1 H); 4,26 (ddd, J=3,8 y 8,2 y 11,5 Hz, 1 H); 4,77 (s, 2 H); 4,88 (dd, J = 3,8 y 9,6 Hz, 1 H); 5,12 (ddd, J=1,5 y 5,3 y 11,2 Hz, 1 H); 5,80 (dd, J = 1,5 y 15,0 Hz, 1 H); 6,47 (ddd, J=3,7 y 11,2 y 15,0 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,5 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J = 2,2 y 8,5 Hz, 1 H); 7,23 (dd, J = 2,7 y 9,1 Hz, 1 H); 7,29 (d, J = 2,2 Hz, 1 H); 7,32 (d, J = 8,2 Hz, 2 H); 7,45 (d, J = 8,2 Hz, 2 H); 8,34 (d, J=8,2 Hz,
- 25 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 703 $[\text{M} + \text{H}]^+$; m/z = 701 $[\text{M} - \text{H}]^-$; m/z = 747 $[\text{M} - \text{H} + \text{HC}_2\text{O}_2\text{H}]^-$ pico de base; t_R = 1,17 min.

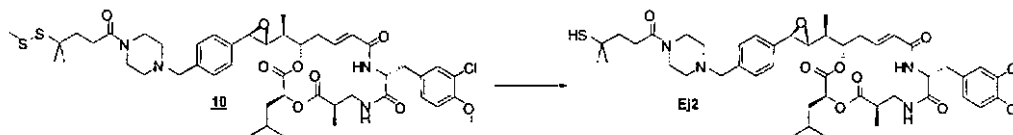
- Compuesto 10:** (E)-(3S,6R,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6-metil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-ilmetil]-fenil}-oxiranil)-etil]-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona
- 30



- El compuesto **9** (36,6 mg; 52 μmol) se disuelve en acetonitrilo anhidro (3 ml) y después se añaden sucesivamente la DIPEA (260 μmol) y el compuesto **6** (156 μmol). Se agita el medio de reacción durante 20 h a temperatura ambiente y después se hidroliza por adición de 4 ml de agua. La fase acuosa se extrae con AcOEt (3×4 ml), se reúnen las fases orgánicas, se lavan con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (5 ml) y con una solución acuosa saturada de NaCl (5 ml). Después de secado sobre MgSO_4 y filtración, los disolventes se evaporan a presión reducida. El producto bruto de la reacción se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 95/5. El compuesto **10** se obtiene en forma de un sólido blanco (39 mg; 80 %). RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6): 0,78 (d, $J = 6,6$ Hz, 3 H); 0,80 (d, $J = 6,6$ Hz, 3 H); 1,01 (d, $J = 6,9$ Hz, 3 H); 1,05 (d, $J = 6,9$ Hz, 3 H); 1,26 (s, 6 H); 1,30 (m, 1 H); 1,53 (m, 1 H); 1,60 (m, 1 H); 1,75 a 1,84 (m, 3 H); 2,26 a 2,37 (m, 7 H); 2,39 (s, 3 H); 2,61 a 2,77 (m, 3 H); 2,96 a 3,05 (m, 2 H); 3,15 (m, 1 H); 3,38 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,44 (m, 4 H); 3,48 (s, 2 H); 3,81 (s, 3 H); 3,88 (d, $J = 1,6$ Hz, 1 H); 4,27 (ddd, $J = 4,0$ y 8,1 y 11,5 Hz, 1 H); 4,88 (dd, $J = 3,8$ y 9,6 Hz, 1 H); 5,12 (ddd, $J = 1,6$ y 5,3 y 11,5 Hz, 1 H); 5,80 (dd, $J = 1,6$ y 15,1 Hz, 1 H); 6,47 (ddd, $J = 3,6$ y 11,5 y 15,1 Hz, 1 H); 7,05 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H); 7,17 (dd, $J = 2,2$ y 8,5 Hz, 1 H); 7,23 (dd, $J = 2,6$ y 9,2 Hz, 1 H); 7,27 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H); 7,29 (d, $J = 2,2$ Hz, 1 H); 7,32 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H); 8,35 (d, $J = 8,1$ Hz, 1 H). LCMS (A2): ES $m/z = 929$ $[\text{M} + \text{H}]^+$; $m/z = 927$ $[\text{M} - \text{H}]^-$; $m/z = 973$ $[\text{M} - \text{H} + \text{HCO}_2\text{H}]^-$ pico de base; $t_R = 0,99$ min.

20

Ejemplo 2: (E)-(3S,6R,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6-metil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-(4-mercapto-4-metil-pentanoil)-piperazin-1-ilmetil]-fenil}-oxiranil)-etil]-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona

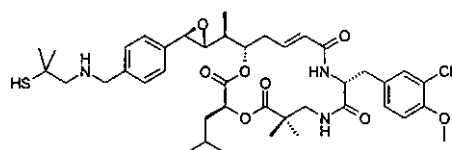
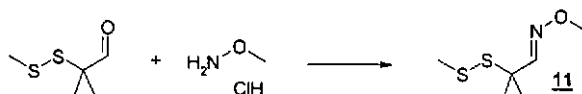


- El producto **10** (34 mg; 36,6 μmol) se disuelve en una mezcla de etanol (4,3 ml) / agua (3,6 ml) y se agita la mezcla. Se adiciona a continuación el TCEP (146 μmol), la mezcla se hace incolora y se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Se diluye la mezcla por adición de AcOEt (20 ml) y la fase orgánica se lava con una mezcla 1/1 de agua y de una solución acuosa saturada de NH_4Cl (20 ml). La fase acuosa se extrae con 2×20 ml de AcOEt, las fases orgánicas se reúnen y se lavan con una solución saturada de NaCl (20 ml). Después de secado sobre MgSO_4 , filtración y evaporación de los disolventes a presión reducida, el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/MeOH de 98/2 a 90/10. El compuesto **Ej2** se obtiene bajo la forma de un sólido blanco (28,2 mg; 87 %). RMN ^1H (500 MHz,

DMSO-d₆): 0,77 (d, J = 6,6 Hz, 3 H); 0,79 (d, J = 6,6 Hz, 3 H); 1,01 (d, J = 6,9 Hz, 3 H); 1,04 (d, J = 6,9 Hz, 3 H); 1,27 (m, 1 H); 1,31 (s, 6 H); 1,53 (m, 1 H); 1,59 (m, 1 H); 1,77 (m, 2 H); 1,82 (m, 1 H); 2,24 a 2,32 (m, 3 H); 2,34 a 2,44 (m, 4 H); 2,62 a 2,76 (m, 4 H); 2,98 a 3,04 (m, 2 H); 3,15 (m, 1 H); 3,41 (m, 1 H); 3,46 (m, 4 H); 3,48 (s, 2 H); 3,81 (s, 3 H); 3,88 (d, J = 2,0 Hz, 1 H); 4,26 (ddd, J=3,4 y 8,3 y 11,5 Hz, 1 H); 4,88 (dd, J = 3,7 y 10,0 Hz, 1 H); 5,12 (ddd, J=2,0 y 5,3 y 11,1 Hz, 1 H); 5,80 (dd, J = 2,0 y 15,0 Hz, 1 H); 6,47 (ddd, J=3,7 y 11,1 y 15,0 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,3 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J = 2,0 y 8,3 Hz, 1 H); 7,23 (dd, J = 2,9 y 9,3 Hz, 1 H); 7,27 (d, J = 8,5 Hz, 2 H); 7,29 (d, J = 2,0 Hz, 1 H); 7,32 (d, J = 8,5 Hz, 2 H); 8,35 (d, J=8,3 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 883 [M + H]⁺; m/z = 881 [M - H]⁻; t_R = 0,92 min.

10

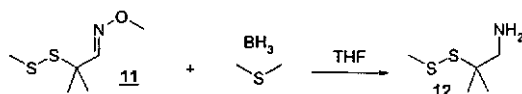
Ejemplo 3: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[(2-mercapto-2-metil-propilamino)-metil]-fenil}-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona

15 **Compuesto 11:** 2-Metil-2-metildisulfanil-propionaldehído O-metil-oxima

5 g (33,3 mmol) de 2-(metilditio)-isobutiraldehído se disuelven en 50 ml de etanol, bajo atmósfera inerte. Se añaden sucesivamente una suspensión de 5,56 g (66,54 mmol) de cloruro de O-metilhidroxilamina en 50 ml de etanol y después 6,65 ml (66,54 mmol) de NaOH. La mezcla, de color blanco sucio, se calienta a reflujo durante la noche. Después de volver a temperatura ambiente, se vierte la mezcla en 500 ml de agua. La fase acuosa se extrae con AcOEt (3×175 ml), las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una solución saturada de NaCl (200 ml) y se secan sobre MgSO₄. Después de filtración y concentración a presión reducida, se obtiene el compuesto **11** en forma de un aceite incoloro (5,89 g, 32,9 mmol).

25

Compuesto 12: 2-Metil-2-metildisulfanil-propilamina

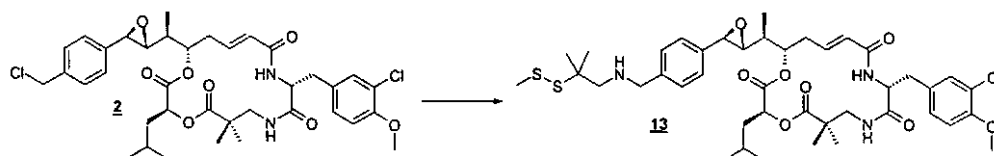


En un matraz purgado con argón, se introducen sucesivamente, a temperatura ambiente, 1,78 g (9,9 mmol) de éter de oxima **11**, 19 ml de THF anhidro y 99,5 ml de una solución 2 M de metilsulfuro de borano en THF. La mezcla se calienta durante 16 h a reflujo. A continuación se para la reacción, se deja que la mezcla vuelva a temperatura ambiente antes de añadir 100 ml de MeOH gota o gota cuidadosamente, a 0 °C mientras se forma una espuma y después a

30

temperatura ambiente. Se evapora la mezcla a presión reducida para dar aproximadamente 2,8 g de un aceite amarillo que se recoge en 30 ml de una solución de HCl 5 a 6 N en isopropanol. La mezcla se mantiene a reflujo 1 h y después se deja a temperatura ambiente durante la noche. Después de evaporación a presión reducida, el residuo obtenido se recoge con 80 ml de HCl 1 N y después se extrae con éter dietílico (3×20 ml). La fase acuosa se trata con amoníaco acuoso al 30 % hasta obtención de un pH de 12,5-13, esto es 12 ml (fase acuosa violeta pálido) y después se extrae de nuevo con 3×20 ml de éter. Las fases orgánicas se reúnen, se secan sobre MgSO₄, se filtran y se evaporan a sequedad a presión reducida para dar 760 mg de producto bruto. Este residuo se purifica finalmente por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 90/10. El compuesto **12** se obtiene en forma de un aceite amarillo pálido (301 mg, 20 %). LCMS (A2): ES m/z = 152 [M + H]⁺; t_R = 0,27 min.

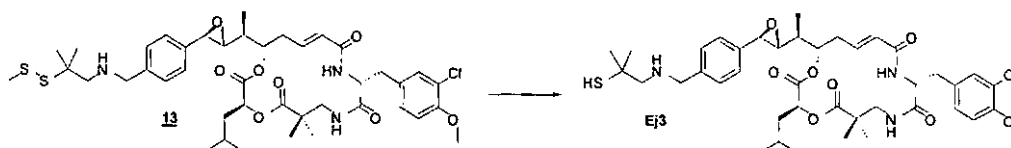
Compuesto 13: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[(2-metil-2-metildisulfanil-propilamino)-metil]-phenil)-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



A una solución, purgada con argón, de 25 mg (35 μmol) del compuesto **2** en 3,1 ml de DMF anhidra, se añaden sucesivamente, a temperatura ambiente, 9,8 μl (70 μmol) de TEA y 6,3 mg (42 μmol) del compuesto **12**. La agitación se continúa a 40 °C. Después de 72 h de reacción, queda compuesto **2** de partida, se añaden entonces 9,8 μl (70 μmol) de TEA y 6,3 mg (42 μmol) de la amina **12**. Después de 72 h suplementarias a 40 °C, aún queda compuesto **2**: se añaden 6,3 mg (42 μmol) de la amina **12** y se continúa la agitación a 40 °C. Un día más tarde, la reacción es completa. Se diluye la mezcla en 10 ml de AcOEt, se lava con 2×10 ml de agua, 10 ml de una solución saturada de NaHCO₃ y 10 ml de una solución saturada de NaCl. Después de secado de la fase orgánica sobre MgSO₄, ésta se filtra y después se evapora a presión reducida para dar 30 mg de producto bruto. Este residuo se purifica por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 93/7. El compuesto **13** se obtiene en forma de un polvo blanco (23,3 mg, 81 %). CCM (DCM 90/MeOH 10): R_f=0,55; RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): 0,76 a 0,81 (m, 6 H); 1,02 (s, 3 H); 1,07 (d, J = 6,9 Hz, 3 H); 1,13 (s, 3 H); 1,27 a 1,33 (m, 7 H); 1,52 a 1,63 (m, 2 H); 1,82 (sxt, J=6,8 Hz, 1 H); 2,06 (s ancho, 1 H); 2,25 a 2,34 (m, 1 H); 2,37 (s, 3 H); 2,57 (s, 2 H); 2,66 a 2,76 (m, 2 H); 2,97 a 3,06 (m, 3 H); 3,33 a 3,38 (m, 1 H); 3,75 (s, 2 H); 3,83 (s, 3 H); 3,88 (d, J = 1,6 Hz, 1 H); 4,27 (ddd, J=3,7 y 8,0 y 11,4 Hz, 1 H); 4,93 (dd, J = 3,7 y 9,7 Hz, 1 H); 5,12 (dd, J = 5,8 y 11,3 Hz, 1 H); 5,82 (dd, J = 1,5 y 15,2 Hz, 1 H); 6,49 (ddd, J=3,8 y 11,3 y 15,2 Hz, 1 H); 7,07 (d, J = 8,5 Hz, 1 H); 7,18 (dd, J = 1,9 y 8,5 Hz, 1 H); 7,23 (dd, J = 2,6 y 9,5 Hz, 1 H); 7,26 (d, J = 8,2 Hz, 2 H); 7,30 (d, J = 1,9 Hz, 1 H); 7,35 (d, J = 8,2 Hz, 2 H);

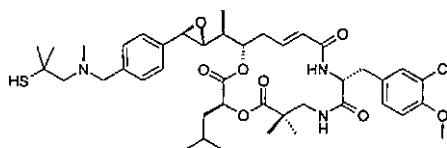
8,35 (d, J=8,0 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 832 $[M + H]^+$; m/z = 830 $[M - H]^-$; t_R = 0,96 min.

Ejemplo 3: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-(4-[(2-mercapto-2-metil-propilamino)-metil]-fenil)-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona

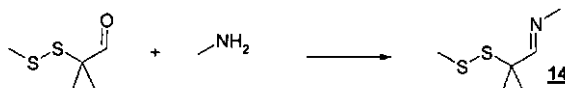


El producto **13** (10,6 mg; 12,8 μ mol) se disuelve en una mezcla de etanol (1,5 ml) / agua (1,26 ml). Se adiciona a continuación TCEP (9,1 mg, 31,9 μ mol) y se agita la mezcla durante 2 h 30 min a temperatura ambiente. Se diluye la mezcla en 15 ml de AcOEt y la fase orgánica se lava con una mezcla 1/1 de agua y de una solución acuosa saturada de NH_4Cl (5 ml). Después de secado de la fase orgánica sobre $MgSO_4$, filtración y evaporación de los disolventes a presión reducida, el producto bruto obtenido se purifica finalmente por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 92/8. El compuesto **Ej3** se obtiene bajo la forma de un sólido blanco (6,4 mg; 63 %). CCM (DCM 90/MeOH 10): R_f =0,47; RMN 1H (500 MHz, DMSO- d_6): 0,80 a 0,86 (m, 6 H); 1,06 (s, 3 H); 1,11 (d, J = 6,9 Hz, 3 H); 1,18 (s, 3 H); 1,31 a 1,38 (m, 7 H); 1,57 a 1,67 (m, 2 H); 1,87 (sxt, J=6,8 Hz, 1 H); 2,29 a 2,38 (m, 1 H); 2,56 (s, 2 H); 2,70 a 2,80 (m, 2 H); 3,00 a 3,11 (m, 3 H); 3,39 a 3,43 (m, 1 H); 3,82 (s, 2 H); 3,87 (s, 3 H); 3,92 (d, J = 1,9 Hz, 1 H); 4,31 (ddd, J=3,6 y 8,0 y 11,5 Hz, 1 H); 4,97 (dd, J = 3,7 y 9,7 Hz, 1 H); 5,17 (dd, J = 5,8 y 11,3 Hz, 1 H); 5,86 (dd, J = 1,4 y 15,1 Hz, 1 H); 6,54 (ddd, J=3,8 y 11,3 y 15,1 Hz, 1 H); 7,11 (d, J = 8,7 Hz, 1 H); 7,23 (dd, J = 1,9 y 8,7 Hz, 1 H); 7,27 (dd, J = 2,7 y 9,6 Hz, 1 H); 7,31 (d, J = 8,0 Hz, 2 H); 7,34 (d, J = 1,9 Hz, 1 H); 7,42 (d, J = 8,0 Hz, 2 H); 8,40 (d, J=8,0 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 786 $[M + H]^+$; m/z = 784 $[M - H]^-$; t_R = 0,92 min.

Ejemplo 4: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-(4-[(2-mercapto-2-metil-propil)-metil-amino)-metil]-fenil)-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



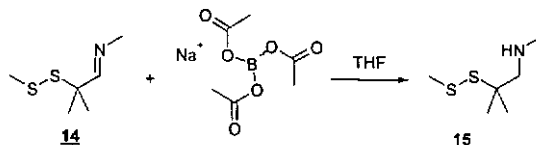
Compuesto 14: Metil-[2-metil-2-metildisulfanil-prop-(E)-iliden]-amina



Se disuelve 1 g (6,66 mmol) de 2-(metilditio)-isobutiraldehído en 10 ml de THF anhidro, en atmósfera inerte. Se añade la solución de metilamina 2 M en THF (33,3 ml, 66,6 mmol) y

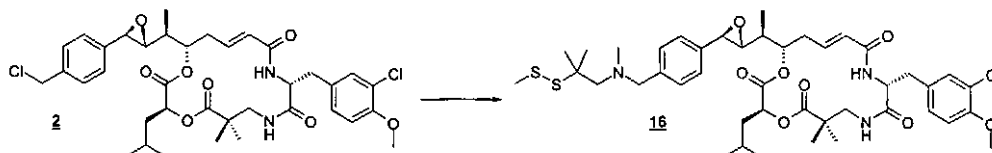
después se agita la mezcla durante 5 h a temperatura ambiente. Se diluye con 50 ml de AcOEt, se lava con agua (30 ml), con una solución saturada de NaCl (30 ml) y se seca sobre MgSO₄. Después de filtración y concentración a presión reducida, se obtiene el compuesto **14** en forma de un aceite amarillo pálido (1,01 g, 93 %). RMN ¹H (400 MHz, cloroformo-*d*): 1,46 (s, 6 H); 2,36 (s, 3 H); 3,32 (s, 3 H); 7,52 (s, 1 H).

Compuesto 15: 2-Metil-2-metildisulfanil-propilamina



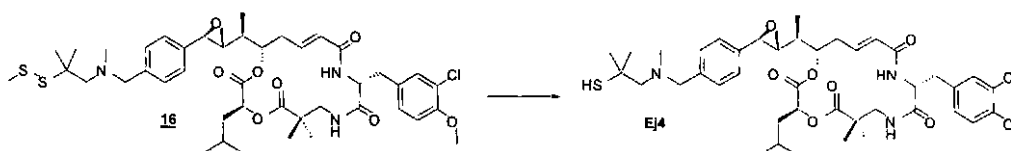
Una solución del compuesto **14** (1,01 g, 6,185 mmol) en 30 ml de THF se purga con argón y se enfría a 0 °C antes de añadir, a 0 °C, 1,44 g (6,80 mmol) de triacetoxiborohidruro de sodio. La agitación se continúa durante 15 h a temperatura ambiente: queda imina de partida; se añaden a 0 °C, 1,44 g (6,80 mmol) de triacetoxiborohidruro de sodio y 354 µl (6,185 mmol) de ácido acético y después se continúa la agitación a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se diluye con 50 ml de AcOEt y se lava con agua (50 ml). El pH de la fase acuosa se ajusta a 12 aproximadamente por adición de 14 ml de una solución acuosa de sosa 1 N y después se extrae con éter dietílico (3×50 ml). Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una solución saturada de NaCl (50 ml) y se secan sobre MgSO₄. Después de filtración y concentración a presión reducida, el compuesto **15** se obtiene en forma de un aceite incoloro (695 mg, 68 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,25 (s, 6 H); 1,47 (m extendido, 1 H); 2,31 (s, 3 H); 2,38 (s, 3 H); 2,53 (m, 2 H). LCMS (A2): ES *m/z* = 166 [M + H]⁺; *t_R* = 0,28 min.

Compuesto 16: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(((2-metil-2-metildisulfanil-propil)-metil-amino)-metil)-fenil)-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



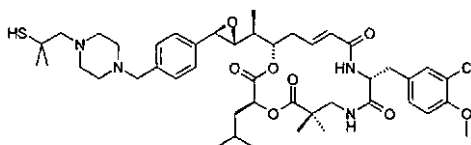
El compuesto **16** se puede obtener por sustitución nucleófila del grupo cloro del derivado **2** por la amina **15** aplicando el método descrito para la preparación del compuesto **30**.

Ejemplo 4: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(((2-mercapto-2-metil-propil)-metil-amino)-metil)-fenil)-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona

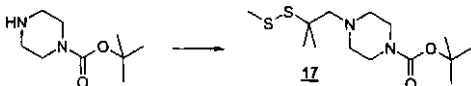


El ejemplo 4 se puede obtener aplicando el método descrito para la preparación del ejemplo 6 compuesto 16.

- 5 **Ejemplo 5:** (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-(2-mercapto-2-metil-propil)-piperazin-1-ilmetil]-fenil}-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



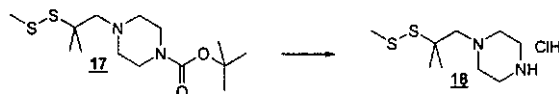
Compuesto 17: 4-(2-Metil-2-metildisulfanil-propil)-piperazin-1-carboxilato de *tert*-butilo



10

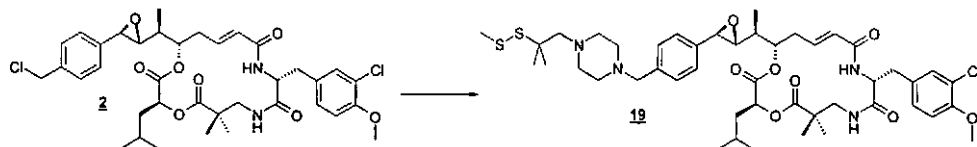
- A una solución, purgada con argón, de 1-Boc-piperazina (1,0 g, 5,37 mmol) en THF anhidro (20 ml) se añaden el 2-(metilditio)-isobutiraldehído (5,37 mmol) y el isopropóxido de titanio (IV) (6,71 mmol). La mezcla se agita durante 20 min a temperatura ambiente y después se realiza una nueva adición de 2-(metilditio)-isobutiraldehído (5,37 mmol) y de isopropóxido de titanio (IV) (6,71 mmol). La agitación se continúa durante 2 h y después se añaden 12 ml de etanol y se continúa la agitación durante 5 min. Se añade cianoborohidruro de sodio (5,37 mmol), se agita la mezcla durante 1 h antes de añadir 5,37 mmoles suplementarios de cianoborohidruro de sodio. Se continúa la agitación durante 1 h. La mezcla se concentra a sequedad y después se recoge en AcOEt. Se añade agua produciendo la formación de un precipitado que se filtra sobre vidrio sinterizado, se lava con AcOEt y con agua. El sólido obtenido se solubiliza en una solución acuosa de HCl 1 N (50 ml), se neutraliza el medio con una solución acuosa de NaOH 5 N y después se extrae con DCM. Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una solución saturada de NaCl, se secan sobre MgSO₄, se filtran y se concentran a presión reducida. El producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con DCM/metanol de 100/0 a 97/3. El compuesto 17 se obtiene bajo la forma de un aceite amarillo pálido (650 mg; 40 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,26 (s, 6 H); 1,39 (s, 9 H); 2,39 (s, 3 H); 2,42 (s, 2H); 2,44 a 2,48 (m, 4 H); 3,27 (m parcialmente enmascarado, 4 H). LCMS (A1): ES m/z = 321 [M + H]⁺; m/z = 265 pico de base; t_R = 3,02 min.
- 15
- 20
- 25

30

Compuesto 18: Hidrocloruro de 1-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-piperazina

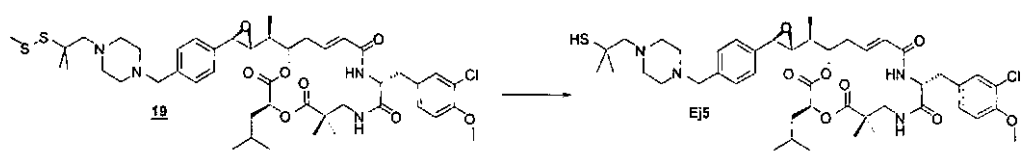
- A una solución del compuesto **17** (322 mg, 1,01 mmol) en dioxano (13 ml) se añade una solución de HCl 4 M en dioxano (5 ml). La agitación se continúa durante 16 h a temperatura ambiente. La mezcla se filtra sobre vidrio sinterizado, y se lava el sólido obtenido con dioxano para dar el compuesto **18** (231 mg, 90 %) en forma de un polvo blanco. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,31 (s ancho, 6 H); 2,42 (s, 3 H); 2,59 a 3,38 (m muy extendido, 10 H); 8,78 (m extendido, 2 H). LCMS (A2): ES m/z = 221 $[\text{M} + \text{H}]^+$; t_R = 0,46 min.

- Compuesto 19:** (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-piperazin-1-ilmetil]-fenil}-oxiranil)-etil]-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



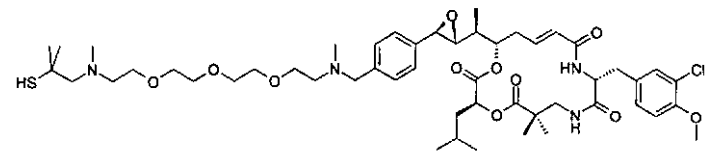
- A una solución, purgada con argón, del compuesto **2** (15,02 mg, 20,93 μmol) en DMF anhidra (0,9 ml) se añade una solución del compuesto **18** (25,12 μmol) y de TEA (52,3 μmol) en DMF (1 ml). La mezcla se agita a 40 °C bajo argón. Después de 24 h, se añaden 25,12 μmol del compuesto **18** y 31,4 μmol de TEA. Después de 24 h suplementarias a 40 °C, la reacción se ha terminado. Se diluye la mezcla con AcOEt (6 ml) y se lava con agua (2x6 ml), una solución saturada de NaHCO_3 (6 ml) y una solución saturada de NaCl (6 ml). Después de secado de la fase orgánica sobre MgSO_4 , ésta se filtra y después se evapora a presión reducida para dar 46 mg de producto bruto. Se purifica el residuo por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 95/5. El compuesto **19** se obtiene en forma de un polvo blanco (5,2 mg, 28 %). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): 0,76 (d, J = 6,4 Hz, 3 H); 0,78 (d, J = 6,4 Hz, 3 H); 1,01 (s, 3 H); 1,06 (d, J = 6,8 Hz, 3 H); 1,13 (s, 3 H); 1,25 (s, 6 H); 1,27 a 1,33 (m, 1 H); 1,51 a 1,63 (m, 2 H); 1,76 a 1,85 (m, 1 H); 2,23 a 2,32 (m, 1 H); 2,37 (m, 4 H); 2,39 (s, 3 H); 2,41 (s, 2 H); 2,53 a 2,56 (m, 4 H); 2,63 a 2,76 (m, 2 H); 2,94 a 3,06 (m, 3 H); 3,34 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,40 a 3,48 (m, 2 H); 3,82 (s, 3 H); 3,87 (d, J = 2,0 Hz, 1 H); 4,26 (ddd, J = 3,8 y 7,8 y 11,3 Hz, 1 H); 4,92 (dd, J = 3,8 y 9,8 Hz, 1 H); 5,07 a 5,14 (m, 1 H); 5,81 (d, J = 15,2 Hz, 1 H); 6,48 (ddd, J = 3,8 y 11,3 y 15,2 Hz, 1 H); 7,06 (d, J = 8,5 Hz, 1 H); 7,18 (dd, J = 2,2 y 8,5 Hz, 1 H); 7,21 a 7,32 (m, 6 H); 8,35 (d, J = 8,3 Hz, 1 H). LCMS (A1): ES m/z = 901 $[\text{M} + \text{H}]^+$; m/z = 451 pico de base; t_R = 4,33 min.

Ejemplo 5: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-(2-mercapto-2-metil-propil)-piperazin-1-ilmetil]-fenil}-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona

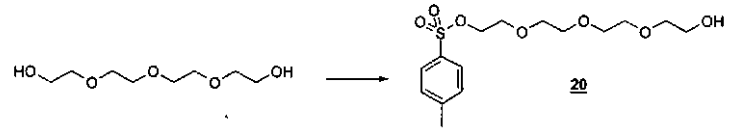


- 5 El producto **19** (5,7 mg; 6,3 μ mol) se disuelve en una mezcla de etanol (0,8 ml) / agua (0,5 ml). Se adiciona a continuación TCEP (4,54 mg, 15,83 μ mol) y se agita la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. Se diluye la mezcla en 7 ml de AcOEt y la fase orgánica se lava con una mezcla 1/1 de agua y de una solución acuosa saturada de NH_4Cl (7 ml). Después de secado de la fase orgánica sobre MgSO_4 , filtración y evaporación de los disolventes a presión reducida, el
- 10 producto bruto obtenido se purifica por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 99/1 a 95/5. El compuesto **Ej5** se obtiene bajo la forma de un sólido blanco (2,95 mg; 55 %). RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6): 0,77 (d, J = 6,3 Hz, 3 H); 0,78 (d, J = 6,3 Hz, 3 H); 1,02 (s, 3 H); 1,06 (d, J = 6,9 Hz, 3 H); 1,13 (s, 3 H); 1,27 (s, 6 H); 1,29 a 1,34 (m, 1 H); 1,52 a 1,63 (m, 2 H); 1,82 (m, 1 H); 2,29 (m, 1 H); 2,37 (s, 2 H); 2,39 a 2,41 (m, 4 H); 2,57 a 2,62
- 15 (m, 4 H); 2,65 a 2,76 (m, 2 H); 2,96 a 3,06 (m, 3 H); 3,34 (m, parcialmente enmascarado, 1 H); 3,46 (s, 2 H); 3,83 (s, 3 H); 3,88 (d, J = 2,2 Hz, 1 H); 4,27 (ddd, J=3,7 y 8,0 y 11,5 Hz, 1 H); 4,93 (dd, J = 3,7 y 9,7 Hz, 1 H); 5,12 (m, 1 H); 5,82 (d, J = 15,2 Hz, 1 H); 6,49 (ddd, J=3,7 y 11,5 y 15,2 Hz, 1 H); 7,07 (d, J = 8,5 Hz, 1 H); 7,18 (dd, J = 2,2 y 8,5 Hz, 1 H); 7,21 a 7,33 (m, 6 H); 8,36 (d, J=8,0 Hz, 1 H). LCMS (A1): ES m/z = 855 $[\text{M} + \text{H}]^+$; m/z = 428 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ pico de base; t_R
- 20 = 4,13 min.

Ejemplo 6: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-{2-[2-(2-{2-metil-[2-mercapto-2-metil-propil]amino-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etil]metilamino)-metil]-fenil}-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



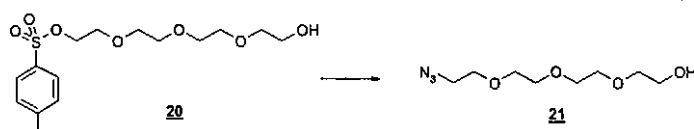
Compuesto 20: Tolueno-4-sulfonato de 2-{2-[2-(2-hidroxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etilo



- A una solución, purgada con argón y enfriada a 0 $^{\circ}\text{C}$, se añaden sucesivamente 5 g (25,74 mmol) de tetraetilenglicol en 68,7 ml de DCM, en porciones con el fin de mantener una agitación
- 30

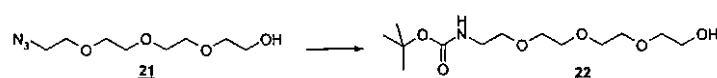
adecuada, 8,95 g (38,61 mmol) de óxido de plata y 5,40 g (28,31 mmol) de cloruro de tosilo. Se añaden 855 mg (5,15 mmol) de KI en pequeñas porciones con el fin de mantener la temperatura de la mezcla inferior a 5 °C. Se continúa la agitación durante 1 h manteniendo la temperatura inferior a 5 °C. Después de volver a temperatura ambiente, se filtra la mezcla sobre Clarcel, se lava el residuo con DCM y después se concentra el filtrado a sequedad a presión reducida. Se purifica el producto bruto por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 99/1 a 95/5. El compuesto **20** se obtiene bajo la forma de un aceite incoloro (5,4 g, 60 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 2,43 (s, 3 H); 3,40 (m, 2 H); 3,44 a 3,52 (m, 10 H); 3,58 (m, 2 H); 4,11 (m, 2 H); 4,53 (t, J = 5,4 Hz, 1 H); 7,48 (d, J = 8,3 Hz, 2 H); 7,78 (d, J = 8,3 Hz, 2 H). LCMS (A2): ES m/z = 349 [M + H]⁺; m/z = 371 [M + Na]⁺; t_R = 0,69 min.

Compuesto 21: 1-Azido-3,6-9-trioxaundecan-11-ol



A una solución de 5,4 g (15,51 mmol) del compuesto **20** en 40,6 ml de acetonitrilo anhidro se añaden 1,34 g (20,63 mmol) de NaN₃ y después se calienta la mezcla durante 6 h 30 min a reflujo. Después de volver a temperatura ambiente, la mezcla se filtra sobre Clarcel y se concentra a presión reducida. Queda compuesto **20** de partida: se recoge el producto bruto en 25 ml de acetonitrilo anhidro y se añaden 230 mg (3,5 mmol) de NaN₃. La mezcla se calienta a reflujo durante 5 h. Después de volver a temperatura ambiente, se filtra sobre Clarcel y se concentra a sequedad a presión reducida para dar el compuesto **21** en forma de un aceite amarillo pálido (3,37 g, 99 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 3,37 a 3,43 (m, 4 H); 3,45 a 3,58 (m, 10 H); 3,60 (m, 2 H); 4,54 (t, J = 5,1 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 220 [M + H]⁺; m/z = 242 [M + Na]⁺ pico de base; t_R = 0,39 min.

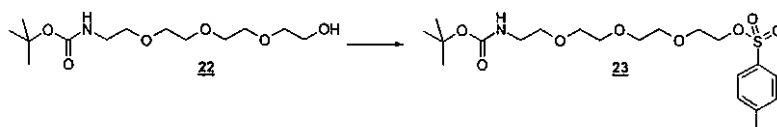
Compuesto 22: N-Boc-aminoetoxi-etoxi-etoxi-etanol



A una solución, hecha inerte con argón, de 320 mg de paladio sobre carbón al 10 % en 5 ml de AcOEt se añade una solución de 3,25 g (14,8 mmol) del compuesto **21**, 6,46 g (29,6 mmol) de dicarbonato de *tert*-butilo y 4,13 ml (29,6 mmol) de TEA en 45 ml de AcOEt. La reacción se lleva a cabo durante 17 h a 30 °C bajo una presión de hidrógeno de 2 bares. Después de volver a temperatura ambiente y presión atmosférica, se filtra la mezcla sobre Clarcel y se concentra a presión reducida. Se purifica el producto bruto por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 90/10. El compuesto **22** se obtiene bajo la forma de un aceite incoloro (2,92 g, 67 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,37 (s, 9 H); 3,06 (q, J = 6,1 Hz, 2 H); 3,37 (t, J = 6,1 Hz, 2 H); 3,42 (m, 2 H); 3,46 a 3,53 (m, 10 H); 4,54 (t ancho,

J=5,1 Hz, 1 H); 6,71 (t ancho, J=6,1 Hz, 1 H). LCMS (A1): ES m/z = 316 [M + Na]⁺; m/z = 194 pico de base; t_R = 2,81 min.

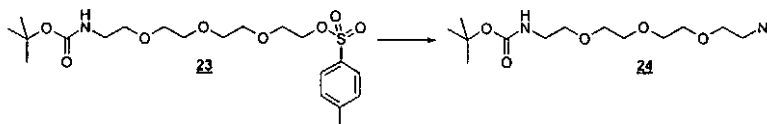
Compuesto 23: Tolueno-4-sulfonato de 2-{2-[2-(2-*tert*-butoxicarbonilamino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etilo



A una solución, purgada con argón, de 3,06 g (10,42 mmol) del compuesto **22** en 20 ml de DCM se añaden 2,53 ml (31,26 mmol) de piridina. La mezcla se enfría a 0 °C y después se añade gota a gota una solución de 2,98 g (15,63 mmol) de cloruro de tosilo en 10 ml de DCM. La agitación se continúa durante 15 h a temperatura ambiente. La mezcla se diluye en 20 ml de DCM, se lava con una solución saturada de NaHCO₃ (30 ml), con agua (2×30 ml) y con una solución saturada de NaCl (30 ml) y se seca sobre MgSO₄. Después de filtración y concentración a presión reducida, el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 90/10. El compuesto **23** se obtiene en forma de un aceite amarillo pálido (4,38 g, 94 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,37 (s, 9 H); 2,42 (s, 3 H); 3,05 (q, J = 6,1 Hz, 2 H); 3,36 (t, J = 6,1 Hz, 2 H); 3,46 (m, 8 H); 3,58 (m, 2 H); 4,10 (m, 2 H); 6,71 (t ancho, J=6,1 Hz, 1 H); 7,48 (d, J = 7,8 Hz, 2 H); 7,78 (d, J=7,8 Hz, 2 H). LCMS (A2): ES m/z = 448 [M + H]⁺; m/z = 470 [M + Na]⁺; m/z = 348 pico de base; m/z = 492 [M - H + HCO₂H]⁺; t_R = 1,00 min.

20

Compuesto 24: (2-{2-[2-(2-Azido-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etil)-carbamato de *tert*-butilo



A una solución de 4,38 g (9,79 mmol) del compuesto **23** en 25 ml de acetonitrilo, se añaden 846 mg (13,02 mmol) de azida de sodio y después se calienta la mezcla durante 6 h a reflujo. Queda compuesto de partida en proporción importante: después de volver a temperatura ambiente, se añaden 1,7 g (26,13 mmol) a la mezcla. Se mantiene la agitación durante 24 h a reflujo. Después de volver a temperatura ambiente, la mezcla se filtra sobre Clarcel y se concentra a presión reducida. Se purifica el producto bruto por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 90/10. El compuesto **24** se obtiene bajo la forma de un aceite amarillo pálido (2,16 g, 69 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,37 (s, 9 H); 3,06 (q, J = 6,1 Hz, 2 H); 3,34 a 3,43 (m, 4 H); 3,46 a 3,58 (m, 8 H); 3,60 (m, 2 H); 6,70 (t ancho, J=6,1 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 341 [M + Na]⁺; t_R = 0,81 min.

30

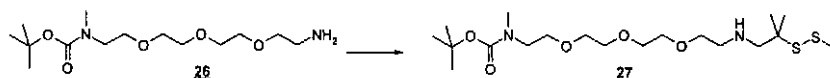
Compuesto 25: (2-{2-[2-(2-Azido-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etil)-metil-carbamato de *terc*-butilo

- A una solución, purgada con argón y enfriada a 0 °C, se añaden sucesivamente 2,06 g (6,47 mmol) del compuesto **24** en 25 ml de THF anhidro, a 0 °C, 854 mg (21,35 mmol) de NaH al 60 % en dispersión en un aceite mineral (en porciones) y 886 μ l (14,23 mmol) de yoduro de metilo. La agitación se continúa durante 1 h a 0 °C y después durante 16 h a temperatura ambiente. Se filtra la mezcla sobre Clarcel, se lava con THF y se concentra a presión reducida. Se purifica el producto bruto por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 99/1 a 90/10. El compuesto **25** se obtiene en forma de un aceite incoloro (1,67 g, 78 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,39 (s, 9 H); 2,80 (s ancho, 3 H); 3,29 (t parcialmente enmascarado, J=5,6 Hz, 2 H); 3,38 (m, 2 H); 3,46 a 3,56 (m, 10 H); 3,60 (t, J=5,4 Hz, 2 H).

Compuesto 26: (2-{2-[2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etil)-metil-carbamato de *terc*-butilo

- A una solución, purgada con argón, de 1,66 g (4,99 mmol) del compuesto **25** en 20 ml de THF se añaden sucesivamente 1,31 g (4,994 mmol) de trifenilfosfina y 108 μ l (5,99 mmol) de agua. La agitación se continúa durante 25 h 30 min y después se concentra la mezcla a sequedad y se purifica por filtración SPE sobre un cartucho SCX (Varian) acondicionado y lavado con metanol y después eluido con una solución de amoníaco 0,5 N en metanol. El compuesto **26** se obtiene en forma de un aceite incoloro (1,23 g, 80 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,39 (s, 9 H); 2,65 (t, J = 5,9 Hz, 2 H); 2,80 (s ancho, 3 H); 3,29 (t, J = 5,9 Hz, 2 H); 3,36 (t, J = 5,7 Hz, 2 H); 3,45 a 3,56 (m, 10 H). LCMS (A2): ES m/z = 307 $[M + H]^+$; t_R = 0,49 min.

- Compuesto 27:** Metil-[2-(2-[2-(2-metil-2-metildisulfanil-propilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etil)-carbamato de *terc*-butilo

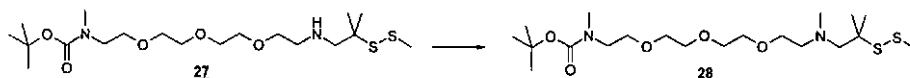


- A una solución, purgada con argón, de 131 mg (426 μ mol) del compuesto **26** en 3 ml de DCM se añaden sucesivamente 64 mg (426 μ mol) de 2-metilditio-isobutiraldehído, 126 mg (596 μ mol) de triacetoxiborohidruro de sodio y 24,4 μ l (426 μ mol) de ácido acético. La agitación se continúa durante 6 h a temperatura ambiente bajo Ar, se sofoca la reacción por adición de 1 ml de una solución acuosa de sosa 1 N y después se extrae la mezcla con 10 ml de éter dietílico. Después de concentración a presión reducida, el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/isopropanol 90/10 que no permite separar la amina residual esperada de la amina de partida. El producto obtenido se purifica de nuevo por cromatografía sobre fase inversa RP18 utilizando como eluyente una mezcla de agua/acetonitrilo

de 95/5 a 5/95. El compuesto **27** se obtiene en forma de un aceite incoloro (67 mg, 36 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,25 (s, 6 H); 1,39 (s, 9 H); 1,58 (m extendido, 1 H); 2,38 (s, 3 H); 2,59 (s, 2 H); 2,68 (t, J = 5,6 Hz, 2 H); 2,80 (s ancho, 3 H); 3,46 (t, J = 5,6 Hz, 2 H); 3,48 a 3,54 (m, 12 H). LCMS (A1): ES m/z = 441 [M + H]⁺; t_R = 3,29 min.

5

Compuesto 28: Metil-{2-[2-(2-[2-[metil-(2-méhil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etil}-carbamato de *terc*-butilo

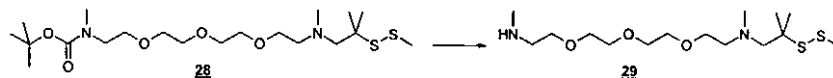


A una solución, purgada con argón y enfriada a 0 °C, de 65 mg (148 μmol) del compuesto **27** en 1 ml de DCM se añaden sucesivamente 19,5 mg (487 μmol) de NaH al 60 % en dispersión en un aceite mineral y 20 μl (325 μmol) de yoduro de metilo. La agitación se continúa durante 45 min a 0 °C y después durante 72 h a temperatura ambiente. Se filtra la mezcla sobre Clarcel y después se concentra a presión reducida. Se purifica el producto bruto por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 99/1 a 90/10. El compuesto **28** se obtiene en forma de un aceite incoloro (43 mg, 64 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,25 (s, 6 H); 1,39 (s, 9 H); 2,32 (s, 3 H); 2,39 (s, 3 H); 2,54 (m, 2 H); 2,61 (t, J = 6,1 Hz, 2 H); 2,80 (s ancho, 3 H); 3,42 a 3,54 (m, 14 H). LCMS (A2): ES m/z = 455 [M + H]⁺; t_R = 0,77 min.

15

Compuesto 29: Metil-(2-{2-[2-(2-metilamino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etil)-(2-metil-2-metil-disulfanil-propil)-amina

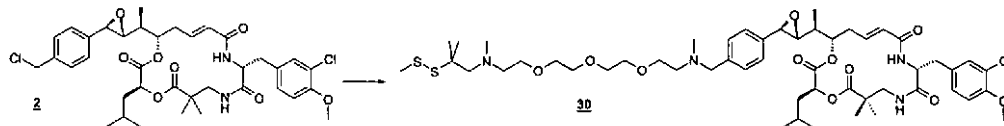
20



A una solución de 43 mg (95 μmol) del compuesto **28** en 1,5 ml de DCM se añaden 351 μl de TFA. La agitación se continúa durante 5 h a temperatura ambiente y después se concentra la mezcla a sequedad. Se purifica el producto bruto por filtración SPE sobre un cartucho SCX (Varian) acondicionado y lavado con metanol y después eluido con una solución de amoníaco 0,5 N en metanol. El compuesto **29** se obtiene en forma de un aceite incoloro (25 mg, 75 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,25 (s, 6 H); 1,75 (m extendido, 1 H); 2,27 (s, 3 H); 2,32 (s, 3 H); 2,39 (s, 3 H); 2,53 (m, 2 H); 2,57 a 2,64 (m, 4 H); 3,44 (t, J = 5,7 Hz, 2 H); 3,46 a 3,55 (m, 10 H). LCMS (A2): ES m/z = 355 [M + H]⁺; t_R = 0,30 min.

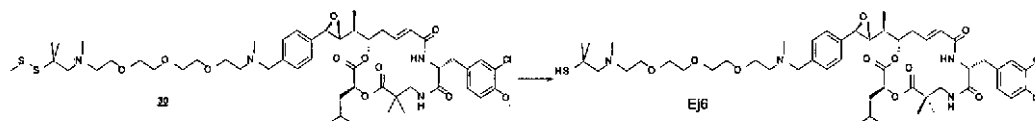
30

Compuesto 30: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-({2-[2-(2-[2-metil-2-metil-2-metildisulfanil-propil]amino-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etil]metilamino-metil}-fenil)-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



A una solución, purgada con argón, de 15,3 mg (21,3 μmol) de compuesto **2** en 1 ml de acetonitrilo anhidro se añaden sucesivamente 18,6 μl (106,6 μmol) de DIPEA y una solución de 22,7 mg (64 μmol) del compuesto **29** en 1 ml de acetonitrilo anhidro. La agitación se continúa durante 24 h bajo Ar a 40 °C. Después de volver a temperatura ambiente, la mezcla se diluye con 7 ml de AcOEt, se lava con agua (2 $\times$ 3 ml), con una solución saturada de NaHCO₃ (3 ml) y con una solución saturada de NaCl (3 ml) y se seca sobre MgSO₄. Después de filtración y concentración a presión reducida, el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol 90/10. El compuesto **30** se obtiene en forma de un sólido incoloro (14,6 mg, 66 %). RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): 0,76 (d, J = 6,1 Hz, 3 H); 0,76 (d, J = 6,1 Hz, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 1,04 (d, J = 6,8 Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,24 (s, 6 H); 1,29 (m, 1 H); 1,50 a 1,62 (m, 2 H); 1,81 (m, 1 H); 2,15 (s, 3 H); 2,27 (m, 1 H); 2,31 (s, 3 H); 2,38 (s, 3 H); 2,45 a 2,54 (m parcialmente enmascarado, 4 H); 2,60 (t, J = 6,1 Hz, 2 H); 2,63 a 2,75 (m, 2 H); 2,92 a 3,06 (m, 3 H); 3,25 a 3,35 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,44 a 3,54 (m, 14 H); 3,81 (s, 3 H); 3,87 (d, J = 2,0 Hz, 1 H); 4,25 (ddd, J=3,9 y 8,3 y 11,7 Hz, 1 H); 4,91 (dd, J = 3,4 y 9,8 Hz, 1 H); 5,11 (ddd, J=1,5 y 5,7 y 11,5 Hz, 1 H); 5,80 (dd, J = 1,5 y 15,5 Hz, 1 H); 6,47 (ddd, J=3,5 y 11,5 y 15,5 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,8 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J = 2,0 y 8,8 Hz, 1 H); 7,20 a 7,26 (m, 3 H); 7,27 a 7,33 (m, 3 H); 8,35 (d, J=8,3 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 1035 [M + H]⁺; m/z = 518 [M + 2H]²⁺ pico de base t_R = 0,86 min.

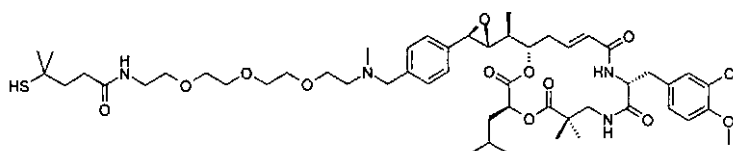
Ejemplo 6: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-({2-[2-(2-{2-metil-[2-mercapto-2-metil-propil]amino-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etil}metilamino)-metil]-fenil)-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



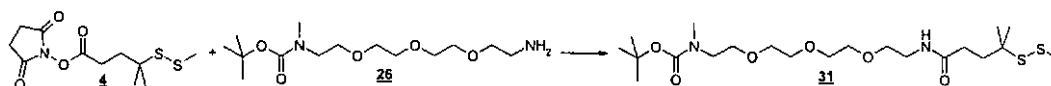
A una solución de 10,9 mg (10,5 μmol) del compuesto **30** en 1,24 ml de etanol se añade una solución de 12,06 mg (42,1 μmol) de TCEP en 1,04 ml de agua. La agitación se continúa durante 4 h a temperatura ambiente. Se diluye la mezcla con 6 ml de AcOEt, se lava con una mezcla 1/1 de agua/NH₄Cl_{sat} (6 ml) y con una solución saturada de NaCl (6 ml) y se seca sobre MgSO₄. Después de filtración y concentración a presión reducida, el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice utilizando una mezcla de DCM/metanol de 99/1 a 90/10. El compuesto **Ej6** se obtiene en forma de un sólido blanco (7,36 mg, 71 %). RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): 0,76 (d, J = 5,9 Hz, 3 H); 0,78 (d, J = 5,9 Hz, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 1,04 (d, J = 6,8 Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,25 (s, 6 H); 1,28 (m, 1 H); 1,51 a 1,62 (m, 2 H); 1,80 (m, 1 H); 2,15 (s, 3 H); 2,27 (m, 1 H); 2,34 (s, 3 H); 2,44 (s, 2 H); 2,51 (t, J = 6,4 Hz, 2 H); 2,60 (s, 1 H); 2,63 (t, J = 6,4 Hz, 2 H); 2,66 a 2,74 (m, 2 H); 2,93 a 3,04 (m, 3 H); 3,25 a 3,37 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,45 a 3,55 (m, 14 H); 3,81 (s, 3 H); 3,87 (d, J = 1,5 Hz, 1 H); 4,25 (ddd, J=3,7 y 8,0 y 11,5 Hz, 1 H); 4,91 (dd, J = 3,4 y 9,8 Hz, 1 H); 5,11 (ddd, J=1,5 y 5,6 y 11,5 Hz, 1 H); 5,80 (dd, J = 1,5

y 15,2 Hz, 1 H); 6,47 (ddd, J=3,9 y 11,5 y 15,2 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,8 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J = 2,2 y 8,8 Hz, 1 H); 7,20 a 7,26 (m, 3 H); 7,27 a 7,32 (m, 3 H); 8,35 (d, J=8,0 Hz, 1 H). LCMS (A1): ES m/z = 989 [M + H]⁺; m/z = 495 [M + 2H]²⁺ pico de base: t_R = 3,24 min.

- 5 **Ejemplo 7:** (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-{2-[2-(2-{4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etil}metilamino)-metil]-fenil}-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona

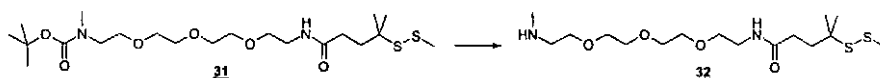


- 10 **Compuesto 31:** Metil-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etil]-carbamato de *terc*-butilo



- Se disuelven 270 mg (649 μmol) del compuesto 4 y 199 mg (649 μmol) del compuesto 26 en 1,5 ml de DMF y después se añaden a la mezcla 100 μl (714 μmol) de TEA. La agitación se continúa durante 16 h a temperatura ambiente. Se diluye la mezcla con 10 ml de AcOEt, se lava con agua (2×5 ml) y con una solución saturada de NaCl (5 ml) y se seca sobre MgSO₄. Después de filtración y concentración a presión reducida, el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 90/10. El compuesto 31 se obtiene en forma de un aceite incoloro (251 mg, 80 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,24 (s, 6 H); 1,39 (s, 9 H); 1,79 (m, 2 H); 2,16 (m, 2 H); 2,40 (s, 3 H); 2,80 (s ancho, 3 H); 3,18 (q, J = 5,9 Hz, 2 H); 3,39 (t, J = 5,9 Hz, 2 H); 3,45 a 3,54 (m, 12 H); 7,88 (t ancho, J=5,9 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 483 [M + H]⁺; m/z = 505 [M + Na]⁺; m/z = 527 [M - H + HCO₂H]⁻; t_R = 1,04 min.

- 25 **Compuesto 32:** N-(2-[2-[2-(2-Metilamino-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etil)-4-metil-4-metil-disulfanil-pentamida

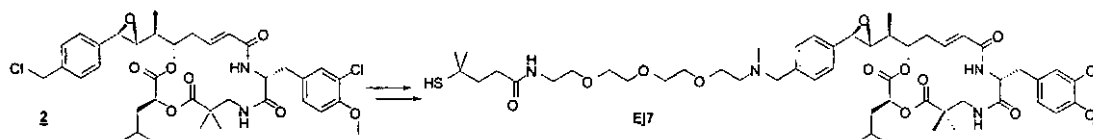


- A una solución de 251 mg (520 μmol) del compuesto 31 en 8 ml de DCM se añaden 1,93 ml (26 mmol) de TFA. La agitación se continúa durante 3 h a temperatura ambiente y después se concentra la mezcla a sequedad. El producto bruto se disuelve en el mínimo de DCM y después se trata varias veces con tolueno. Se purifica el producto bruto por filtración SPE sobre un cartucho SCX (Varian) acondicionado y lavado con metanol y después eluido con una solución de amoníaco 0,5 N en metanol. El compuesto 32 se obtiene en forma de un aceite incoloro (159

mg, 80 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,24 (s, 6 H); 1,79 (m, 2 H); 2,15 (m, 2 H); 2,27 (s, 3 H); 2,40 (s, 3 H); 2,58 (t, $J = 5,7$ Hz, 2 H); 3,18 (q, $J = 5,7$ Hz, 2 H); 3,39 (t, $J = 5,7$ Hz, 2 H); 3,44 (t, $J = 5,7$ Hz, 2 H); 3,47 a 3,54 (m, 8 H); 7,89 (t ancho, $J = 5,7$ Hz, 1 H). LCMS (A1): ES $m/z = 383$ $[\text{M} + \text{H}]^+$; $t_R = 2,68$ min.

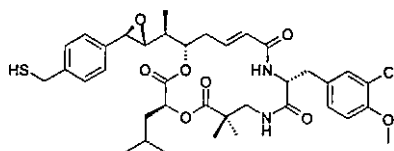
5

Ejemplo 7: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-[(2R,3R)-3-{4-[4-({2-[2-(2-{4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etil}metilamino)-metil]-fenil)-oxiranil]-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona

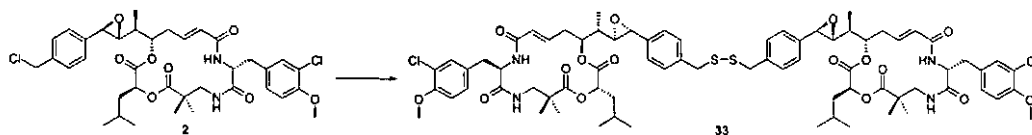


- 10 El ejemplo 7 se puede obtener por sustitución nucleófila del grupo cloro del derivado 2 por la amina 32 aplicando el método descrito para la preparación del compuesto 30 y después por reducción del disulfuro aplicando el método descrito para la preparación del ejemplo 6.

- 15 **Ejemplo 8:** (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-[(2R,3R)-3-(4-mercaptometil-fenil)-oxiranil]-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



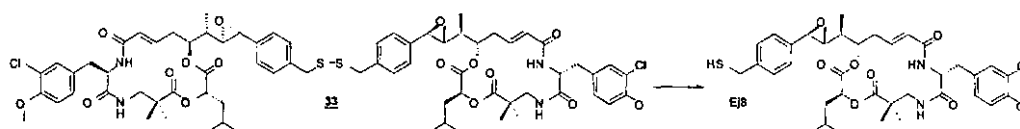
Compuesto 33: dímero del ejemplo 8



- 20 El compuesto 2 (24,5 mg; 34,1 μmol) se disuelve en THF anhidro (2,5 ml) y la mezcla se enfría a -10 $^{\circ}\text{C}$ antes de añadir hexametildisilano (44,3 μmol) y después una solución de fluoruro de tetrabutilamonio 1 M en THF (40,9 μmol). La mezcla se lleva de nuevo a temperatura ambiente y la agitación se continúa durante 1 h 30 min. Se diluye la mezcla por adición de AcOEt (5 ml) y la fase orgánica se lava con una solución acuosa saturada de NH_4Cl (5 ml). La fase acuosa se extrae con AcOEt (2 $\times$ 5 ml). Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una solución acuosa saturada de NaCl (5 ml). Después de secado sobre MgSO_4 y filtración, los disolventes se evaporan a presión reducida. El producto bruto de la reacción se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 97/3. Se obtiene un sólido blanco, el compuesto 33 (19 mg; 78 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 0,78 (m, 12 H); 1,00 (s, 6 H); 1,04 (d, $J = 6,8$ Hz, 6 H); 1,11 (s, 6 H); 1,30 (m, 2 H); 1,49 – 1,63 (m, 4 H); 1,82 (m, 2 H);
- 25
- 30

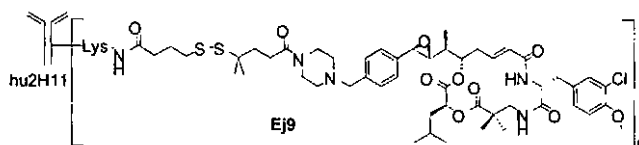
2,26 (m, 2 H); 2,63 – 2,72 (m, 4 H); 2,93 – 3,05 (m, 6 H); 3,25 – 3,37 (m parcialmente enmascarado, 2 H); 3,81 (s, 6 H); 3,82 (s, 4 H); 3,89 (d, J = 2,0 Hz, 2 H); 4,25 (ddd, J=3,7, 8,0 y 11,5 Hz, 2 H); 4,91 (dd, J=3,7, 9,6 Hz, 2 H); 5,10 (ddd, J=1,3, 5,3 y 10,8 Hz, 2 H); 5,79 (dd, J=1,3, 15,3 Hz, 2 H); 6,47 (ddd, J=3,7, 10,8 y 15,3 Hz, 2 H); 7,05 (d, J = 8,6 Hz, 2 H); 7,17 (dd, J=2,0, 8,6 Hz, 2 H); 7,22 (dd, J=2,5, 9,3 Hz, 2 H); 7,26 – 7,32 (m, 10 H); 8,34 (d, J=8,0 Hz, 2 H). LCMS (A2): ES m/z = 1427 [M + H]⁺; t_R = 1,31 min.

Ejemplo 8: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-((S)-1-[(2R,3R)-3-(4-mercaptometil-fenil)-oxiranil]-etil)-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



El compuesto **33** (11 mg; 7,7 μmol) se disuelve en metanol (8,8 ml). Se añade a continuación TCEP (76,7 μmol) en solución en 2,2 ml de agua y se agita la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente. Se diluye la mezcla en 20 ml de AcOEt y la fase orgánica se lava con una mezcla 1/1 de agua y de una solución acuosa saturada de NH₄Cl (20 ml). La fase acuosa se extrae con AcOEt (2×15 ml). Las fases orgánicas se reúnen y se lavan con una solución acuosa saturada de NaCl (15 ml). Después de secado sobre MgSO₄ y filtración, los disolventes se evaporan a presión reducida. El producto bruto de la reacción se purifica por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 95/5. Se obtiene un sólido blanco, **Ej8** (4,7 mg; 31 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 0,79 (d, J = 6,4 Hz, 6 H); 1,00 (s, 3 H); 1,05 (d, J = 6,9 Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,30 (m, 1 H); 1,50 – 1,63 (m, 2 H); 1,80 (m, 1 H); 2,27 (m, 1 H); 2,62 – 2,75 (m, 2 H); 2,84 (t ancho, J=6,5 Hz, 1 H); 2,93 – 3,06 (m, 3 H); 3,34 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,73 (d ancho, J=6,5 Hz, 2 H); 3,81 (s., 3 H); 3,87 (d, J = 1,6 Hz, 1 H); 4,25 (ddd, J=3,7, 8,0 y 11,4 Hz, 1 H); 4,91 (dd, J=3,6, 9,6 Hz, 1 H); 5,11 (ddd, J=1,3, 5,3 y 11,4 Hz, 1 H); 5,79 (dd, J=1,3, 15,2 Hz, 1 H); 6,47 (ddd, J=3,4, 11,3 y 15,2 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,5 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J=1,9, 8,5 Hz, 1 H); 7,22 (dd, J=2,3, 9,5 Hz, 1 H); 7,25 (d, J = 8,3 Hz, 2 H); 7,28 (d, J = 1,9 Hz, 2 H); 7,35 (d, J = 8,3 Hz, 2 H); 8,34 (d, J=8,0 Hz, 2 H). LCMS (A2): ES m/z = 715 [M ++ H]⁺; m/z = 713 [M-H]⁻; t_R = 1,18 min.

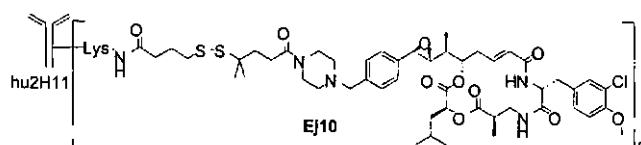
Ejemplo 9: hu2H11-SPDB-Ex1



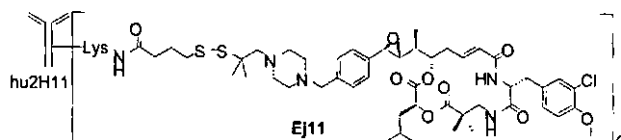
Según el método general en dos etapas, se tratan 10,4 mg (0,071 μmol, 1,174 ml) de anticuerpo desnudo hu2H11 a una concentración inicial de 8,86 mg/ml con 7 equivalentes del éster N-

hidroxi-succinimidilo del ácido 4-(2-pirilditio)butanoico (0,16 mg, 0,496 μ mol) en solución en 34,2 μ l de DMA de tal manera que la concentración final en anticuerpo sea de 8 mg/ml en la mezcla. Después de purificación, se obtienen 2,2 ml de anticuerpo hu2H11 modificado a una concentración de 4,28 mg/ml (9,42 mg, 91 %) con una media de 4,68 moléculas de pirildisulfuros por anticuerpo. Se tratan 1,68 ml (7,2 mg, 0,049 μ mol) de anticuerpo hu2H11 modificado con 1,03 mg de (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-(4-mercapto-4-metil-pentanoil)-piperazin-1-ilmetil]-fenil}-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona (compuesto **Ej1**, 1,148 μ mol) en solución en 101,2 μ l de DMA. Después de purificación sobre Superdex en presencia de 10 % de NMP y concentración sobre Amicon Ultra-15, se realiza el cambio de tampón final en un tampón acuoso de pH=6,5 que contiene fosfato 0,01 M y NaCl 0,14 M. Se obtienen entonces 1,5 ml de conjugado **Ej9** a una concentración de 1,1 mg/ml con una media de 3 derivados de criptoficina por anticuerpo (HRMS) y una pureza monomérica de 99,9 %.

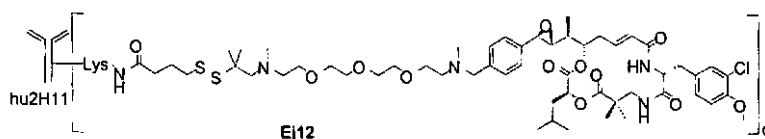
15 **Ejemplo 10: hu2H11-SPDB-Ex2**



Según el método general en una etapa, se tratan 13,5 mg (0,092 μ mol, 1,318 ml) de anticuerpo desnudo hu2H11 a una concentración inicial de 10,24 mg/ml con 6 equivalentes del éster N-hidroxi-succinimidilo del ácido 4-(2-pirilditio)butanoico (0,18 mg, 0,551 μ mol) en solución en 38,4 μ l de DMA de tal manera que la concentración final en anticuerpo sea de 9 mg/ml en la mezcla. Después de 2 h de agitación a aproximadamente 2000 rpm a temperatura ambiente, se añaden sucesivamente a 1,333 ml (12,0 mg, 0,081 μ mol) de la mezcla de anticuerpo hu2H11 modificado, 1,760 ml de tampón pH $\approx$ 7,5-8, 543 μ l de DMA y después 1,73 mg de (E)-(3S,6R,10R,16S)-10-(3-cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-(4-mercapto-4-metil-pentanoil)-piperazin-1-ilmetil]-fenil}-oxiranil)-etil]-6-metil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona (compuesto **Ej2**, 1,958 μ mol) en solución en 182 μ l de DMA. Después de purificación sobre Superdex en presencia de 20 % de NMP y concentración sobre Amicon Ultra-15, se realiza el cambio de tampón final en un tampón acuoso de pH=6,5 que contiene histidina 0,01 M, 10 % de sacarosa (p/v) y 5 % de NMP (v/v). Se obtienen entonces 1,5 ml de conjugado **Ej10** a una concentración de 2,83 mg/ml con una media de 3,7 derivados de criptoficina por anticuerpo y una pureza monomérica de 98,8 %.

Ejemplo 11: hu2H11-SPDB-Ex5

Según el método general en una etapa, se tratan 9,45 mg (0,064 μ mol, 0,923 ml) de anticuerpo desnudo hu2H11 a una concentración inicial de 10,24 mg/ml con 6 equivalentes del éster N-hidroxi-succinimidilo del ácido 4-(2-piridilditio)butanoico (0,13 mg, 0,398 μ mol) en solución en DMA de tal manera que la concentración final en anticuerpo sea de 9 mg/ml en la mezcla. Después de 2 h de agitación a aproximadamente 2000 rpm a temperatura ambiente, se añaden sucesivamente a 1,0 ml (9,0 mg, 0,061 μ mol) del medio de reacción de anticuerpo hu2H11 modificado, 1,45 ml de tampón de pH $\approx$ 7,5-8, 265 μ l de DMA y después 1,26 mg de (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-(2-mercapto-2-metil-propil)-piperazin-1-ilmetil]-fenil}-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-díaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona (compuesto EJ5, 1,472 μ mol) en solución en 285 μ l de DMA. Después de purificación sobre Superdex en presencia de 20 % de NMP y concentración sobre Amicon Ultra-15, se realiza el cambio de tampón final en un tampón acuoso de pH=6,5 que contiene histidina 0,01 M, 10 % de sacarosa (p/v) y 5 % de NMP (v/v). Se obtienen entonces 2,5 ml de conjugado EJ12 a una concentración de 1,70 mg/ml con una media de 3,7 / 3,1 derivados de criptoficina (UV / HRMS) por anticuerpo y una pureza monomérica de 98,0 %.

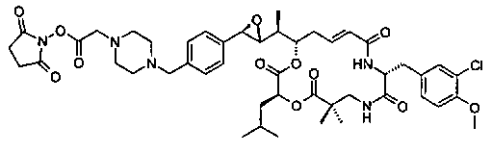
Ejemplo 12: hu2H11-SPDB-Ex6

Según el método general en una etapa, se tratan 10,31 mg (0,070 μ mol, 1,006 ml) de anticuerpo desnudo hu2H11 a una concentración inicial de 10,24 mg/ml con 6 equivalentes del éster N-hidroxi-succinimidilo del ácido 4-(2-piridilditio)butanoico (0,14 mg, 0,429 μ mol) en solución en DMA de tal manera que la concentración final de anticuerpo sea de 9 mg/ml en la mezcla. Después de 2 h de agitación a aproximadamente 2000 rpm a temperatura ambiente, se añaden sucesivamente a 1,1 ml (9,9 mg, 0,067 μ mol) de la mezcla de anticuerpo hu2H11 modificado, 1,595 ml de tampón de pH $\approx$ 7,5-8, 291 μ l de DMA y después 1,60 mg de (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-((2-[2-(2-{2-metil-[2-mercapto-2-metil-propil]amino-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etil)metilamino)-metil]-fenil}-oxiranil)-etil]-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-díaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona (compuesto EJ6, 1,617 μ mol) en solución en 314 μ l de DMA. Después de purificación sobre Superdex en presencia de 20 % de NMP y concentración sobre Amicon Ultra-15, se realiza el cambio de tampón final en un

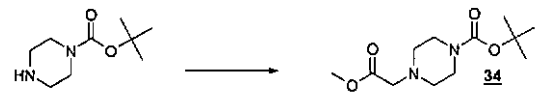
tampón acuoso de pH=6,5 que contiene histidina 0,01 M, 10 % de sacarosa (p/v) y 5 % de NMP (v/v). Se obtienen entonces 3 ml de conjugado Ej12 a una concentración de 1,97 mg/ml con una media de 3,4 derivados de criptoficina por anticuerpo (HRMS) y una pureza monomérica de 99,8 %.

5

Ejemplo 13: (4-{4-[(2R,3R)-3-((S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-[3-Cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-bencil}-piperazin-1-il)-acetato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo



10 **Compuesto 34:** 4-Metoxycarbonilmetil-piperazin-1-carboxilato de *terc*-butilo

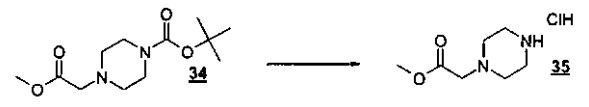


Se disuelven 200 mg (1,07 mmol) de piperazin-1-carboxilato de *terc*-butilo en acetonitrilo anhidro (10 ml). Se añaden a continuación la TEA (1,07 mmol) y después el bromoacetato de metilo (1,61 mmol). La suspensión blanca se agita durante 48 h a temperatura ambiente antes de la adición de una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (10 ml). La fase acuosa se extrae con DCM (3×10 ml), las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una solución acuosa saturada de NaCl y se secan sobre MgSO₄. Después de filtración y evaporación de los disolventes a presión reducida, se obtiene el producto bruto. Este producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla de DCM/metanol 98/2. Se obtiene entonces el producto esperado **34**, un aceite incoloro (174,8 mg; 63 %). CCM (DCM 90/MeOH 10): R_f = 0,66; RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): 1,39 (s, 9 H); 2,40 a 2,48 (m, 4 H); 3,25 (s, 2 H); 3,28 a 3,33 (m parcialmente enmascarado, 4 H); 3,61 (s, 3 H).

15

20

Compuesto 35: Hidrocloruro del piperazin-1-il-acetato de metilo

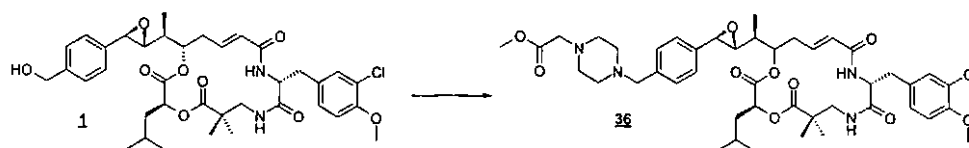


25

El compuesto **34** (174 mg; 0,67 mmol) se disuelve en dioxano anhidro (5 ml) y se añade una solución de HCl 4 M en dioxano (0,02 mmol). Se agita la mezcla durante 5 h a temperatura ambiente y después se filtra la suspensión sobre vidrio sinterizado. El sólido así obtenido se lava con dioxano (2 ml) y después con éter isopropílico (2 ml) antes de ser secado a vacío. Se obtiene un sólido beige, **35** (131 mg; 100 %). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): 2,88 a 2,97 (m, 4 H); 3,09 a 3,19 (m, 4 H); 3,53 a 3,59 (m, 2 H); 3,65 (s, 3 H); 8,65 a 9,22 (m extendido, 2 H).

30

Compuesto 36: (4-{4-[(2R,3R)-3-((S)-1-[(E)-(3S,10R,16S)-10-[3-Cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-bencil}-piperazin-1-il)-acetato de metilo

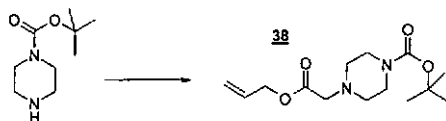


- 5 El derivado **1** (20 mg; 28,6 μmol) se disuelve en DCM anhidro (1 ml) y se añaden TEA (71,5 μmol) y después CMS (45,8 μmol). Después de 12 h a temperatura ambiente, el producto **2** formado no se ha aislado. Se añaden TEA (85,7 μmol) y después hidrocloreto de piperazin-1-il-acetato de metilo **35** (42,8 μmol). Se agita la mezcla durante 72 h suplementarias a temperatura ambiente antes de añadir DMF anhidra (1 ml) y NaI (30 μmol). Se agita la mezcla durante 48 h a
- 10 45 °C antes de diluirla con AcOEt (5 ml). La fase orgánica se lava con agua (2x2 ml), con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (2 ml) y con una solución acuosa saturada de NaCl (2 ml). Después de secado sobre MgSO_4 y filtración, los disolventes se evaporan a presión reducida. El producto bruto de la reacción se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una
- 15 mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 98/2. El compuesto **36** se obtiene en forma de un sólido blanco (8,2 mg; 34 %). CCM (DCM 90/MeOH 10): $R_f = 0,45$; RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 0,77 (d, $J = 6,1$ Hz, 3 H); 0,78 (d, $J = 6,1$ Hz, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 1,05 (d, $J = 7,1$ Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,27 a 1,32 (m, 1 H); 1,50 a 1,60 (m, 2 H); 1,74 a 1,84 (m, 1 H); 2,21 a 2,30 (m, 1 H); 2,37 (s ancho, 4 H); 2,64 a 2,74 (m, 2 H); 2,94 a 3,06 (m, 3 H); 3,18 a 3,52 (m, parcialmente enmascarado, 9 H); 3,60 (s, 3 H); 3,81 (s, 3 H); 3,87 (d, $J = 2,0$ Hz, 1 H); 4,20 a 4,31 (m, 1 H);
- 20 4,91 (dd, $J = 3,8$ y 9,9 Hz, 1 H); 5,11 (m, 1 H); 5,80 (d, $J = 15,2$ Hz, 1 H); 6,48 (ddd, $J = 3,8$ y 11,2 y 15,2 Hz, 1 H); 7,05 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H); 7,17 (dd, $J = 2,2$ y 8,3 Hz, 1 H); 7,20 a 7,33 (m, 6 H); 8,34 (d, $J = 8,1$ Hz, 1 H). LCMS (A1): ES $m/z = 839$ [$M + H$] $^+$; $m/z = 420$ [$M + 2H$] $^{2+}$ (pico de base); $m/z = 837$ [$M - H$] $^-$; $m/z = 883$ [$M + \text{HCO}_2\text{H} - H$] $^-$ (pico de base); $t_R = 3,57$ min.

- 25 **Compuesto 37:** Bromoacetato de alilo

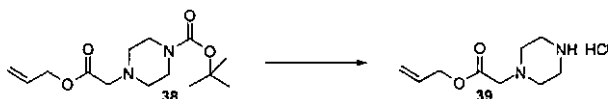


- Se disuelven en 25 ml de DCM 288 mg (4,95 mmol) de alcohol alílico. La solución se enfría a 0 °C y después se añaden 760 μl (5,45 mmol) de TEA y 3,03 mg (24,8 μmol) de DMAP. Se agita la mezcla a 0 °C y después se añade 1,0 g (4,95 mmol) de bromuro de bromoacetilo. La reacción
- 30 se continúa durante la noche a temperatura ambiente. Se añade agua a la mezcla; la fase acuosa se lava con DCM. Las fracciones orgánicas se reúnen, se lavan con agua y una solución saturada de NaCl y se secan sobre MgSO_4 . Después de filtración y evaporación de los disolventes a presión reducida, se obtiene el producto **37** (747 mg, 84 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 4,18 (s, 2 H); 4,64 (td, $J = 1,5$ y 5,4 Hz, 2 H); 5,25 (qd, $J = 1,5$ y 10,5 Hz, 1 H); 5,35
- 35 (qd, $J = 1,5$ y 17,2 Hz, 1 H); 5,92 (tdd, $J = 5,4$ y 10,5 y 17,2 Hz, 1 H).

Compuesto 38: 4-Aliloxycarbonilmetil-piperazin-1-carboxilato de *terc*-butilo

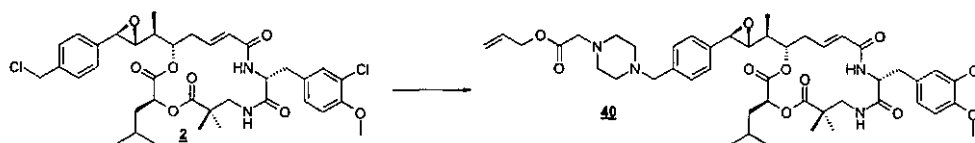
A una solución de 200 mg (1,07 mmol) de 1-Boc-piperazina en 8 ml de acetonitrilo se añaden 150 μ l (1,07 mmol) de TEA y 250 mg (1,40 mmol) de bromoacetato de alilo **37**. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se para por adición de una solución saturada de NaHCO_3 . Se extrae la mezcla con AcOEt (3 veces); las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una solución saturada de NaCl y se secan sobre MgSO_4 . Después de filtración y evaporación del disolvente a presión reducida, el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 95/5. El producto esperado **38** se obtiene en forma de un aceite amarillo (314 mg; 100 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): 1,39 (s, 9 H); 2,45 a 2,48 (m, 4 H); 3,25 a 3,34 (m parcialmente enmascarado, 6 H); 4,57 (td, $J=1,5$ y 5,6 Hz, 2 H); 5,22 (qd, $J = 1,5$ y 10,3 Hz, 1 H); 5,30 (qd, $J = 1,5$ y 17,1 Hz, 1 H); 5,83 a 5,98 (m, 1 H). LCMS (A2): ES $m/z = 285$ [$M + \text{H}$] $^+$; $m/z = 229$ pico de base; $t_R = 0,51$ min.

15

Compuesto 39: Hidrocloruro del piperazin-1-il-acetato de alilo

Se disuelven 314 mg (1,10 mmol) del compuesto **38** en 12,6 ml de dioxano y después se añaden 5,5 ml (22,0 mmol) de una solución de HCl 4 M en dioxano. La agitación se continúa durante la noche a temperatura ambiente. Se concentra la mezcla a sequedad para dar el compuesto esperado **39** en forma de un aceite amarillo (260 mg; 100 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): 2,79 a 2,88 (m, 4 H); 3,07 a 3,15 (m, 4 H); 3,48 a 3,51 (m, 2 H); 4,60 (td, $J=1,5$ y 5,6 Hz, 2 H); 5,23 (qd, $J = 1,5$ y 10,3 Hz, 1 H); 5,32 (qd, $J = 1,5$ y 7,4 Hz, 1 H); 5,86 a 5,98 (m, 1 H); 8,74 (s ancho, 2 H). LCMS (A2): ES $m/z = 185$ [$M + \text{H}$] $^+$; $t_R = 0,19$ min.

25

Compuesto 40: (4-{4-[(2R,3R)-3-((S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-[3-Cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-bencil}-piperazin-1-il)-acetato de alilo

A una solución, purgada con argón, del compuesto **2** (28,3 mg, 39,5 μ mol) en acetonitrilo anhidro (2,5 ml) se añade una solución del compuesto **39** (118,5 μ mol) y de TEA (198 μ mol) en acetonitrilo anhidro (1 ml). La agitación se continúa durante 24 h a 40 $^{\circ}\text{C}$. Se diluye la mezcla

30

con AcOEt (10 ml). La fase orgánica se lava con agua (10 ml), con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (10 ml) y con una solución acuosa saturada de NaCl (10 ml). Después de secado sobre MgSO_4 y filtración, los disolventes se evaporan a presión reducida. El producto bruto de la reacción se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla de DCM/metanol 98/2. El compuesto **40** se obtiene en forma de un sólido blanco (19,2 mg; 56 %).

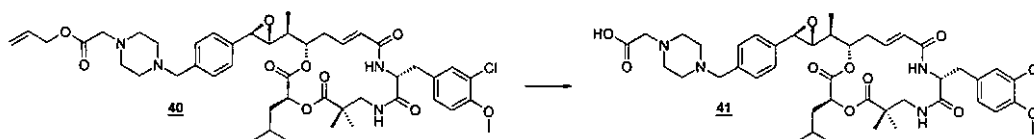
5 RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6): 0,75 (d, $J = 6,3$ Hz, 3 H); 0,77 (d, $J = 6,3$ Hz, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 1,05 (d, $J = 6,9$ Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,25 a 1,33 (m, 1 H); 1,50 a 1,61 (m, 2 H); 1,74 a 1,84 (m, 1 H); 2,27 (dt, $J = 11,3$ y $14,2$ Hz, 1 H); 2,32 a 2,42 (m, 4 H); 2,52 (m parcialmente enmascarado, 4 H); 2,64 a 2,74 (m, 2 H); 2,94 a 3,05 (m, 3 H); 3,25 (s, 2 H); 3,32 a 3,35 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,40 a 3,48 (m, 2 H); 3,81 (s, 3 H); 3,87 (d, $J = 1,6$ Hz, 1 H); 4,25 (ddd, $J = 3,7$ y 8,0 y 11,6 Hz, 1 H); 4,56 (td, $J = 1,5$ y 5,5 Hz, 2 H); 4,91 (dd, $J = 3,7$ y 9,7 Hz, 1 H); 5,11 (m, 1 H); 5,21 (qd, $J = 1,5$ y 10,5 Hz, 1 H); 5,30 (qd, $J = 1,5$ y 17,3 Hz, 1 H); 5,80 (d, $J = 16,2$ Hz, 1 H); 5,86 a 5,95 (m, 1 H); 6,47 (ddd, $J = 3,8$ y 11,2 y 15,2 Hz, 1 H); 7,05 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H); 7,17 (dd, $J = 2,2$ y 8,5 Hz, 1 H); 7,19 a 7,32 (m, 6 H); 8,34 (d, $J = 8,0$ Hz, 1 H). LCMS (A2): ES $m/z = 865$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$; $m/z = 433,5$ [$\text{M} + 2\text{H}$] $^{2+}$ (pico de base); $m/z = 863$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$; $m/z = 909$ [$\text{M} + \text{HCO}_2\text{H} - \text{H}$] $^-$; $t_R = 0,92$ min.

10

15

Compuesto 41: Ácido (4-{4-[(2R,3R)-3-((S)-1-[(E)-(3S,10R,16S)-10-[3-cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-bencil}-piperazin-1-il)-acético

20

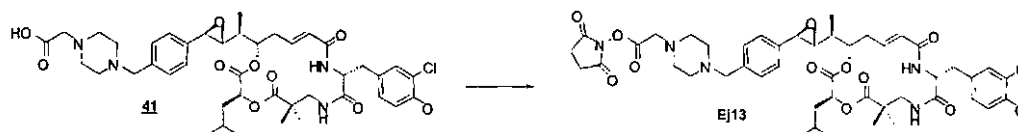


A una solución bajo argón del compuesto **40** (12,8 mg, 14,8 μmol) en THF anhidro se añaden tetrakis(trifenilfosfina)paladio (1,48 μmol) y morfolina (148 μmol). Después de 3 h de reacción, se concentra la mezcla a sequedad y se recoge en 5 ml de DCM. La fase orgánica se lava con una solución de 1 ml de HCl 0,1 N en 3 ml de agua ($\text{pH} \approx 5$), se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se evapora para dar el compuesto **41** (6,7 mg, 55 %).

25 RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6): 0,76 (d, $J = 6,0$ Hz, 3 H); 0,78 (d, $J = 6,0$ Hz, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 1,05 (d, $J = 6,9$ Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,28 (m, 1 H); 1,52 a 1,59 (m, 2 H); 1,76 a 1,84 (m, 1 H); 2,21 a 2,32 (m, 1 H); 2,42 (d, $J = 6,6$ Hz, 4 H); 2,58 a 2,76 (m, 6 H); 2,97 a 3,09 (m, 3 H); 3,14 (s ancho, 2 H); 3,33 (m enmascarado, 1 H); 3,46 (s ancho, 2 H); 3,81 (s, 3 H); 3,87 (d, $J = 1,8$ Hz, 1 H); 4,20 a 4,29 (m, 1 H); 4,89 a 4,93 (m, 1 H); 5,06 a 5,14 (m, 1 H); 5,80 (d, $J = 15,2$ Hz, 1 H); 6,43 a 6,50 (m, 1 H); 7,05 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H); 7,17 (dd, $J = 2,2$ y 8,5 Hz, 1 H); 7,20 a 7,32 (m, 6 H); 8,34 (d, $J = 8,0$ Hz, 1 H). LCMS (A2): ES $m/z = 825$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$; $m/z = 413$ [$\text{M} + 2\text{H}$] $^{2+}$ (pico de base); $m/z = 823$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$; $t_R = 0,86$ min.

30

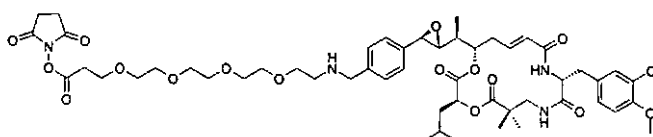
Ejemplo 13: (4-{4-[(2R,3R)-3-((S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-[3-Cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-bencil}-piperazin-1-il)-acetato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo



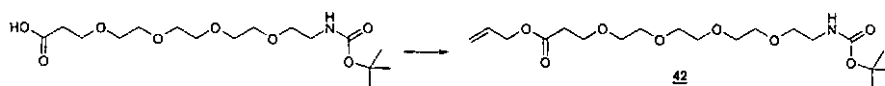
- 5 El ejemplo 13 se puede obtener activando el ácido 41 según el método descrito para el ejemplo 18.

Ejemplo 14: (2-{2-[2-(2-{4-[(2R,3R)-3-((S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-[3-Cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-bencilamino}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo

10



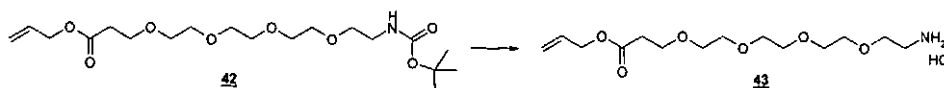
Compuesto 42: 3-(2-{2-[2-(2-terc-Butoxicarbonilamino-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoato de aliilo



- 15 A una solución de ácido Boc-15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (50 mg, 137 μ mol) en 1,25 ml de DCM se añaden sucesivamente el hidrócloruro de EDCI (164,2 μ mol), la DMAP (13,7 μ mol) y el alcohol alílico (164,2 μ mol). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h y después se evapora a sequedad. El producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 95/5. El compuesto 42 se obtiene
- 20 en forma de un aceite incoloro (37,5 mg; 67 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,37 (s, 9 H); 2,57 (t, J = 6,1 Hz, 2 H); 3,06 (q, J = 6,1 Hz, 2 H); 3,37 (t, J = 6,1 Hz, 2 H); 3,44 a 3,53 (m, 12 H); 3,64 (t, J = 6,1 Hz, 2 H); 4,55 (td, J=1,6 y 5,4 Hz, 2 H); 5,20 (qd, J = 1,6 y 10,5 Hz, 1 H); 5,30 (qd, J = 1,6 y 17,3 Hz, 1 H); 5,90 (tdd, J=5,4 y 10,5 y 17,3 Hz, 1 H); 6,70 (t ancho, J=6,1 Hz, 1 H). LCMS (A2) ES m/z = 406 [M + H] $^+$; m/z = 428 [M + Na] $^+$; m/z = 306 pico de base; t_R = 0,91 min.

25

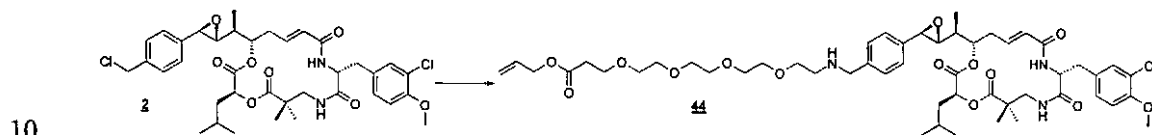
Compuesto 43: Hidrocloruro de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoato de aliilo



- A una solución del compuesto 42 (37,5 mg, 92,5 μ mol) en 2 ml de dioxano se añaden 460 μ l (1,85 mmol) de una solución de ácido clorhídrico 4 M en dioxano. La agitación se continúa a
- 30 temperatura ambiente durante la noche y después se evapora a sequedad el medio de reacción

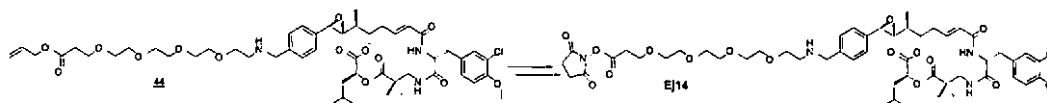
para dar el compuesto **43** en forma de un aceite incoloro (31 mg, cuantitativo). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 2,58 (t, $J = 6,1$ Hz, 2 H); 2,96 (t, $J = 5,4$ Hz, 2 H); 3,48 a 3,53 (m, 8 H); 3,55 a 3,58 (m, 4 H); 3,60 (t, $J = 5,4$ Hz, 2 H); 3,65 (t, $J = 6,1$ Hz, 2 H); 4,56 (td, $J=1,6$ y 5,4 Hz, 2 H); 5,21 (qd, $J = 1,6$ y 10,5 Hz, 1 H); 5,30 (qd, $J = 1,6$ y 17,3 Hz, 1 H); 5,91 (tdd, $J=5,4$ y 10,5 y 17,3 Hz, 1 H); 7,91 (m extendido, 3 H). LCMS (A2): ES $m/z = 306$ $[\text{M} + \text{H}]^+$; $t_R = 0,42$ min.

Compuesto 44: (2-{2-[2-(2-[4-[(2R,3R)-3-[(S)-1-[(E)-(3S,10R,16S)-10-[3-Cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il]-etil)-oxiranil]-bencilamino)-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi)-propanoato de alilo



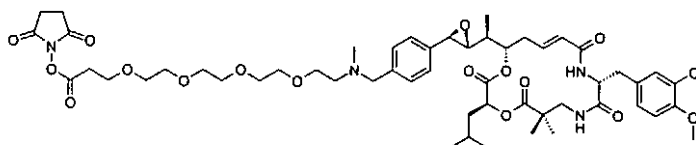
A una solución, purgada con argón, del compuesto **2** (12,7 mg, 17,7 μmol) en 1,48 ml de acetonitrilo anhidro se añaden sucesivamente 22,2 μl de TEA (159 μmol) y 30,2 mg del compuesto **43** (88,4 μmol). La agitación se continúa a 40 $^\circ\text{C}$ durante 24 h: queda compuesto **2** de partida; se añaden de nuevo a la mezcla 22,2 μl de TEA (159 μmol) y 30,2 mg del compuesto **43** (88,4 μmol) y se continúa la agitación a 40 $^\circ\text{C}$ durante 48 h suplementarias. Se añaden 2 ml de agua a la mezcla que después se extrae con 2x2 ml de AcOEt. Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una solución saturada de NaHCO_3 (2 ml) y con una solución saturada de cloruro de sodio (2 ml) y se secan sobre MgSO_4 . Después de filtración y concentración a presión reducida, el producto bruto de la reacción se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 95/5. El compuesto **44** se obtiene en forma de un sólido blanco (4,8 mg; 27 %). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): 0,77 (m, 6 H); 1,00 (s, 3 H); 1,05 (d, $J = 6,9$ Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,29 (m, 1 H); 1,49 a 1,60 (m, 2 H); 1,81 (m, 1 H); 2,26 (m, 1 H); 2,56 (t, $J = 6,1$ Hz, 2 H); 2,61 a 2,73 (m, 4 H); 2,93 a 3,04 (m, 3 H); 3,28 a 3,38 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,45 a 3,53 (m, 14 H); 3,63 (t, $J=6,1$ Hz, 2 H); 3,72 (s, 2 H); 3,81 (s, 3 H); 3,86 (s ancho, 1 H); 4,25 (ddd, $J=3,4$ y 8,2 y 11,4 Hz, 1 H); 4,55 (dm, $J=5,4$ Hz, 2 H); 4,90 (dd, $J = 3,9$ y 9,8 Hz, 1 H); 5,11 (ddd, $J=1,4$ y 5,4 y 11,2 Hz, 1 H); 5,19 (dm, $J=10,8$ Hz, 1 H); 5,29 (dm, $J=17,2$ Hz, 1 H); 5,79 (dd, $J = 1,4$ y 15,2 Hz, 1 H); 5,90 (m, 1 H); 6,47 (ddd, $J=3,9$ y 11,2 y 15,2 Hz, 1 H); 7,05 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H); 7,17 (dd, $J = 2,0$ y 8,8 Hz, 1 H); 7,21 (m, 1 H); 7,24 (d, $J = 8,3$ Hz, 2 H); 7,28 (d, $J = 2,0$ Hz, 1 H); 7,33 (d, $J = 8,3$ Hz, 2 H); 8,35 (d, $J=8,2$ Hz, 1 H). LCMS (A2): ES $m/z = 986$ $[\text{M} + \text{H}]^+$; $m/z = 493,5$ $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ pico de base; $m/z = 984$ $[\text{M}-\text{H}]^-$; $m/z = 1030$ $[\text{M} - \text{H} + \text{HCO}_2\text{H}]^-$ pico de base; $t_R = 0,95$ min.

Ejemplo 14: (2-{2-[2-(2-{4-[(2R,3R)-3-((S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-[3-Cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-bencilamino}-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-propanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo

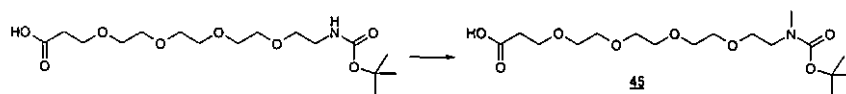


- 5 El ejemplo 14 se puede obtener desprotegiendo el compuesto 44 según el método descrito para el compuesto 41 y activando el ácido obtenido según el método descrito para el ejemplo 18.

Ejemplo 15: (2-{2-[2-(2-{4-[(2R,3R)-3-((S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-[3-Cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-benzil-metil-amino}-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-propanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo

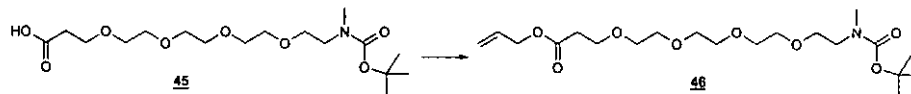


Compuesto 45: Ácido 3-[2-(2-[2-(2-(*tert*-butoxicarbonil-metil-amino)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi]-propanoico



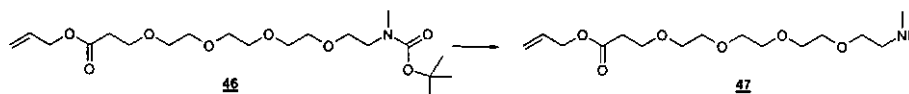
- 15 Se disuelven 520 mg (1,423 mmol) de ácido Boc-15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico en 14 ml de THF anhidro y después se enfría la mezcla a 0 °C antes de añadir, por medio de una espátula, 85,4 mg (2,135 mmol) de hidruro de sodio. La agitación se continúa durante 10 min a 0 °C y después se añaden 150,6 µl (2,419 mmol) de yoduro de metilo a 0 °C. La temperatura se
- 20 deja volver a temperatura ambiente y se continúa la agitación durante 2 h. Se añaden 8 ml de agua a la mezcla cuyo pH es acidificado a continuación por adición de ácido acético para obtener un pH≈4. Se extrae con 3×10 ml de AcOEt. Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con 10 ml de una solución saturada de NaCl y se secan sobre MgSO₄. Después de filtración y
- 25 concentración a sequedad a presión reducida, el compuesto 45 se obtiene en forma de un aceite incoloro (414 mg, 77 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,38 (s, 9 H); 2,43 (t, J = 6,4 Hz, 2 H); 2,80 (s ancho, 3 H); 3,29 (t, J = 5,9 Hz, 2 H); 3,45 a 3,52 (m, 14 H); 3,60 (t, J = 6,4 Hz, 2 H); 12,01 (m extendido, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 402 [M + Na]⁺; m/z = 378 [M-H]⁻; m/z = 280 pico de base; t_R = 0,95 min.

Compuesto 46: 3-[2-(2-[2-(2-(*tert*-Butoxicarbonil-metil-amino)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi]-propanoato de alilo



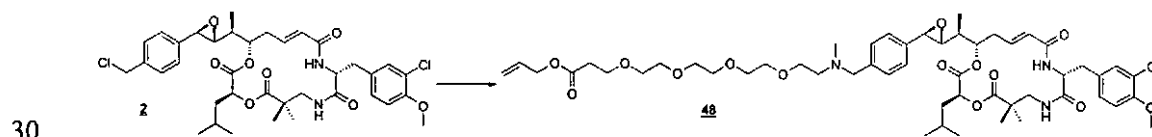
- A una solución de 540 mg (1,423 mmol) del compuesto **45** en 15 ml de DCM anhidro se añaden sucesivamente 327 mg (1,71 mmol) de EDCI, 17,4 mg (142 μ mol) de DMAP y 116 μ l (1,71 mmol) de alcohol alílico. La agitación se continúa durante 15 h a temperatura ambiente y después se concentra la mezcla a sequedad. El producto bruto obtenido se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 90/10. El compuesto **46** se obtiene en forma de un aceite incoloro (337 mg; 56 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,38 (s, 9 H); 2,57 (t, J = 6,1 Hz, 2 H); 2,80 (s ancho, 3 H); 3,22 a 3,33 (m parcialmente enmascarado, 2 H); 3,44 a 3,54 (m, 14 H); 3,64 (t, J = 6,1 Hz, 2 H); 4,55 (d ancho, J =4,9 Hz, 2 H); 5,20 (d ancho, J =10,3 Hz, 1 H); 5,30 (d ancho, J =17,1 Hz, 1 H); 5,90 (m, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 442 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; m/z = 320 pico de base; t_R = 0,98 min.

- Compuesto 47:** 3-(2-[2-(2-(2-Metilamino-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi]-propanoato de alilo



- A una solución de 337 mg (0,802 mmol) del compuesto **46** en 20 ml de DCM se añaden 1,19 ml (16,04 mmol) de TFA. La agitación se continúa durante 3 h a temperatura ambiente y después se concentra la mezcla a sequedad a presión reducida. El producto bruto se purifica por filtración SPE sobre un cartucho SCX (Varian) acondicionado y lavado con metanol y después eluido con una solución de amoníaco 0,5 N en metanol. El compuesto **47** se obtiene en forma de un aceite incoloro (208 mg, 81 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 2,27 (s, 3 H); 2,54 a 2,61 (m, 4 H); 3,44 (t, J = 5,6 Hz, 2 H); 3,47 a 3,52 (m, 12 H); 3,65 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 4,56 (d ancho, J =5,4 Hz, 2 H); 5,20 (d ancho, J =10,5 Hz, 1 H); 5,30 (d ancho, J =17,2 Hz, 1 H); 5,90 (m, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 320 $[\text{M} + \text{H}]^+$; t_R = 0,42 min.

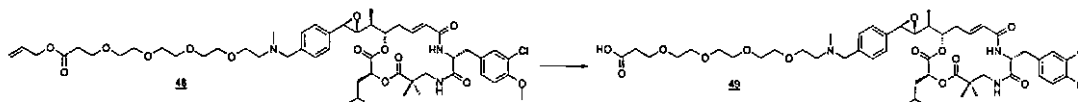
Compuesto 48: (2-[2-[2-(2-[4-[(2R,3R)-3-[(S)-1-[(E)-(3S,10R,16S)-10-[3-Cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-bencilamino)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi]-propanoato de alilo



A una solución, purgada con argón, del compuesto **2** (40 mg, 55,7 μ mol) en 5 ml de acetonitrilo anhidro se añaden sucesivamente 48,5 μ l de DIPEA (279 μ mol) y 53 mg del compuesto **47** (167 μ mol). La agitación se continúa a 40 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 h; se añaden 5 ml de agua a la mezcla que

después se extrae con 4×5 ml de AcOEt. Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una solución saturada de NaHCO₃ (5 ml) y con una solución saturada de NaCl (5 ml) y se secan sobre MgSO₄. Después de filtración y concentración a presión reducida, el producto bruto de la reacción se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 90/10. El compuesto **48** se obtiene en forma de un sólido incoloro (45,3 mg; 80 %). RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): 0,76 (d, J = 5,9 Hz, 3 H); 0,78 (d, J = 5,9 Hz, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 1,04 (d, J = 6,8 Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,29 (m, 1 H); 1,50 a 1,61 (m, 2 H); 1,80 (m, 1 H); 2,15 (s, 3 H); 2,28 (m, 1 H); 2,52 (t, J = 6,4 Hz, 2 H); 2,56 (t, J = 6,4 Hz, 2 H); 2,63 a 2,73 (m, 2 H); 2,94 a 3,06 (m, 3 H); 3,25 a 3,35 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,48 (s, 2 H); 3,49 a 3,51 (m, 12 H); 3,52 (t, J = 6,4 Hz, 2 H); 3,63 (t, J = 6,4 Hz, 2 H); 3,81 (s, 3 H); 3,87 (d, J = 1,5 Hz, 1 H); 4,25 (ddd, J=3,4 y 8,3 y 11,5 Hz, 1 H); 4,55 (d ancho, J=5,0 Hz, 2 H); 4,91 (dd, J = 3,7 y 9,5 Hz, 1 H); 5,11 (ddd, J=1,5 y 5,7 y 11,5 Hz, 1 H); 5,19 (dm, J=10,3 Hz, 1 H); 5,29 (dm, J=17,6 Hz, 1 H); 5,80 (dd, J = 1,5 y 15,2 Hz, 1 H); 5,90 (m, 1 H); 6,47 (ddd, J=3,7 y 11,5 y 15,2 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,5 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J = 2,0 y 8,5 Hz, 1 H); 7,22 (dd, J = 2,9 y 9,8 Hz, 1 H); 7,25 (d, J = 8,3 Hz, 2 H); 7,28 (d, J = 2,0 Hz, 1 H); 7,30 (d, J = 8,3 Hz, 2 H); 8,35 (d, J=8,3 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 1000 [M+H]⁺; m/z = 500,5 [M + 2H]²⁺; m/z = 1044 [M - H + HCO₂H]⁻; t_R = 1,01 min.

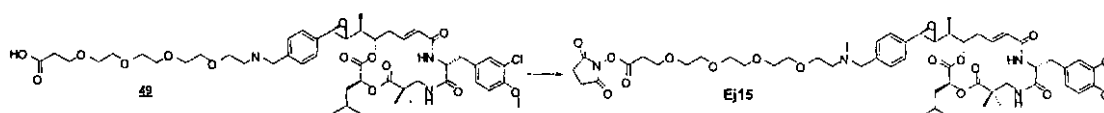
Compuesto 49: Ácido (2-{2-[2-(2-{4-[(2R,3R)-3-((S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-[3-cloro-4-metoxibencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil]-oxirani]-bencilamino)-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi)-propanoico



Se disuelven 19 mg (18,9 μmol) del compuesto **48** en 3,8 ml de THF anhidro y se purgan con argón. Se añaden 6 μl (18,9 μmol) de dietilamina a la mezcla que se agita durante 15 min a temperatura ambiente antes de añadir 4,45 mg (19,8 μmol) de acetato de paladio (II) y 18,89 mg de trifenilfosfina sobre soporte. La agitación se continúa durante 6 días a temperatura ambiente: queda producto de partida pero la reacción no evoluciona más. La mezcla se filtra, se concentra a sequedad, se recoge en 2 ml de THF anhidro y se trata con 10 μl (31,5 μmol) de dietilamina y 10 mg de tetrakis(trifenil-fosfina)paladio durante 1 h. Se hidroliza la mezcla con 2 ml de una solución acuosa de hidrogenosulfato de sodio 2 M y se extrae con 3 × 2 ml de DCM. Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una solución saturada de NaCl (2 ml) y se secan sobre MgSO₄. Después de filtración y concentración a presión reducida, el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice injertada con diol eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 90/10. El compuesto **49** se obtiene en forma de un sólido incoloro (5,4 mg; 30 %). RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): 0,76 (t, J = 5,9 Hz, 3 H); 0,78 (t, J = 5,9 Hz, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 1,04 (d, J = 6,8 Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,31 (m, 1 H); 1,51 a 1,62 (m, 2 H); 1,80 (m, 1 H); 2,15 (s, 3 H); 2,28 (m, 1 H); 2,42 (t, J = 6,4 Hz, 2 H); 2,52 (t, J = 6,4 Hz, 2 H); 2,64 a 2,73 (m, 2

H); 2,94 a 3,04 (m, 3 H); 3,25 a 3,44 (m parcialmente enmascarado, 3 H); 3,45 a 3,51 (m, 12 H); 3,53 (t, J = 6,4 Hz, 2 H); 3,59 (t, J = 6,4 Hz, 2 H); 3,81 (s, 3 H); 3,87 (d, J = 2,0 Hz, 1 H); 4,25 (ddd, J=4,2 y 7,8 y 11,5 Hz, 1 H); 4,91 (dd, J = 3,4 y 9,8 Hz, 1 H); 5,11 (dd, J = 5,4 y 11,2 Hz, 1 H); 5,80 (d, J = 15,2 Hz, 1 H); 6,47 (ddd, J=3,7 y 11,2 y 15,2 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,3 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J = 2,0 y 8,3 Hz, 1 H); 7,21 a 7,27 (m, 3 H); 7,28 a 7,32 (m, 3 H); 8,38 (d ancho, J=7,8 Hz, 1 H); 11,22 (m muy extendido, 1H). LCMS (A2): ES m/z = 960 [M+H]⁺; m/z = 480,5 [M + 2H]²⁺ pico de base; m/z = 958 [M-H]⁻; t_R = 0,90 min.

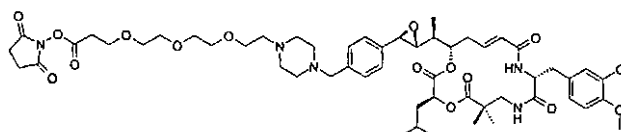
Ejemplo 15: Ácido (2-{2-[2-(2-{4-[(2R,3R)-3-((S)-1-{(E)-(3S,10R,16S)-10-[3-cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil]-oxiranil]-bencilamino}-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-propanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo



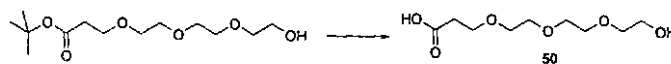
El ejemplo 15 se puede preparar activando el ácido 49 según el método descrito para el ejemplo 18.

15

Ejemplo 16: (2-{2-[2-(4-[(2R,3R)-3-[(S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-{3-Cloro-4-metoxi-bencil}-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil]-oxiranil]-bencil-piperazin-1-il)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-propanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo



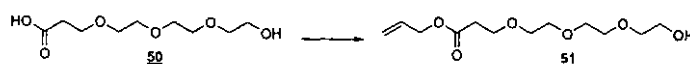
Compuesto 50: Ácido 3-{2-[2-(2-hidroxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoico



A una solución de 300 mg (1,08 mmol) de 12-hidroxi-4,7,10-trioxadodecanoato de *terc*-butilo en 6 ml de DCM se añaden 1,6 ml (21,56 mmol) de TFA. La agitación se continúa a temperatura ambiente durante 3 h. Se concentra la mezcla a sequedad, se recoge en el mínimo de DCM y se trata varias veces con tolueno para dar el compuesto 50 en forma de un aceite amarillo pálido (240 mg, cuantitativo).

25

Compuesto 51: 3-{2-[2-(2-Hidroxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de alilo

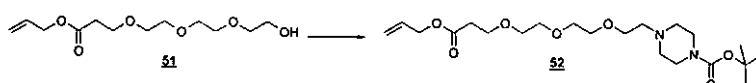


A una solución de 240 mg (1,08 mmol) del compuesto 50 en 3 ml de DCM se añaden sucesivamente 248 mg (1,29 mmol) de EDCI, 13,2 mg (1,29 mmol) de DMAP y 88 µl (1,29 mmol) de alcohol alílico. La agitación se continúa a temperatura ambiente durante 15 h y después se concentra la mezcla a sequedad a presión reducida y el producto bruto se purifica por

30

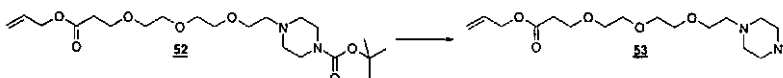
cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 90/10. El compuesto **51** se obtiene en forma de un aceite incoloro (144 mg, 51 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 2,57 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 3,41 (m, 2 H); 3,46 a 3,52 (m, 10 H); 3,65 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 4,52 (t, J = 5,5 Hz, 1 H); 4,56 (m, 2 H); 5,20 (dm, J=10,5 Hz, 1 H); 5,50 (dm, J=17,4 Hz, 1 H); 5,90 (m, 1 H).

Compuesto 52: 4-(2-{2-[2-(2-Aliloxycarbonil-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etil)-piperazin-1-carboxilato de *terc*-butilo



- 10 A una solución, enfriada a 0 °C, de 94 mg (357 μmol) del compuesto **51** en 3,7 ml de DCM se añaden sucesivamente 125 μl (893 μmol) de TEA y 30,4 μl (393 μmol) de cloruro de mesilo, y se continúa la agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Se concentra la mezcla a sequedad a presión reducida y después se recoge en 5 ml de acetonitrilo. Se añaden a la solución 249 μl (1,785 mmol) de TEA y 200 mg (1,071 mmol) de Boc-piperazina y la mezcla se agita y se
- 15 calienta durante 15 h a 40 °C. Después de volver a temperatura ambiente, se concentra la mezcla a sequedad y se purifica por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 90/10. El compuesto **52** se obtiene en forma de un aceite incoloro (69 mg, 45 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,39 (s, 9 H); 2,33 (m, 4 H); 2,46 (t, J = 5,9 Hz, 2 H); 2,57 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 3,28 (m parcialmente enmascarado, 4 H); 3,45 a 3,53 (m, 10 H); 3,64 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 4,55 (m, 2 H); 5,20 (dm, J=10,5 Hz, 1 H); 5,30 (dm, J=17,2 Hz, 1 H); 5,90 (m, 1 H).
- 20

Compuesto 53: 3-{2-[2-(2-Piperazin-1-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de alilo

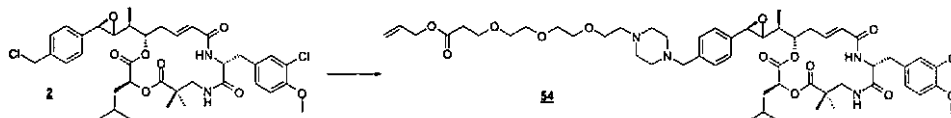


- 25 A una solución de 110 mg (256 μmol) del compuesto **52** en 10 ml de DCM se añaden 380 μl (5,11 mmol) de TFA. La agitación se continúa durante 24 h a temperatura ambiente. Se concentra la mezcla a sequedad, se recoge en el mínimo de DCM y se trata varias veces con tolueno. El producto bruto se purifica por filtración SPE sobre un cartucho SCX (Varian) acondicionado y lavado con metanol y después eluido con una solución de amoníaco 0,5 N en metanol. El compuesto **53** se obtiene en forma de un aceite incoloro (47 mg, 55 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 2,58 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 3,10 a 3,36 (m ancho, 6 H); 3,45 a 3,78 (m parcialmente enmascarado, 16 H); 4,56 (m, 2 H); 5,20 (dm, J=10,5 Hz, 1 H); 5,30 (dm, J=17,2 Hz, 1 H); 5,90 (m, 1 H); 9,00 (m extendido, 1 H).
- 30

35

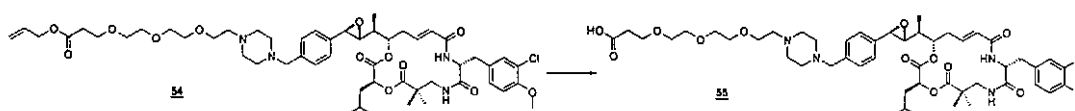
Compuesto 54: (2-{2-[2-(4-[(2R,3R)-3-[(S)-1-[(E)-(3S,10R,16S)-10-{3-Cloro-4-metoxi-bencil}-3-

isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil]-oxiranil]-benzil-piperazin-1-il)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoato de alilo



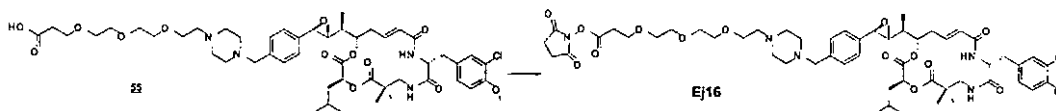
El compuesto **54** se puede obtener por sustitución nucleófila del grupo cloro del derivado **2** por la amina **53** aplicando el método descrito para la preparación del compuesto **30**.

Compuesto 55: Ácido (2-{2-[2-(4-{(2R,3R)-3-[(S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-{3-cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil]-oxiranil]-benzil-piperazin-1-il)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-propanoico



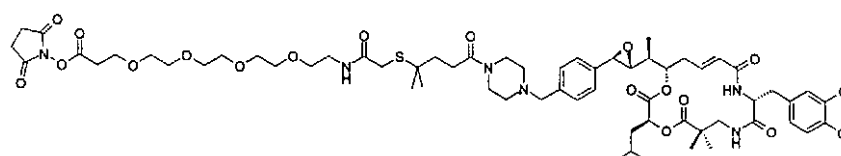
El compuesto **55** se puede obtener según el método descrito para el compuesto **41**.

Ejemplo 16: (2-{2-[2-(4-{(2R,3R)-3-[(S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-{3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil]-oxiranil]-benzil-piperazin-1-il)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-propanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo

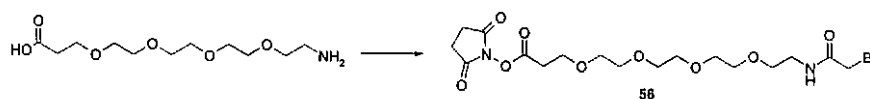


El ejemplo **16** se puede obtener según el método descrito para el ejemplo **18**.

Ejemplo 17: 3-(2-{2-[2-(2-{2-[4-(4-{4-[(2R,3R)-3-[(S)-1-((E)-(10R,16S)-10-{3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil]-oxiranil]-benzil)-piperazin-1-il)-1,1-dimetil-4-oxo-butilsulfanil]-acetilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo



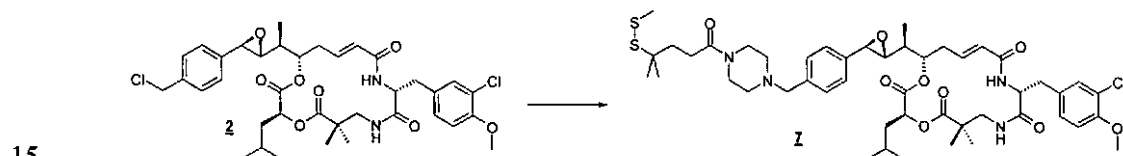
Compuesto 56: 3-(2-{2-[2-(2-{2-Bromo-acetilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-etoxi)-propanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo



A una solución de ácido 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico (671 mg, 2,53 mmol) en el DCM (10 ml) se añade una solución de bromoacetato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo

(2,53 mmol) en 4,7 ml de DCM. La agitación se continúa durante 15 min a temperatura ambiente y después se añade DCC a la mezcla. Después de 4 h de reacción, la mezcla se filtra sobre vidrio sinterizado y después se evapora el filtrado y se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 99/1 a 94/6. El aceite obtenido (800 mg) se purifica de nuevo por cromatografía sobre gel de sílice injertada con ciano, eluyendo con una mezcla de DCM/metanol 99/1. Se obtiene el compuesto **56** en forma de un aceite incoloro (611 mg, 50 %). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): 2,81 (s, 4 H); 2,92 (t, J = 5,9 Hz, 2 H); 3,23 (q, J = 5,9 Hz, 2 H); 3,43 (t, J = 5,9 Hz, 2 H); 3,48 a 3,55 (m, 12 H); 3,72 (t, J = 5,9 Hz, 2 H); 3,85 (s, 2 H); 8,30 (t ancho, J=5,9 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 483 $[\text{M} + \text{H}]^+$; m/z = 481 $[\text{M} - \text{H}]^-$; t_R = 0,51 min.

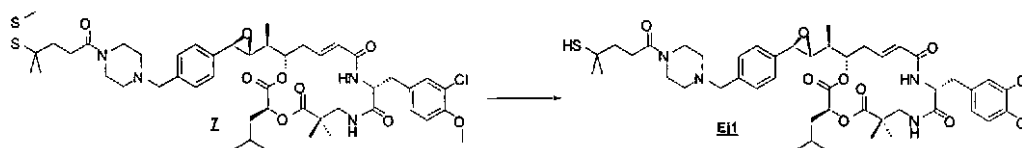
Compuesto 7: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-ilmetil]-fenil}-oxiranil)-etil]-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



A una solución purgada con argón del compuesto **2** (19,8 mg, 27,6 μmol) en acetonitrilo anhidro (2,5 ml) se añaden sucesivamente TEA (138 μmol) y el hidrocloreuro de la 4-metil-4-metildisulfanil-1-piperazin-1-il-pentan-1-ona **6** (83 μmol). La agitación se continúa a 40 °C durante 24 h y después se diluye la mezcla con AcOEt (10 ml). La fase orgánica se lava con agua (2 $\times$ 10 ml), con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (10 ml) y con una solución acuosa saturada de NaCl (10 ml). Después de secado sobre MgSO_4 y filtración, los disolventes se evaporan a presión reducida. El producto bruto de la reacción se purifica por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 99/1 a 90/10. Se obtiene un polvo blanco, **7** (19,4 mg; 75 %). CCM (DCM 90/MeOH 10): R_f =0,6; RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 0,75 – 0,81 (m, 6 H); 1,01 (s, 3 H); 1,05 (d, J = 6,8 Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,26 (s, 6 H); 1,28 – 1,33 (m, 1 H); 1,52 – 1,61 (m, 2 H); 1,76 – 1,83 (m, 2 H); 2,27 – 2,38 (m, 4 H); 2,39 (s, 3 H); 2,64 – 2,74 (m, 2 H); 2,95 – 3,05 (m, 2 H); 3,24 – 3,34 (m, 6 H); 3,44 (br. s., 4 H); 3,49 (s, 2 H); 3,81 (s, 3 H); 3,88 (d, J = 1,7 Hz, 1 H); 4,22 – 4,29 (m, 1 H); 4,92 (dd, J=9,9, 3,5 Hz, 1 H); 5,08 – 5,15 (m, 1 H); 5,81 (d, J = 14,2 Hz, 1 H); 6,48 (ddd, J=15,2, 11,3, 3,5 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,6 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J=8,4, 2,3 Hz, 1 H); 7,22 (d, J = 9,3 Hz, 1 H); 7,25 – 7,34 (m, 5 H); 8,34 (d, J=8,1 Hz, 1 H). LCMS (A1): ES m/z = 943 $[\text{M} + \text{H}]^+$; m/z = 941 $[\text{M} - \text{H}]^-$; t_R = 4,03 min.

Nota: el compuesto **7** se puede preparar igualmente a partir de G=OMs (véase el ejemplo 1)

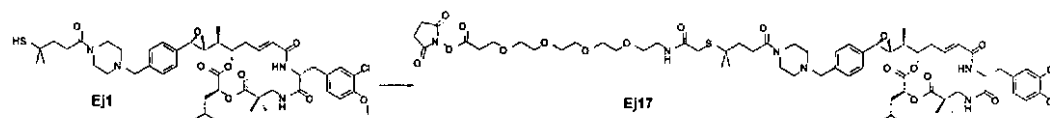
Compuesto Ej1: (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[4-(4-mercapto-4-metil-pentanoil)-piperazin-1-ilmetil]-fenil}-oxiranil)-etil]-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



- 5 El compuesto **7** (17,9 mg; 18,97 μmol) se disuelve en una mezcla de etanol (2,2 ml) / agua (1,8 ml) y se agita la mezcla. Se adiciona a continuación TCEP (47,4 μmol) y se agita la mezcla durante 3 h a temperatura ambiente, y después se diluye por adición de AcOEt (20 ml) y la fase orgánica se lava con una mezcla 1/1 de agua y de una solución acuosa saturada de NH_4Cl (20 ml) y después con 20 ml de una solución saturada de NaCl . Después de secado de la fase
- 10 orgánica sobre MgSO_4 , filtración y evaporación de los disolventes a presión reducida, el producto **Ej1** se obtiene bajo la forma de un sólido blanco (15,6 mg; 92 %). CCM (DCM 90/MeOH 10): R_f = 0,56; RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 0,76 – 0,81 (m, 6 H); 1,01 (s, 3 H); 1,06 (d, J = 6,8 Hz, 3 H); 1,13 (s, 3 H); 1,24 (s, 6 H); 1,27 – 1,31 (m, 1 H); 1,56 – 1,64 (m, 2 H); 1,73 – 1,85 (m, 3 H); 2,26 – 2,33 (m, 3 H); 2,36 – 2,45 (m, 4 H); 2,63 – 2,75 (m, 2 H); 2,95 – 3,06 (m, 3 H); 3,34 – 3,36 (m, 1
- 15 H); 3,42 – 3,51 (m, 6 H); 3,82 (s, 3 H); 3,89 (s, 1 H); 4,22 – 4,29 (m, 1 H); 4,92 (dd, J =9,8, 3,4 Hz, 1 H); 5,12 (dd, J =10,8, 4,9 Hz, 1 H); 5,81 (d, J = 15,2 Hz, 1 H); 6,48 (ddd, J =15,0, 11,4, 3,4 Hz, 1 H); 7,06 (d, J = 8,3 Hz, 1 H); 7,18 (dd, J =8,3, 1,5 Hz, 1 H); 7,24 (d, J = 9,8 Hz, 1 H); 7,26 – 7,36 (m, 5 H); 8,37 (d, J =7,8 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 897 $[\text{M} + \text{H}]^+$; m/z = 895 $[\text{M} - \text{H}]^-$; t_R = 0,97 min.

20

Ejemplo 17: 3-(2-{2-[2-(2-{4-[4-{(2R,3R)-3-[(S)-1-[(E)-(10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il]-etil]-oxiranil]-bencil)-piperazin-1-il]-1,1-dimetil-4-oxo-butilsulfanil]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo

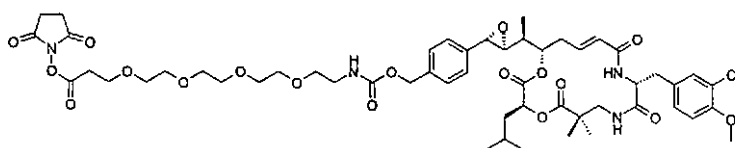


25

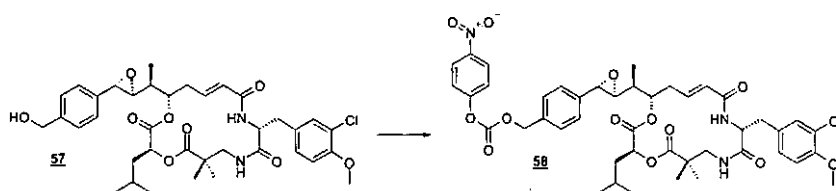
- A una solución, purgada con argón, del compuesto **Ej1** (15,6 mg, 17,8 μmol) en acetonitrilo anhidro (1,0 ml) se añaden sucesivamente la DIPEA (19,12 μmol) y el compuesto **56** (19,12 μmol). La agitación se continúa a temperatura ambiente durante 4 h y después se añaden 29,5 μmol suplementarios de DIPEA y se continúa la agitación durante 16 h. Al día siguiente, se
- 30 añaden 29,5 μmol suplementarios de compuesto **56** y de DIPEA y se calienta la mezcla a 50 $^\circ\text{C}$. Después de 24 h suplementarias de reacción, se añaden 22,6 μmol de compuesto **56** y 29,5 μmol de DIPEA y la mezcla se calienta a 60 $^\circ\text{C}$ durante 24 h suplementarias. Se para entonces el calentamiento y se continúa la agitación a temperatura ambiente durante 64 h. Se diluye la

mezcla en 10 ml de AcOEt y la fase orgánica se lava con 2×10 ml de agua y después con 10 ml de una solución saturada de NaCl. Después de secado de la fase orgánica sobre MgSO₄, filtración y evaporación de los disolventes a presión reducida, el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 99/1 a 90/10. El producto **Ej17** se obtiene bajo la forma de un sólido incoloro (9,2 mg; 41 %). RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): 0,77 a 0,82 (m, 6 H); 1,02 (s, 3 H); 1,06 (d, J = 6,9 Hz, 3 H); 1,13 (s, 3 H); 1,23 (s, 6 H); 1,26 a 1,35 (m, 1 H); 1,52 a 1,64 (m, 2 H); 1,68 a 1,77 (m, 2 H); 1,78 a 1,86 (m, 1 H); 2,26 a 2,33 (m, 3 H); 2,35 a 2,41 (m, 4 H); 2,68 a 2,76 (m, 2 H); 2,82 (s, 4 H); 2,93 (t, J = 6.0 Hz, 2 H); 2,96 a 3,07 (m, 4 H); 3,13 (s, 2 H); 3,20 (q, J = 5,8 Hz, 2 H); 3,33 (m, 1 H); 3,38 a 3,57 (m, 18 H); 3,73 (t, J = 5,8 Hz, 2 H); 3,83 (s, 3 H); 3,89 (s, 2 H); 4,27 (m, 1 H); 4,93 (dd, J = 3,8 y 10,0 Hz, 1 H); 5,13 (m, 1 H); 5,82 (d, J = 15,4 Hz, 1 H); 6,49 (ddd, J=3,8 y 11,1 y 15,4 Hz, 1 H); 7,07 (d, J = 8,8 Hz, 1 H); 7,15 a 7,37 (m, 7 H); 8,01 (t, J = 5,8 Hz, 1 H); 8,35 (d, J=8,0 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 1299 [M + H]⁺; m/z = 650 [M + 2H]²⁺; m/z = 1297 [M - H]⁻; t_R = 0,92 min.

Ejemplo 18: 3-(2-{2-[2-(2-{4-[(2S,3S)-3-[(S)-1-[(E)-(3S,10R,16S)-10-[3-Cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexa-dec-13-en-16-il]-etil)-oxiranil]-benciloxycarbonilamino}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo

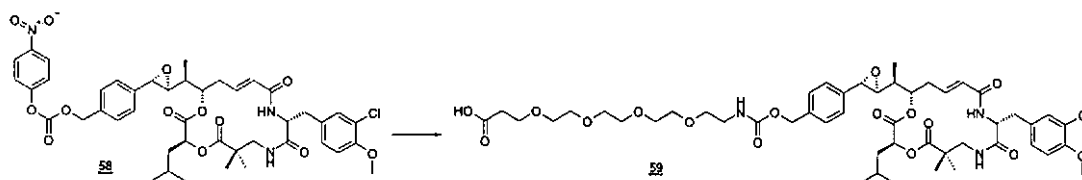


Compuesto 58: Carbonato de 4-((2S,3S)-3-[(S)-1-[(E)-(3S,10R,16S)-10-(3-cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il]-etil)-oxiranil)-bencilo y de 4-nitrofenilo



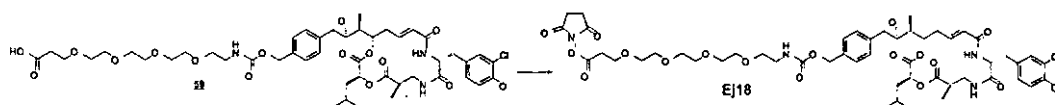
El derivado **57** (20 mg; 28,6 μmol, preparado según Al-awar R.S., y al., *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2985-3007) se disuelve en DCM anhidro (0,3 ml), la solución se purga con argón antes de añadir la TEA (40 μmol) y después el cloroformiato de 4-nitrofenilo (32,32 μmol). Después de 3 h 30 min de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se hidroliza y se diluye con 7 ml de AcOEt. La fase orgánica se lava con agua y después con una solución saturada de NaCl, se seca sobre MgSO₄, se filtra y se evapora a sequedad para dar el compuesto **58** en forma de un sólido blanco (23 mg, 93 %). LCMS (A3): ES m/z = 864 [M + H]⁺; m/z = 908 [M + HCO₂H - H]⁻; t_R = 1,43 min.

Compuesto 59: Ácido 3-(2-{2-[2-(2-{4-[(2S,3S)-3-((S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-[3-cloro-4-metoxibencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexa-dec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-benciloxycarbonilamino)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoico



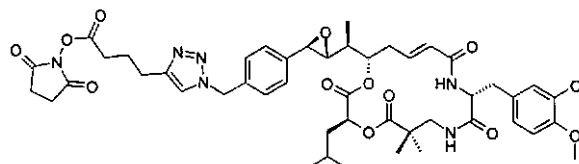
- 5 A una solución, purgada con argón, del compuesto **58** (23 mg, 26,6 μmol) en acetonitrilo anhidro (1,6 ml) se añaden sucesivamente ácido 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propiónico (39,9 μmol) y TEA (53,2 μmol). Después de 24 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se diluye con 10 ml de AcOEt. La fase orgánica se lava con 10 ml de agua que contiene 250 μl de HCl 0,1 N ($\text{pH} \approx 4$). La fase acuosa se extrae con 10 ml de AcOEt (2x); Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con 10 ml de agua y después con 10 ml de una solución saturada de NaCl, se secan sobre MgSO_4 , se filtran y se evaporan a sequedad para dar el compuesto **59** en forma de un sólido amarillo muy pálido (18,5 mg, 70 %). LCMS (A3): ES $m/z = 990$ $[\text{M} + \text{H}]^+$; $m/z = 988$ $[\text{M} - \text{H}]^-$; $t_R = 1,32$ min.

- 15 **Ejemplo 18:** 3-(2-{2-[2-(2-{4-[(2S,3S)-3-((S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-[3-Cloro-4-metoxibencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexa-dec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-benciloxycarbonilamino)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo



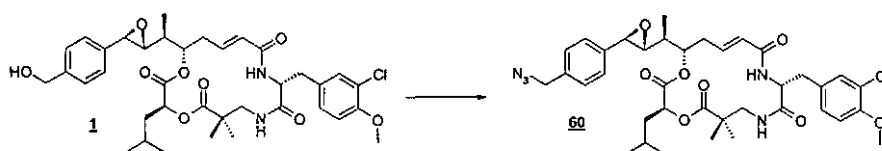
- A una solución, purgada con argón, del compuesto **59** (18,5 mg, 18,6 μmol) en THF (1,5 ml) se añaden sucesivamente la DIPEA (55,8 μmol) y el carbonato de N,N'-disuccinimidilo (37,2 μmol). Después de 19 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se diluye con 10 ml de AcOEt, se lava con 10 ml de agua (2 veces) y después con 10 ml de una solución saturada de NaCl, se seca sobre MgSO_4 y se evapora a sequedad. El producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de heptano/AcOEt de 100/0 a 0/100 que contiene 10 % de isopropanol. El producto **Ej17** se obtiene bajo la forma de un sólido blanco (6,08 mg; 30 %). RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6): 0,83 a 0,88 (m, 6 H); 0,97 (d, $J = 7,1$ Hz, 3 H); 1,02 (s, 3 H); 1,15 (s, 3 H); 1,47 a 1,56 (m, 1 H); 1,58 a 1,68 (m, 2 H); 1,82 a 1,90 (m, 1 H); 2,39 a 2,47 (m, 1 H); 2,60 a 2,66 (m, 1 H); 2,71 (dd, $J = 11,5$ y 14,4 Hz, 1 H); 2,80 (s, 4 H); 2,91 (t, $J = 6,0$ Hz, 2 H); 2,94 a 3,07 (m, 3 H); 3,14 (q, $J = 6,0$ Hz, 2 H); 3,37 a 3,56 (m parcialmente enmascarado, 15 H); 3,71 (t, $J = 6,0$ Hz, 2 H); 3,79 (m, 1 H); 3,81 (s, 3 H); 4,27 (ddd, $J = 3,8$ y 8,0 y 11,3 Hz, 1 H); 4,96 a 5,05 (m, 3 H); 5,11 (m, 1 H); 5,88 (d, $J = 15,4$ Hz, 1 H); 6,48 (ddd, $J = 3,8$ y 11,3 y 15,4 Hz, 1 H); 7,05 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H); 7,14 a 7,39 (m, 8 H); 8,40 (d, $J = 8,0$ Hz, 1 H). LCMS (A2): ES $m/z = 1087$ $[\text{M} + \text{H}]^+$; $m/z = 1085$ $[\text{M} - \text{H}]^-$; $t_R = 1,09$ min.

Ejemplo 19: (1-{4-[(2R,3R)-3-((S)-1-[(E)-(3S,10R,16S)-10-[3-cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-bencil}-1H-1,2,3-triazol-4-il)-butanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo



5

Compuesto 60: (E)-(3S,10R,16S)-16-((S)-1-[(2R,3R)-3-(4-Azidometil-fenil)-oxiranil]-etil)-10-(3-cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona

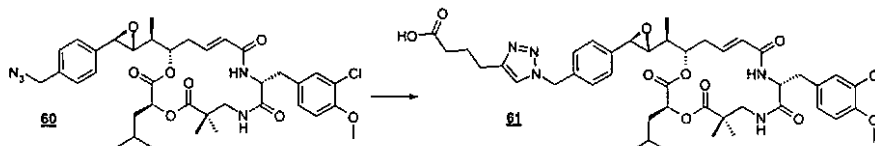


- 10 A una solución, purgada con argón, de 60 mg (85,8 μmol) de compuesto 1 en 9 ml de THF anhidro se añaden 25,9 μl (120 μmol) de difenilfosforazida. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 10 min y después se enfría a 0 °C antes de añadir 18,0 μl (120 μmol) de DBU. La agitación se continúa a temperatura ambiente durante 15 h. La reacción no es completa: se añaden 25,9 μl (120 μmol) de difenilfosforazida y 18,0 μl (120 μmol) de DBU y después se continúa la agitación durante 24 h. Aún queda compuesto 1 de partida: se añaden 25,9 μl (120 μmol) de difenilfosforazida y 18,0 μl (120 μmol) de DBU y después se continúa la agitación durante 24 h. Se hidroliza el medio de reacción por adición de 6 ml de agua y después se extrae con DCM (3x6 ml). Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una solución saturada de NaCl (8 ml) y se secan sobre MgSO_4 . Después de filtración y concentración a presión reducida, el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 90/10. El compuesto 60 se obtiene en forma de un sólido blanco (46 mg, 74 %). RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6): 0,76 (d, J = 6,3 Hz, 3 H); 0,78 (d, J=6,3 Hz, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 1,05 (d, J = 6,9 Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,30 (m, 1 H); 1,49 a 1,63 (m, 2 H); 1,82 (m, 1 H); 2,27 (m, 1 H); 2,63 a 2,74 (m, 2 H); 2,95 a 3,05 (m, 3 H); 3,25 a 3,38 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,81 (s, 3 H); 3,92 (d, J = 1,9 Hz, 1 H); 4,25 (ddd, J=3,6 y 8,0 y 11,5 Hz, 1 H); 4,46 (s, 2 H); 4,92 (dd, J = 3,6 y 9,6 Hz, 1 H); 5,11 (ddd, J=1,5 y 5,7 y 11,3 Hz, 1 H); 5,80 (dd, J = 1,5 y 15,1 Hz, 1 H); 6,48 (ddd, J=3,8 y 11,3 y 15,1 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,6 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J = 2,2 y 8,6 Hz, 1 H); 7,22 (dd, J = 2,6 y 9,5 Hz, 1 H); 7,28 (d, J = 2,2 Hz, 1 H); 7,34 (d, J = 8,3 Hz, 2 H); 7,38 (d, J = 8,3 Hz, 2 H); 8,34 (d, J=8,0 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 724 $[\text{M} + \text{H}]^+$; m/z = 722 $[\text{M} - \text{H}]^-$; m/z = 768 $[\text{M} - \text{H} + \text{HCO}_2\text{H}]^-$ pico de base; t_R = 1,18 min.

30

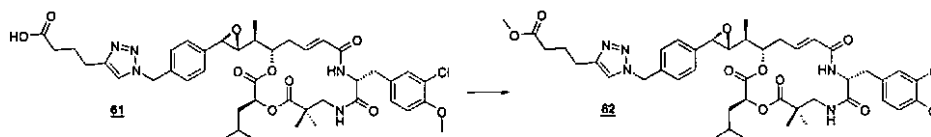
Compuesto 61: Ácido (1-{4-[(2R,3R)-3-((S)-1-[(E)-(3S,10R,16S)-10-[3-cloro-4-metoxi-bencil]-3-

isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-bencil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-butanoico



A una suspensión de 22 mg (30,4 μmol) del compuesto **60** en 500 μl de agua se añade una
 5 solución de 6,8 mg (60,8 μmol) de ácido 5-hexinoico en 500 μl de THF. Se añaden a
 continuación 122 μl (12,2 μmol) de una solución acuosa 0,1 M de sulfato de cobre y 122 μl (24,3
 μmol) de una solución acuosa 0,2 M de ascorbato de sodio. La agitación se continúa durante 2 h
 a temperatura ambiente. Se hidroliza la mezcla por adición de 2 ml de agua y después se extrae
 con AcOEt (3 $\times$ 2 ml). Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una solución saturada de
 10 NaCl (3 ml) y se secan sobre MgSO_4 . Después de filtración y concentración a presión reducida,
 el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una
 mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 90/10. El compuesto **61** se obtiene en forma de un sólido
 blanco (19,4 mg, 76 %). RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6): 0,73 (d, $J = 6,4$ Hz, 3 H); 0,75 (d, $J = 6,4$
 Hz, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 1,04 (d, $J = 6,9$ Hz, 3 H); 1,11 (s, 3 H); 1,29 (m, 1 H); 1,50 a 1,59 (m, 2 H);
 15 1,76 a 1,85 (m, 3 H); 2,20 a 2,30 (m, 3 H); 2,62 (t, $J = 7,7$ Hz, 2 H); 2,65 a 2,72 (m, 2 H); 2,94 a
 3,04 (m, 3 H); 3,28 a 3,38 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,81 (s, 3 H); 3,89 (d, $J = 1,6$ Hz,
 1 H); 4,25 (ddd, $J = 3,6$ y 8,0 y 11,5 Hz, 1 H); 4,90 (dd, $J = 3,6$ y 9,6 Hz, 1 H); 5,10 (ddd, $J = 1,6$ y
 5,2 y 11,2 Hz, 1 H); 5,53 (s, 2 H); 5,78 (dd, $J = 1,6$ y 15,0 Hz, 1 H); 6,46 (ddd, $J = 3,7$ y 11,2 y 15,0
 Hz, 1 H); 7,05 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H); 7,17 (dd, $J = 1,9$ y 8,5 Hz, 1 H); 7,22 (dd, $J = 2,3$ y 9,5 Hz, 1
 20 H); 7,28 (d, $J = 1,9$ Hz, 1 H); 7,31 (s, 4 H); 7,92 (s, 1 H); 8,37 (d ancho, $J = 8,0$ Hz, 1 H); 12,03 (m
 muy extendido, 1H). LCMS (A2): ES $m/z = 836$ $[\text{M} + \text{H}]^+$; $m/z = 418,5$ $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ pico de base;
 $m/z = 834$ $[\text{M} - \text{H}]^-$; $t_R = 1,04$ min.

Compuesto 62: (1-{4-[(2R,3R)-3-[(S)-1-{(E)-(3S,10R,16S)-10-[3-Cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-
 25 6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-bencil}-
 1H-1,2,3-triazol-4-il)-butanoato de metilo

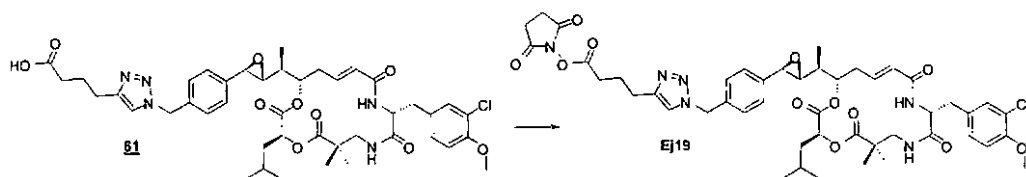


A una solución de 5 mg (6 μmol) del compuesto **61** en 500 μl de DCM y 200 μl de metanol se
 añaden 4,5 μl (9,0 μmol) de una solución de trimetilsilildiazometano 2 M en hexano. La agitación
 30 se continúa durante 30 min. Se concentra la mezcla a presión reducida y se purifica por filtración
 sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol 98/2. El compuesto **62** se obtiene
 en forma de un sólido blanco (5 mg, 98 %). RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6): 0,72 (d, $J = 6,4$ Hz, 3
 H); 0,75 (d, $J = 6,4$ Hz, 3 H); 0,99 (s, 3 H); 1,04 (d, $J = 6,8$ Hz, 3 H); 1,11 (s, 3 H); 1,28 (m, 1 H);

1,50 a 1,59 (m, 2 H); 1,79 (m, 1 H); 1,83 (m, 2 H); 2,25 (m, 1 H); 2,35 (t, J = 7,6 Hz, 2 H); 2,62 (t, J = 7,6 Hz, 2 H); 2,65 a 2,72 (m, 2 H); 2,94 a 3,05 (m, 3 H); 3,25 a 3,38 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,57 (s, 3 H); 3,81 (s, 3 H); 3,89 (d, J = 1,5 Hz, 1 H); 4,25 (ddd, J=3,7 y 8,3 y 11,4 Hz, 1 H); 4,89 (dd, J = 3,4 y 9,8 Hz, 1 H); 5,09 (ddd, J=1,5 y 5,4 y 11,4 Hz, 1 H); 5,53 (s, 2 H); 5,78 (dd, J = 1,5 y 15,2 Hz, 1 H); 6,46 (ddd, J=3,4 y 11,4 y 15,2 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,8 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J = 2,0 y 8,8 Hz, 1 H); 7,22 (dd, J = 2,5 y 9,8 Hz, 1 H); 7,28 (d, J = 2,0 Hz, 1 H); 7,31 (s, 4 H); 7,92 (s, 1 H); 8,34 (d, J=8,3 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 850 [M + H]⁺; m/z = 425,5 [M + 2H]²⁺ pico de base; m/z = 848 [M - H]⁻; m/z = 894 [M - H + HCO₂H]⁻ pico de base; t_R = 1,11 min.

10

Ejemplo 19: (1-{4-[(2R,3R)-3-((S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-[3-Cloro-4-metoxi-bencil]-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil)-oxiranil]-bencil}-1H-1,2,3-triazol-4-il)-butanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo



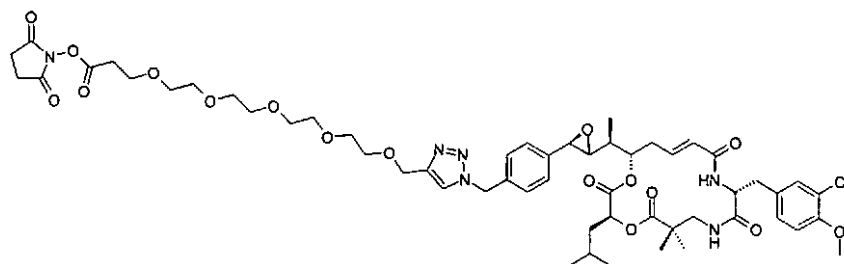
15 A una solución, purgada con argón, de 13,4 mg (16 μmol) del compuesto **61** en 1,2 ml de THF se añaden sucesivamente 8,4 μl (48,1 μmol) de DIPEA y 8,21 mg (32,04 μmol) de carbonato de N,N'-disuccinimidilo. La agitación se continúa a temperatura ambiente durante 26 h. Se hidroliza la mezcla por adición de 2 ml de agua y después se extrae con 2×2 ml de AcOEt. Las fases orgánicas se reúnen y se secan sobre MgSO₄. Después de filtración y concentración a presión

20 reducida, el producto bruto se purifica por filtración sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol 98/2. El producto obtenido contiene 0,15 mol de NHS. Se recoge en 2 ml de DCM y se lava con agua (2×3 ml) y después se seca sobre MgSO₄. Después de filtración y concentración a sequedad, se obtiene el compuesto **Ej19** en forma de un sólido blanco (12,56 mg, 84 %). RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): 0,73 (d, J = 6,3 Hz, 3 H); 0,75 (d, J = 6,6 Hz, 3 H);

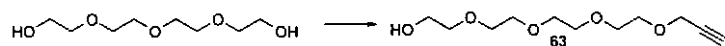
25 1,00 (s, 3 H); 1,04 (d, J = 6,9 Hz, 3 H); 1,11 (s, 3 H); 1,30 (m, 1 H); 1,49 a 1,60 (m, 2 H); 1,79 (m, 1 H); 1,95 (quin, J = 7,5 Hz, 2 H); 2,26 (m, 1 H); 2,65 a 2,77 (m, 6 H); 2,81 (s ancho, 4 H); 2,92 a 3,05 (m, 3 H); 3,34 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,81 (s, 3 H); 3,89 (d, J = 1,9 Hz, 1 H); 4,25 (ddd, J=3,7 y 8,1 y 11,5 Hz, 1 H); 4,90 (dd, J = 3,6 y 9,6 Hz, 1 H); 5,09 (ddd, J=1,4 y 5,5 y 11,3 Hz, 1 H); 5,54 (s, 2 H); 5,79 (dd, J = 1,4 y 15,1 Hz, 1 H); 6,46 (ddd, J=3,8 y 11,3 y 15,1 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,5 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J = 2,2 y 8,5 Hz, 1 H); 7,21 (dd, J = 2,5 y 9,6 Hz, 1 H); 7,28 (d, J = 2,2 Hz, 1 H); 7,31 (s, 4 H); 7,95 (s, 1 H); 8,33 (d, J=8,1 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 933 [M + H]⁺; m/z = 467 [M + 2H]²⁺ pico de base; m/z = 977 [M - H + HCO₂H]⁻ pico de base; t_R = 1,08 min.

35 **Ejemplo 20:** 3-(2-{2-[2-(2-{1-[1-(4-{(2R,3R)-3-[(S)-1-((E)-(10R,16S)-10-[3-Cloro-4-metoxi-

bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil]-oxirani]-bencil)-1,2,3-triazol-1-il]-metoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-propanoato de 2,5-dioxa-pirrolidin-1-ilo

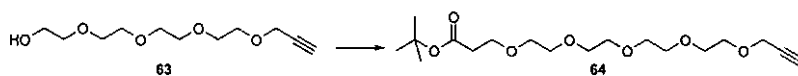


5 **Compuesto 63:** 2-{2-[2-(2-Prop-2-iniloxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etanol



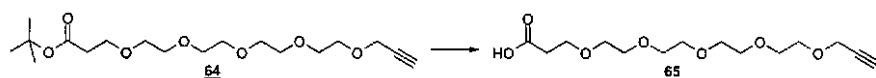
A una solución, purgada con argón y enfriada a 0 °C, de 1 g (5,15 mmol) de tetraetilenglicol en 25 ml de THF anhidro se añaden 144 mg (3,60 mmol) de NaH al 60 % en dispersión en un aceite mineral. Se continúa la agitación durante 30 min a 0 °C y después se añaden 194 µl (2,58 mmol) de bromuro de propargilo. Se continúa la agitación a temperatura ambiente durante 15 h. Se concentra la mezcla a presión reducida y después el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 90/10. El compuesto **63** se obtiene en forma de un aceite incoloro (789 mg, 65 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 3,40 (t, J = 2,4 Hz, 1 H); 3,42 (t, J = 5,5 Hz, 2 H); 3,48 (q, J = 5,5 Hz, 2 H); 3,51 a 3,58 (m, 12 H); 4,14 (d, J = 2,4 Hz, 2 H); 4,53 (t, J=5,5 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 233 [M + H]⁺; t_R = 0,38 min.

Compuesto 64: 3-(2-{2-[2-(2-Prop-2-iniloxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propanoato de *tert*-butilo



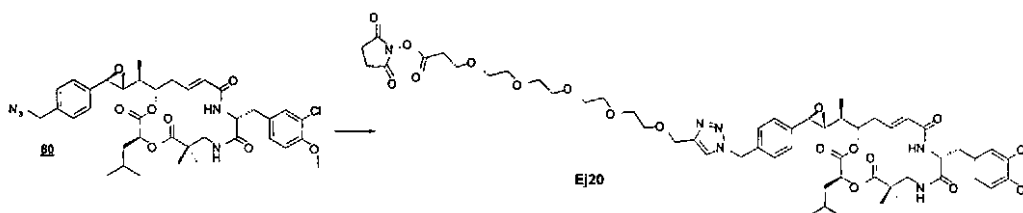
A una solución, purgada con argón, de 790 mg (3,40 mmol) del compuesto **63** en 8,8 ml de THF anhidro se añaden 4,4 mg (190 µmol) de sodio. Se calienta la mezcla a 40 °C durante 2 h para solubilizarla totalmente; después de volver a temperatura ambiente, se añaden a la mezcla 740 µl (5,09 mmol) de acrilato de *tert*-butilo. Se continúa la agitación durante 15 h a temperatura ambiente y después la mezcla se concentra a presión reducida y el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 90/10. El compuesto **64** se obtiene en forma de un aceite incoloro (944 mg, 77 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,44 (s, 9 H); 2,41 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 3,38 (t, J = 2,4 Hz, 1 H); 3,46 a 3,62 (m, 16 H); 3,59 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 4,14 (d, J=2,4 Hz, 2 H). LCMS (A1): ES m/z = 361 [M + H]⁺; m/z = 383 [M + Na]⁺; t_R = 3,79 min.

Compuesto 65: Ácido 3-(2-{2-[2-(2-prop-2-iniloxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propanoico



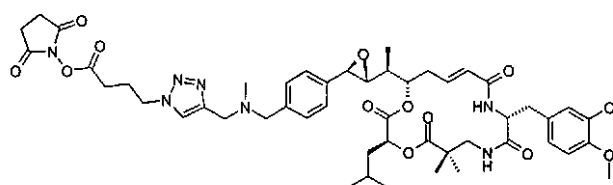
- A una solución de 944 mg (2,62 mmol) de compuesto **64** se añaden 2 ml (52,4 mmol) de TFA. Se agita la mezcla durante 6 h a temperatura ambiente y después se concentra a sequedad, se recoge en el mínimo de DCM y se trata varias veces con tolueno. El compuesto **65** se obtiene en forma de un aceite incoloro (722 mg, 91 %). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 2,44 (t, $J = 6,4$ Hz, 2 H); 3,39 (t, $J = 2,4$ Hz, 1 H); 3,46 a 3,56 (m, 16 H); 3,60 (t, $J = 6,4$ Hz, 2 H); 4,14 (d, $J = 2,4$ Hz, 2 H); 7,44 a 9,73 (m muy extendido, 1 H). LCMS (A2): ES $m/z = 305$ [$M + H$] $^+$; $m/z = 303$ [$M - H$] $^-$; $t_R = 0,48$ min.

- 10 **Ejemplo 20:** 3-(2-{2-[2-(2-{1-[1-(4-((2R,3R)-3-[(S)-1-((E)-(10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil]-oxiranil]-bencil)-1,2,3-triazol-1-il]-metoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-propanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo

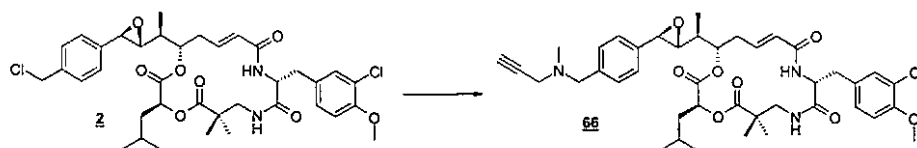


- 15 El ejemplo **20** se puede obtener a partir de los compuestos **60** y **65** según el método descrito para el compuesto **61** y activando después el ácido según el método descrito para el ejemplo **19**.

- Ejemplo 21:** (4-{1-[(4-((2R,3R)-3-[(S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil]-oxiranil]-bencil)-metilamino]-metil]-1,2,3-triazol-1-il)-butanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo



- Compuesto 66:** (E)-(3S,10R,16S)-10-(3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-16-[(S)-1-((2R,3R)-3-{4-[(metil-prop-2-ynil-amino)-metil]-fenil}-oxiranil)-etil]-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



- 25 A una solución, purgada con argón, de 40 mg (55,7 μmol) del compuesto **2** en 5 ml de acetonitrilo anhidro, se añaden sucesivamente 48,5 μl (279 μmol) de DIPEA y 13,9 μl (167 μmol)

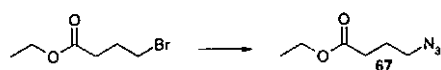
de N-metilpropargilamina. Se calienta la mezcla a 40°C durante 15 h. Queda compuesto **2** de partida: se añaden de nuevo 48,5 µl (279 µmol) de DIPEA y 13,9 µl (167 µmol) de N-metilpropargilamina. Después de 24 h de agitación a 40 °C, se diluye la mezcla con 5 ml de AcOEt y después se lava con 5 ml de agua. La fase acuosa se extrae con 3×5 ml de AcOEt, las

5 fases orgánicas se reúnen, se lavan con una solución saturada de NaHCO₃ (10 ml) y con una solución saturada de NaCl (10 ml) y se secan sobre MgSO₄. Después de filtración y concentración a presión reducida, el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 90/10. El compuesto **66** se obtiene en forma de un sólido blanco (45 mg, cuantitativo). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆):

10 0,78 (m, 6 H); 1,00 (s, 3 H); 1,05 (d, J = 6,8 Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,30 (m, 1 H); 1,49 a 1,61 (m, 2 H); 1,81 (m, 1 H); 2,20 (s, 3 H); 2,28 (m, 1 H); 2,63 a 2,76 (m, 2 H); 2,92 a 3,07 (m, 3 H); 3,17 (t, J = 2,4 Hz, 1 H); 3,27 (d, J = 2,4 Hz, 2 H); 3,33 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,50 (s, 2 H); 3,81 (s, 3 H); 3,88 (d, J = 1,7 Hz, 1 H); 4,25 (ddd, J=3,4 y 7,8 y 11,4 Hz, 1 H); 4,92 (dd, J = 3,5 y 9,7 Hz, 1 H); 5,11 (ddd, J=1,5 y 5,5 y 11,2 Hz, 1 H); 5,80 (dd, J = 1,5 y 15,0 Hz, 1 H); 6,47

15 (ddd, J=3,9 y 11,2 y 15,0 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,6 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J = 2,1 y 8,6 Hz, 1 H); 7,22 (dd, J = 2,1 y 9,4 Hz, 1 H); 7,25 a 7,33 (m, 5 H); 8,33 (d, J=7,8 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 750 [M + H]⁺; ES m/z = 375,5 [M + 2H]²⁺ pico de base; ES m/z = 748 [M - H]⁻; m/z = 794 [M - H + HCO₂H]⁻; t_R = 0,91 min.

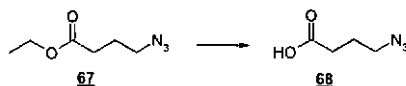
20 Compuesto 67: 4-Azido-butirato de etilo



Se disuelven 2,86 ml (20 mmol) de 4-bromo-butanoato de etilo y 2,6 g (40 mmol) de NaN₃ en 30 ml de una mezcla de acetona/agua 2/1. Se calienta la mezcla durante 7 h a reflujo. Después de volver a temperatura ambiente y de concentración a presión reducida, el residuo se recoge en 50

25 ml de agua. La fase acuosa se extrae con 3×30 ml de DCM. Las fases orgánicas se reúnen, se secan sobre MgSO₄, se filtran y se concentran a presión reducida para dar el compuesto **67** en forma de un aceite incoloro (3 g, 95 %). RMN ¹H (400 MHz, cloroformo-*d*): 1,27 (t, J = 7,2 Hz, 3 H); 1,92 (m, 2 H); 2,41 (t, J = 7,2 Hz, 2 H); 3,36 (t, J = 6,7 Hz, 2 H); 4,15 (q, J=7,2 Hz, 2 H).

30 Compuesto 68: Ácido 4-azido-butanoico

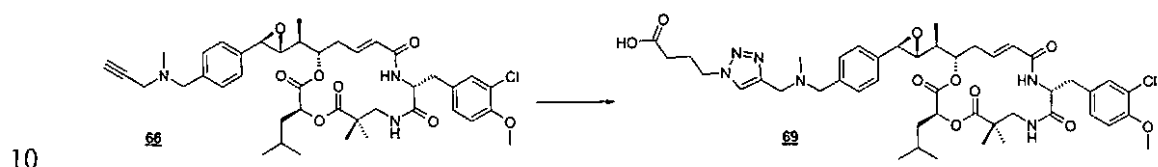


A una solución de 3 g (19,9 mmol) del compuesto **67** en 47 ml de metanol y 37 ml de agua se añaden, en pequeñas fracciones, 5,58 g (99,5 mmol) de potasa. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 6 h y después se concentra a presión reducida hasta

35 aproximadamente 28 ml. Se diluye el residuo con 25 ml de agua y se extrae con 2×20 ml de DCM. La fase acuosa se acidifica a pH≈1 por adición de HCl concentrado y después se extrae

con 3×25 ml de éter dietílico. Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una solución saturada de NaCl (25 ml) y se secan sobre MgSO₄. Después de filtración y concentración a sequedad a presión reducida, el compuesto **68** se obtiene en forma de un aceite incoloro (2,05 g, 80 %). RMN ¹H (400 MHz, cloroformo-*d*): 1,93 (m, 2 H); 2,49 (t, J = 7,1 Hz, 2 H); 3,39 (t, J = 6,7 Hz, 2 H); 11,24 (m extendido, 1 H).

Compuesto 69: Ácido (4-{1-[(4-{(2R,3R)-3-[(S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-{3-cloro-4-metoxi-bencil}-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxo-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil]-oxiranil)-bencil)-metilamino]-metil}-1,2,3-triazol-1-il)-butanoico



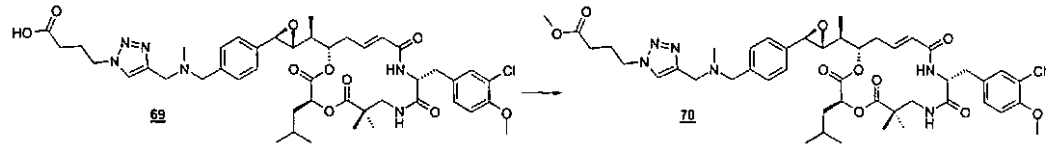
A una solución de 24 mg (32 μmol) del compuesto **66** en 545 μl de THF se añaden sucesivamente 8,3 mg (13 μmol) de compuesto **68**, 545 μl de agua, 128 μl de una solución acuosa 0,1 M de sulfato de cobre y 128 μl de una solución acuosa 0,2 M de ascorbato de sodio. Se agita la mezcla durante 45 min a temperatura ambiente y después se diluye con 2 ml de agua. Se extrae la fase acuosa con 3×2 ml de AcOEt. Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una solución saturada de NaCl (2 ml) y se filtran sobre MgSO₄. Después de filtración y concentración a presión reducida, el producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice injertada con diol utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 90/10. El compuesto **69** se obtiene en forma de un sólido blanco (22,6 mg, 80 %). RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,76 (d, J = 6,6 Hz, 3 H); 0,78 (d, J = 6,6 Hz, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 1,05 (d, J = 6,9 Hz, 3 H); 1,11 (s, 3 H); 1,30 (m, 1 H); 1,50 a 1,62 (m, 2 H); 1,81 (m, 1 H); 2,03 (m, 2 H); 2,10 (s, 3 H); 2,20 (t, J = 7,0 Hz, 2 H); 2,30 (m, 1 H); 2,64 a 2,74 (m, 2 H); 2,94 a 3,03 (m, 3 H); 3,35 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,48 (s, 2 H); 3,61 (s, 2 H); 3,81 (s, 3 H); 3,87 (d, J = 1,6 Hz, 1 H); 4,25 (ddd, J=3,7 y 7,7 y 11,5 Hz, 1 H); 4,37 (t, J = 7,0 Hz, 2 H); 4,91 (dd, J = 3,6 y 9,6 Hz, 1 H); 5,11 (ddd, J=1,5 y 5,5 y 11,3 Hz, 1 H); 5,80 (dd, J = 1,5 y 15,1 Hz, 1 H); 6,47 (ddd, J=3,7 y 11,3 y 15,1 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,5 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J = 2,2 y 8,5 Hz, 1 H); 7,23 (dd, J = 2,5 y 9,8 Hz, 1 H); 7,26 (d, J = 8,5 Hz, 2 H); 7,28 (d, J = 2,2 Hz, 1 H); 7,34 (d, J = 8,5 Hz, 2 H); 8,02 (s, 1 H); 8,39 (d ancho, J=7,7 Hz, 1 H); 12,14 (m extendido, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 879 [M + H]⁺; m/z = 877 [M-H]⁻; t_R = 0,86 min.

30

35

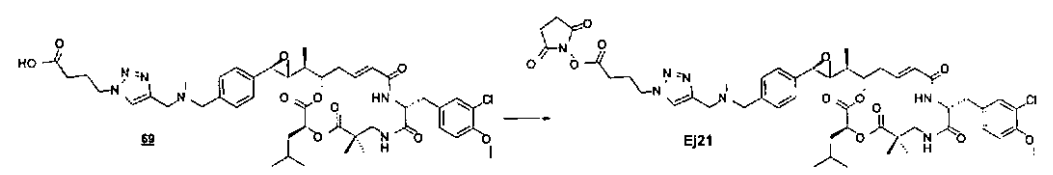
Compuesto 70: (4-{1-[(4-{(2R,3R)-3-[(S)-1-((E)-(3S,10R,16S)-10-{3-Cloro-4-metoxi-bencil}-3-

isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil]-oxiranil)-bencil)-metilamino]-metil)-1,2,3-triazol-1-il)-butanoato de metilo



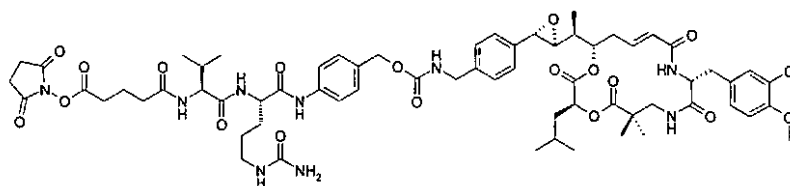
A una solución, purgada con argón, de 5,5 mg (6,2 μ mol) del compuesto **69** en 0,5 ml de DCM y 0,2 ml de metanol, se añaden 4,7 μ l (9,3 μ mol) de trimetilsilildiazometano. Se agita la mezcla durante 45 min a temperatura ambiente y después se concentra a sequedad. El producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 95/5. El compuesto **70** se obtiene en forma de un sólido blanco (3,4 mg, 62 %). RMN 1 H (500 MHz, DMSO- d_6): 0,75 (d, J = 6,6 Hz, 3 H); 0,77 (d, J = 6,6 Hz, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 1,05 (d, J = 6,9 Hz, 3 H); 1,11 (s, 3 H); 1,28 (m, 1 H); 1,49 a 1,61 (m, 2 H); 1,80 (m, 1 H); 2,07 (m, 2 H); 2,10 (m, 3 H); 2,26 (m, 1 H); 2,31 (t, J = 7,0 Hz, 2 H); 2,62 a 2,74 (m, 2 H); 2,93 a 3,04 (m, 3 H); 3,27 a 3,37 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,48 (s, 2 H); 3,58 (s, 3 H); 3,61 (s, 2 H); 3,81 (s, 3 H); 3,87 (d, J = 2,0 Hz, 1 H); 4,25 (ddd, J=3,7 y 8,2 y 11,6 Hz, 1 H); 4,38 (t, J = 7,0 Hz, 2 H); 4,91 (dd, J = 3,9 y 9,8 Hz, 1 H); 5,11 (ddd, J=1,5 y 5,3 y 11,2 Hz, 1 H); 5,79 (dd, J = 1,5 y 15,2 Hz, 1 H); 6,47 (ddd, J=3,9 y 11,2 y 15,2 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,6 Hz, 1 H); 7,16 (dd, J = 2,2 y 8,6 Hz, 1 H); 7,22 (dd, J = 2,4 y 9,8 Hz, 1 H); 7,26 (d, J = 8,6 Hz, 2 H); 7,28 (d, J = 2,2 Hz, 1 H); 7,33 (d, J = 8,6 Hz, 2 H); 8,03 (s, 1 H); 8,34 (d, J=8,2 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 893 [M + H] $^+$; m/z = 447 [M + 2H] $^{2+}$ pico de base; m/z = 891 [M-H] $^-$; m/z = 937 [M -H + HCO $_2$ H] $^-$ pico de base; t $_R$ = 0,90 min.

Ejemplo 21: (4-{1-[(4-{(2R,3R)-3-[(S)-1-[(E)-(3S,10R,16S)-10-{3-Cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il)-etil]-oxiranil)-bencil)-metilamino]-metil)-1,2,3-triazol-1-il)-butanoato de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo

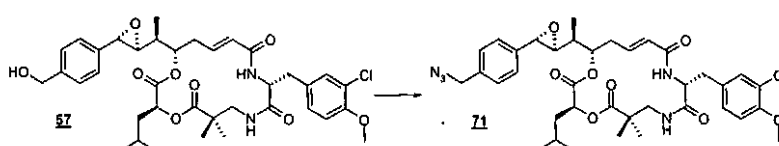


El ejemplo **21** se puede obtener por activación del ácido **69** según el método descrito para el ejemplo **19**.

Ejemplo 22

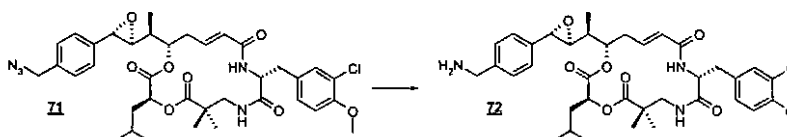


Compuesto 71: (E)-(3S,10R,16S)-16-((S)-1-((2S,3S)-3-(4-Azidometil-fenil)-oxiranil)-etil)-10-(3-cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



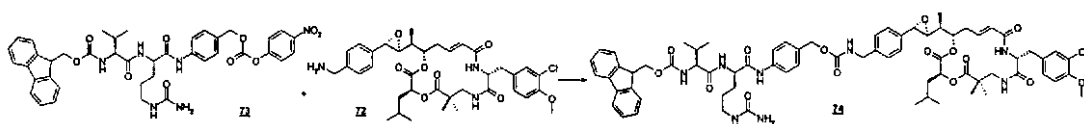
El alcohol **57** (36 mg; 51,48 μmol , preparado según Al-awar R.S., y al., *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2985-3007) se disuelve en THF anhidro (2 ml). La solución se purga con argón y se enfría con un baño de agua helada antes de añadir DPPA (74 μmol) y después DBU (80 μmol). Se deja que la mezcla vuelva a temperatura ambiente y se continúa la agitación durante toda la noche. Al día siguiente, la solución se enfría de nuevo con un baño de agua helada y después se añaden 74 μmol de DPPA y 80 μmol de DBU suplementarios. Después de 2 h de reacción a 0 °C y 2 h a temperatura ambiente, se hidroliza la mezcla con 5 ml de agua y después se extrae 3 veces con DCM. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre Na_2SO_4 , se filtran y se evaporan a presión reducida. El producto bruto se purifica entonces por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 95/5. El compuesto **57** se obtiene bajo la forma de un sólido incoloro (24 mg; 64 %). RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 0,84 (d, $J = 6,3$ Hz, 3 H); 0,86 (d, $J = 6,3$ Hz, 3 H); 0,98 (d, $J = 7,1$ Hz, 3 H); 1,03 (s, 3 H); 1,15 (s, 3 H); 1,48 a 1,67 (m, 3 H); 1,88 (m, 1 H); 2,45 (m, 1 H); 2,63 (m, 1 H); 2,71 (dd, $J = 11,5$ y 14,0 Hz, 1 H); 2,97 a 3,08 (m, 3 H); 3,36 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,82 (s ancho, 4 H); 4,28 (ddd, $J = 3,6$ y 8,0 y 11,5 Hz, 1 H); 4,44 (s, 2 H); 4,99 (dd, $J = 3,7$ y 9,5 Hz, 1H); 5,12 (ddd, $J = 1,4$ y 5,7 y 11,4 Hz, 1 H); 5,88 (dd, $J = 1,4$ y 15,2 Hz, 1 H); 6,49 (ddd, $J = 3,8$ y 11,4 y 5,2 Hz, 1 H); 7,05 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H); 7,18 (dd, $J = 2,2$ y 8,5 Hz, 1 H); 7,26 a 7,32 (m, 4 H); 7,36 (d, $J = 8,5$ Hz, 2 H); 8,40 (d, $J = 8,0$ Hz, 1 H). LCMS (A2): ES $m/z = 722$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$; $m/z = 724$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$; $m/z = 768$ [$\text{M} + \text{HCO}_2\text{H} - \text{H}$] $^-$; $t_R = 1,19$ min.

Compuesto 72: (E)-(3S,10R,16S)-16-((S)-1-((2S,3S)-3-(4-Aminometil-fenil)-oxiranil)-etil)-10-(3-cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona



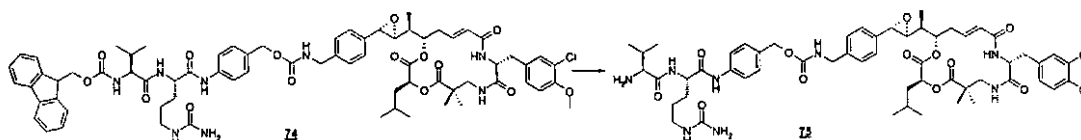
El compuesto **71** (22 mg, 30,38 μmol) se disuelve en una mezcla de metanol (1 ml) / agua (0,2 ml) antes de añadir TCEP (34,89 μmol). La solución obtenida se deja en agitación toda la noche a temperatura ambiente y después se concentra a presión reducida. El residuo se recoge a continuación con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 y se extrae 3 veces con DCM. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre Na_2SO_4 , se filtran y se concentran a presión reducida. El intermedio **72** se obtiene así en forma de un sólido incoloro (21 mg, 99 %) que se utiliza bruto en la etapa siguiente. LCMS (A5): ES $m/z = 696$ $[\text{M} - \text{H}]^-$; $m/z = 698$ $[\text{M} + \text{H}]^+$; $m/z = 742$ $[\text{M} + \text{HCO}_2\text{H} - \text{H}]^-$; $t_R = 3,19$ min.

10 **Compuesto 74: FmocVal-Cit-PABAC- α -amino-criptoficina 72**

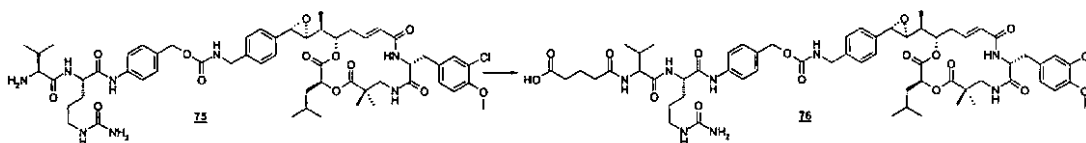


El compuesto **72** (21 mg, 30,08 μmol) se disuelve en una mezcla de acetonitrilo (2 ml) / DMF anhidra (0,5 ml) antes de la adición de una solución del compuesto **73** (23 mg, 30,1 μmol ; preparado según el documento **WO 2006/110476**) en acetonitrilo (2 ml). La mezcla se deja 22 h en agitación a temperatura ambiente y después se concentra a presión reducida. Se recoge el residuo en DCM y se lava con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 y después se seca sobre Na_2SO_4 , se filtra y se concentra a presión reducida. El producto bruto se purifica entonces por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 90/10. El compuesto **74** se obtiene bajo la forma de un sólido blanco (22 mg) que se utiliza bruto en la etapa siguiente. LCMS (A5): ES $m/z = 1325$ $[\text{M} + \text{H}]^+$; $m/z = 1369$ $[\text{M} + \text{HCO}_2\text{H} - \text{H}]^-$; $t_R = 4,30$ min.

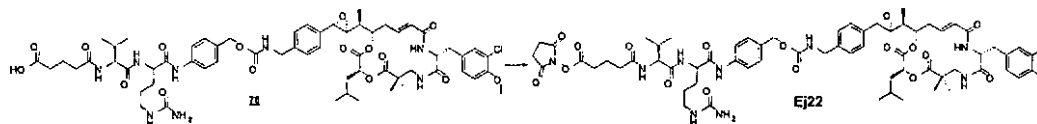
20 **Compuesto 75: Val-Cit-PABAC- α -amino-criptoficina 72**



25 El compuesto **74** (22 mg, 16,59 μmol) se disuelve en DMF (3 ml) antes de la adición de piperidina (150 μl , 1,51 mmol) y de agitación durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla se concentra a presión reducida; el residuo se disuelve en el mínimo de metanol y se precipita con éter. El compuesto **75** se obtiene así en forma de un sólido blanco (15 mg, 82 %). LCMS (A5): ES $m/z = 1103$ $[\text{M} + \text{H}]^+$; $m/z = 1101$ $[\text{M} - \text{H}]^-$; $m/z = 1148$ $[\text{M} + \text{HCO}_2\text{H} - \text{H}]^-$; $t_R = 3,38$ min.

Compuesto 76: Ácido glutámico-Val-Cit-PABAC- α -amino-criptoficina **72**

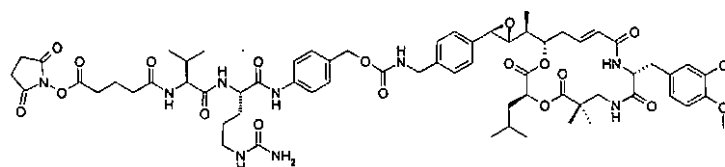
Una solución de anhídrido glutárico (8 mg, 70 μ mol) en DMF anhidra (200 μ l) se adiciona el compuesto **75** (15 mg, 13,59 μ mol) acondicionado bajo argón. La solución obtenida se agita durante toda la noche a temperatura ambiente antes de la adición de una solución acuosa saturada de NH_4Cl y de extracción 3 veces con DCM. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre Na_2SO_4 , se filtran y se concentran a presión reducida. El residuo obtenido se recoge en DCM y se precipita con éter. Después de filtración sobre vidrio sinterizado y de lavado con éter, el compuesto **76** se obtiene en forma de un sólido beige (8 mg, 48 %). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0,80 a 0,92 (m, 12 H); 0,96 (d, $J=7,1$ Hz, 3 H); 1,02 (s, 3 H); 1,15 (s, 3 H); 1,30 a 1,72 (m, 9 H); 1,86 (m, 1 H); 2,00 (m, 1 H); 2,11 a 2,26 (m, 4 H); 2,42 (m, 1 H); 2,60 a 2,74 (m, 2 H); 2,91 a 3,11 (m, 5 H); 3,38 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,76 (d, $J = 1,8$ Hz, 1 H); 3,81 (s, 3 H); 4,17 (m, 3 H); 4,27 (m, 1 H); 4,37 (m, 1 H); 4,90 a 5,04 (m, 3 H); 5,11 (m, 1 H); 5,50 (m ancho, 2 H); 5,88 (d ancho, $J=15,2$ Hz, 1 H); 6,20 (m extendido, 1 H); 6,48 (m, 1 H); 7,06 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H); 7,11 a 7,32 (m, 9 H); 7,60 (m, 2 H); 7,75 (m, 1 H); 7,89 (m, 1 H); 8,28 (m extendido, 1 H); 8,41 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H); 9,92 (s ancho, 1 H); 12,06 (m extendido, 1 H). LCMS (A2): ES $m/z = 1217$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; $m/z = 1215$ $[\text{M}-\text{H}]^-$; $t_R = 1,05$ min.

Ejemplo 22

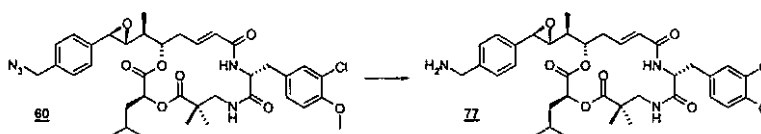
El compuesto **76** (6 mg, 4,93 μ mol) se disuelve en una mezcla de DCM (0,5 ml) y de DMF (0,1 ml) y después se añaden sucesivamente el carbonato de N,N'-disuccinimidilo (6 mg, 23,42 μ mol) y la DIPEA (4 μ l, 22,96 μ mol). Después de 3 h de reacción a temperatura ambiente, se añade una solución acuosa saturada de NH_4Cl y la mezcla se extrae 3 veces con DCM. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre Na_2SO_4 , se filtran y se concentran a presión reducida. El producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 90/10. El compuesto **Ej22** se obtiene bajo la forma de un sólido blanco (4 mg; 61 %). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0,80 a 0,90 (m, 12 H); 0,96 (d, $J = 7,3$ Hz, 3 H); 1,03 (s, 3 H); 1,15 (s, 3 H); 1,32 a 1,76 (m, 7 H); 1,80 a 1,89 (m, 3 H); 1,97 (m, 1 H); 2,29 (m, 2 H); 2,44 (m, 1 H); 2,60 a 2,75 (m, 4 H); 2,81 (s, 4 H); 2,89 a 3,08 (m, 5 H); 3,41 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,77 (d, $J = 2,0$ Hz, 1 H); 3,81 (s, 3 H); 4,14 a 4,24 (m, 3 H); 4,27 (ddd, $J=3,9$ y $8,3$ y $11,5$ Hz, 1 H); 4,38 (m, 1 H); 4,93 a 5,03 (m, 3 H); 5,11 (m, 1 H); 5,39 (s ancho, 2 H); 5,88 (d ancho, $J=15,2$ Hz, 1 H); 5,96 (t, $J = 5,9$ Hz, 1 H); 6,48 (ddd, $J=3,7$ y $11,1$ y

15,2 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,3 Hz, 1 H); 7,16 a 7,36 (m, 9 H); 7,59 (d, J = 7,8 Hz, 2 H); 7,76 (t, J = 6,1 Hz, 1 H); 7,88 (d, J = 8,8 Hz, 1 H); 8,10 (d, J = 7,3 Hz, 1 H); 8,41 (d, J = 8,3 Hz, 1 H); 9,97 (s ancho, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 1314 $[M+H]^+$; m/z = 1358 $[M + HCO_2H - H]^+$ t_R = 1,06 min.

5 Ejemplo 23



Compuesto 77: (E)-(3S,10R,16S)-16-[(S)-1-[(2R,3R)-3-(4-Aminometil-fenil)-oxiranil]-etil]-10-(3-cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-eno-2,5,9,12-tetraona

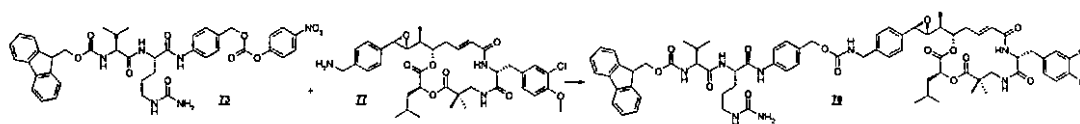


10

El compuesto **60** (23 mg, 31,76 μ mol) se disuelve en una mezcla de metanol (1 ml) y de agua (0,2 ml) antes de la adición de TCEP (34,90 μ mol) y de DCM (la cantidad suficiente para disolver). La solución obtenida se deja en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente y después se concentra a presión reducida. El residuo se recoge a continuación con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ y se extrae 3 veces con DCM. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre Na_2SO_4 , se filtran y se concentran bajo presión reducida. El producto bruto se purifica finalmente por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 90/10. El compuesto **77** se obtiene así en forma de un sólido blanco (12 mg, 59 %). RMN 1H (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 0,78 (d, J = 6,4 Hz, 6 H); 1,00 (s, 3 H); 1,05 (d, J = 6,9 Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,30 (m, 1 H); 1,47 a 1,62 (m, 2 H); 1,79 (m, 1 H); 2,22 a 2,32 (m, 3 H); 2,63 a 2,73 (m, 2 H); 2,92 a 3,05 (m, 3 H); 3,35 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,71 (s, 2 H); 3,81 (s, 3 H); 3,86 (d, J = 1,6 Hz, 1 H); 4,25 (ddd, J=3,6 y 8,0 y 11,3 Hz, 1 H); 4,90 (dd, J = 3,6 y 9,6 Hz, 1 H); 5,11 (ddd, J=1,5 y 5,2 y 11,3 Hz, 1 H); 5,79 (dd, J = 1,5 y 15,0 Hz, 1 H); 6,47 (ddd, J=3,6 y 11,3 y 15,0 Hz, 1 H); 7,05 (d, J = 8,5 Hz, 1 H); 7,17 (dd, J = 1,9 y 8,5 Hz, 1 H); 7,19 a 7,26 (m, 3 H); 7,28 (d, J = 1,9 Hz, 1 H); 7,34 (d, J = 8,0 Hz, 2 H); 8,34 (d, J=8,0 Hz, 1 H). LCMS (A2): ES m/z = 698 $[M+H]^+$; m/z = 696 $[M-H]^-$; m/z = 742 $[M + HCO_2H - H]^+$ t_R = 0,87 min.

25

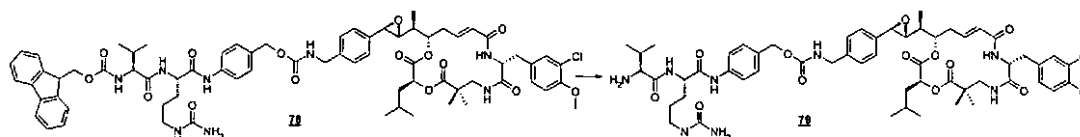
Compuesto 78: FmocVal-Cit-PABAC- α -amino-criptoficina **77**



30

El compuesto **77** (10 mg, 14,32 μmol) se disuelve en DMF anhidra (0,1 ml) antes de la adición de una solución del intermedio **73** (11 mg, 14,35 μmol ; preparado según el documento **WO 2006/110476**) en una mezcla de acetonitrilo (1 ml) y de DMF (0,1 ml). La mezcla se deja en agitación durante 3 h a temperatura ambiente y después se concentra a presión reducida. El residuo se purifica entonces por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 90/10. El compuesto **78** se obtiene bajo la forma de un sólido blanco (18 mg, 95 %). LCMS (A5): ES $m/z = 1325 [M+H]^+$; $m/z = 1369 [M + \text{HCO}_2\text{H} - H]^+$ $t_R = 4,32$ min.

Compuesto 79: Val-Cit-PABAC- α -amino-criptoficina 77

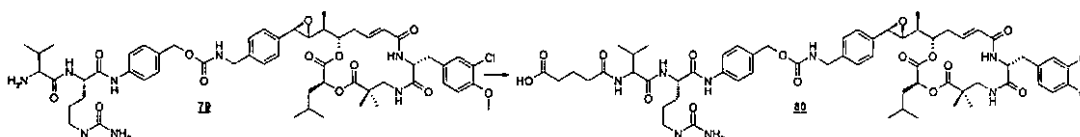


10

El compuesto **78** (42 mg, 31,68 μmol) se disuelve en DMF (5 ml) antes de la adición de piperidina (150 μl , 1,51 mmol) y de agitación durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla se concentra a presión reducida y el residuo se disuelve en el mínimo de metanol y se precipita con éter. El compuesto **79** se obtiene así en forma de un sólido blanco (21 mg, 60 %). LCMS (A4): ES $m/z = 1103 [M+H]^+$; $m/z = 1101 [M-H]^-$; $m/z = 1147 [M + \text{HCO}_2\text{H} - H]^+$ $t_R = 3,67$ min.

15

Compuesto 80: Ácido glutámico-Val-Cit-PABAC- α -amino-criptoficina 77



20

El compuesto **79** (20 mg, 18,12 μmol) se disuelve en una mezcla de DMF (100 μl) y de DCM anhidro (500 μl) antes de la adición de anhídrido glutámico (4 mg, 35,06 μmol). La solución obtenida se agita durante toda la noche a temperatura ambiente y después se concentra a presión reducida. El residuo se recoge en un mínimo de DCM y de metanol, se precipita con una mezcla de éter y de pentano y se filtra sobre vidrio sinterizado. El compuesto **80** se obtiene así en forma de un sólido blanco (23 mg, 104 % de bruto) que se utiliza bruto en la etapa siguiente.

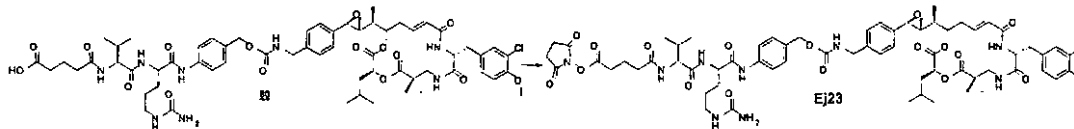
25

RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): 0,78 (d, $J = 6,3$ Hz, 6 H); 0,84 (d, $J = 6,6$ Hz, 3 H); 0,86 (d, $J = 6,6$ Hz, 3 H); 1,00 (s, 3 H); 1,04 (d, $J = 6,9$ Hz, 3 H); 1,12 (s, 3 H); 1,22 a 1,47 (m, 3 H); 1,51 a 1,64 (m, 3 H); 1,72 (m, 3 H); 1,80 (m, 1 H); 1,99 (m, 1 H); 2,20 (m, 4 H); 2,28 (m, 1 H); 2,59 a 2,73 (m, 2 H); 2,90 a 3,07 (m, 5 H); 3,32 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,81 (s, 3 H); 3,87 (s ancho, 1 H); 4,19 (m, 3 H); 4,24 (m, 1 H); 4,38 (m, 1 H); 4,91 (dd, $J = 3,3$ y 9,6 Hz, 1 H); 4,97 (s ancho, 2 H); 5,10 (dd, $J = 4,4$ y 10,7 Hz, 1 H); 5,40 (s ancho, 2 H); 5,79 (d ancho, $J = 15,1$ Hz, 1 H); 5,99 (m ancho, 1 H); 6,47 (ddd, $J = 3,6$ y 11,3 y 15,1 Hz, 1 H); 7,05 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H); 7,17 (d ancho, $J = 8,5$ Hz, 1 H); 7,20 a 7,34 (m, 8 H); 7,60 (d ancho, $J = 8,2$ Hz, 2 H); 7,76 (t ancho, $J = 5,4$ Hz, 1 H); 7,83 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H); 8,09 (d ancho, $J = 7,1$ Hz, 1 H); 8,34 (d, $J = 8,0$ Hz, 1 H); 9,95

30

(s ancho, 1 H); 11,98 (m extendido, 1 H). LCMS (A2): ES $m/z = 1217 [M+H]^+$; $m/z = 1215 [M-H]^-$; $t_R = 1,03$ min.

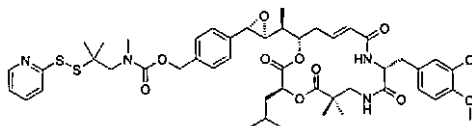
Ejemplo 23



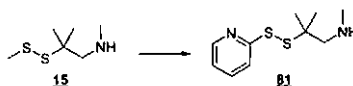
5

El ejemplo 23 se puede obtener activando el ácido 80 según el método descrito para el ejemplo 22.

10 **Ejemplo 24:** [2-Metil-2-(piridin-2-ildisulfanil)-propil]-metil-carbamato de 4-((2S,3S)-3-((S)-1-[(E)-(3S,10R,16S)-10-(3-cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il]-etil)-oxiranil)-bencilo



Compuesto 81: Metil-[2-metil-2-(piridin-2-ildisulfanil)-propil]-amina

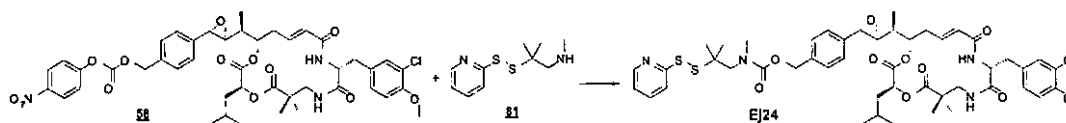


15 A una solución de la amina 15 (478 mg, 2,90 mmol) en MeOH (35 ml) se añade TCEP (831 mg, 2,9 mmol). Después de 2 h de reacción a temperatura ambiente la solución obtenida se adiciona gota a gota, en atmósfera de argón, a una solución de 2,2'-dipiridildisulfuro (960 mg, 4,36 mmol) en etanol (70 ml). Después de 2 h más de reacción a temperatura ambiente se concentra la mezcla a presión reducida. Se recoge el residuo en DCM y se lava con una solución acuosa saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se separa y después la fase acuosa se extrae 2 veces más con DCM. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y se concentran a presión reducida. El producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 98/2 a 85/15. El compuesto 81 se obtiene en forma de un aceite amarillo pálido (587 mg, 89 %). RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): 1,25 (s, 6 H); 1,80 (m extendido, 1 H); 2,19 (s, 3 H); 2,45 (s, 2 H); 7,22 (ddd, J=1,5 y 5,0 y 7,0 Hz, 1 H); 7,74 a 7,85 (m, 2 H); 8,42 (ddd, J=1,1 y 1,5 y 5,0 Hz, 1 H).

20

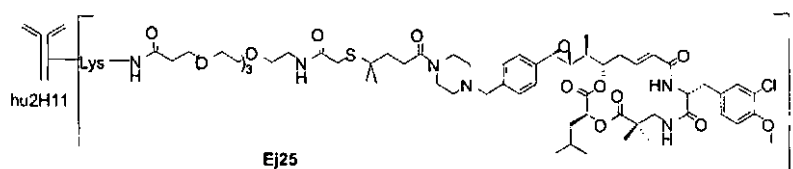
25

30 **Ejemplo 24:** [2-Metil-2-(piridin-2-ildisulfanil)-propil]-metil-carbamato de 4-((2S,3S)-3-((S)-1-[(E)-(3S,10R,16S)-10-(3-cloro-4-metoxi-bencil)-3-isobutil-6,6-dimetil-2,5,9,12-tetraoxo-1,4-dioxa-8,11-diaza-ciclohexadec-13-en-16-il]-etil)-oxiranil)-bencilo

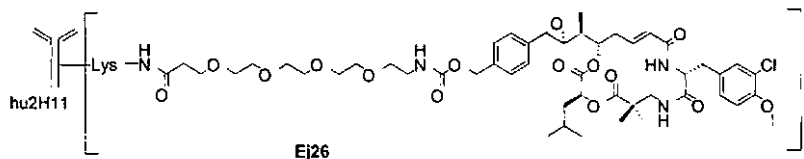


A una solución del intermedio **58** (21 mg, 24,3 μmol) en DCM anhidro se añaden sucesivamente la amina **81** (10 mg, 43,79 μmol) y la DIPEA (8 μl , 45,43 μmol). Después de 24 h a temperatura ambiente se añade una solución acuosa saturada de NaHCO_3 y la mezcla se extrae 3 veces con DCM. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre Na_2SO_4 , se filtran y se concentran a presión reducida. El producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de DCM/metanol de 100/0 a 95/5. El compuesto **Ej24** se obtiene así en forma de un sólido incoloro (7 mg, 30 %). RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6): 0,82 (d, $J = 6,0$ Hz, 3 H); 0,84 (d, $J = 6,0$ Hz, 3 H); 0,97 (d, $J = 6,8$ Hz, 3 H); 1,03 (s, 3 H); 1,14 (s, 3 H); 1,25 (s ancho, 6 H); 1,45 a 1,68 (m, 3 H); 1,88 (m, 1 H); 2,42 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 2,58 a 2,75 (m, 2 H); 2,83 a 3,09 (m, 6 H); 3,34 (m parcialmente enmascarado, 1 H); 3,46 (s ancho, 2 H); 3,81 (s ancho, 4 H); 4,28 (m, 1 H); 4,91 a 5,17 (m, 4 H); 5,88 (d ancho, $J=15,2$ Hz, 1 H); 6,49 (m, 1 H); 7,05 (d, $J = 8,6$ Hz, 1 H); 7,15 a 7,38 (m, 8 H); 7,80 (m ancho, 2 H); 8,39 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H); 8,43 (d ancho, $J=4,6$ Hz, 1 H). LCMS (A2): ES $m/z = 953$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; $m/z = 477$ $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$; $m/z = 997$ $[\text{M} + \text{HCO}_2\text{H} - \text{H}]^-$; $t_R = 1,23$ min.

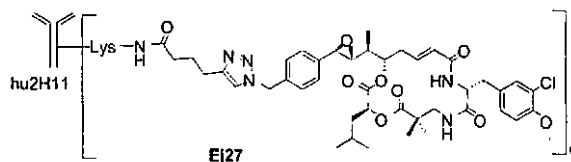
Ejemplo 25: hu2H11-Ej17



Según el método general, se tratan 8,31 mg (0,057 μmol , 1,468 ml) de anticuerpo desnudo hu2H11 a una concentración de 5,66 mg/ml con 5 equivalentes del compuesto **Ej17** (0,442 mg, 0,340 μmol) en solución en 37,3 μl de DMA de tal manera que la concentración final de anticuerpo sea de 3 mg/ml en la mezcla. Después de purificación sobre Superdex 200 pg y concentración sobre Amicon Ultra-15 (membrana Ultracel 50k, Millipore), se obtienen 2,15 ml de conjugado a una concentración de 2,48 mg/ml con una media de 2,2 citotóxicos por anticuerpo y una pureza monomérica de 99,7 % en un tampón acuoso de pH=6,5 que contiene fosfato 0,01 M, NaCl 0,14 M y 20 % en volumen de NMP. El cambio de tampón final se realiza en un tampón acuoso de pH=6,5 que contiene fosfato 0,01 M y NaCl 0,14 M sobre 1 ml de conjugado. Se obtienen entonces 1,5 ml de una solución de conjugado **Ej25** a una concentración de 1,06 mg/ml con una media de 2,8 derivados de criptocina (determinado por UV) por anticuerpo y una pureza monomérica de 99,7 %.

Ejemplo 26: hu2H11-Ej18

Según el método general, se tratan 7,8 mg (0,053 μ mol, 1,458 ml) de anticuerpo desnudo hu2H11 a una concentración de 5,35 mg/ml con 6 equivalentes del compuesto **Ej18** (0,578 mg, 0,531 μ mol, pureza 60 %) en solución en 272 μ l de DMA de tal manera que la concentración final de anticuerpo sea de 3 mg/ml en la mezcla. Después de purificación sobre Superdex 200 pg y concentración sobre Amicon Ultra-15 (membrana Ultracel 50k, Millipore), se obtienen 2,35 ml de conjugado a una concentración de 2,49 mg/ml con una media de 2,5 derivados de criptoficina por anticuerpo y una pureza monomérica de 100 % en un tampón acuoso de pH=6,5 que contiene fosfato 0,01 M, NaCl 0,14 M y 20 % en volumen de NMP. El cambio de tampón final se realiza en un tampón acuoso de pH=6,5 que contiene fosfato 0,01 M y cloruro de sodio 0,14 M sobre 1 ml de conjugado. Se obtienen entonces 1,5 ml de una solución de conjugado **Ej26** a una concentración de 0,84 mg/ml con una media de 2,22 derivados de criptoficina (determinado por UV) por anticuerpo y una pureza monomérica de 99,9 %.

Ejemplo 27: hu2H11-Ex19

Según el método general, se tratan 12 mg (81,7 μ mol, 1,172 ml) de anticuerpo desnudo hu2H11 a una concentración de 10,24 mg/ml con 2×5 equivalentes del compuesto **Ej19** (0,382 mg, 0,41 μ mol) en solución en 44,3 μ l de DMA de tal manera que la concentración final de anticuerpo sea de 3 mg/ml en el medio de reacción. Después de purificación sobre Superdex 200 pg en presencia de 20 % de NMP y concentración sobre Amicon Ultra-15 (membrana Ultracel 50k, Millipore), se obtienen 1,04 ml de conjugado en un tampón acuoso de pH=6,5 que contiene fosfato 0,01 M, NaCl 0,14 M y 20 % en volumen de NMP. El cambio de tampón final se realiza en un tampón acuoso de pH = 6,5 que contiene histidina 0,01 M, 10 % de sacarosa (p/v) y 5 % de NMP (v/v). Se obtienen entonces 1,5 ml de una solución de conjugado **Ej27** a una concentración de 2,66 mg/ml con una media de 1,4 derivados de criptoficina (HRMS) por anticuerpo y una pureza monomérica de 99,8 %.

Los ejemplos dados antes han sido realizados con un derivado de criptoficina particular (frecuentemente el derivado **D₁**) pero se podrían aplicar a otro derivado del grupo **D₁-D₈** o al

derivado de criptoficina de la fórmula general (II). Del mismo modo, los ejemplos de conjugados de los ejemplos 10, 11, 12, 25, 26 y 27 se podrían aplicar a otros anticuerpos aparte del hu2H11. nota: en los ejemplos mencionados, -Lys- significa que la unión se hace sobre los grupos ϵ -amino de las lisinas del anticuerpo.

5

Ejemplo 28: evaluación de la inhibición de la proliferación de las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-A1 y HCT116 por los citotóxicos, estudio realizado sobre los compuestos de la fórmula (II) de tipo SZ_a con $Z_a = SMe$ o de tipo $-C(=O)-Z_bR_b$ con $Z_bR_b = OMe$ o $OCH_2-CH=CH_2$

- Las células MDA-MB-231, MDA-A1 o HCT116 en su fase de crecimiento exponencial son
- 10 tripsinadas y puestas en suspensión en su medio de cultivo respectivo (DMEM/F12 Gibco #21331, SVF al 10 % Gibco #10500-056, Glutamina 2 nM Gibco #25030 para las células MDA; DMEM Gibco #11960, SVF al 10 % Gibco #10500-056, Glutamina 2 mM Gibco #25030 para las células HCT116). La suspensión celular se siembra en placas de cultivo de 96 pocillos Cytostar (GE Healthcare Europe, #RPNQ0163) en el medio de cultivo completo que contiene suero a una
- 15 densidad de 5000 células/pocillo (MDA-MB-231, MDA-A1, HCT116). Después de 4 h de incubación, se añaden a los pocillos diluciones sucesivas de los derivados de criptoficina a concentraciones decrecientes de 10^{-7} a 10^{-12} M (por triplicado para cada concentración). Se cultivan las células durante 3 días a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5 % en presencia de citotóxicos. El cuarto día, se añaden a cada pocillo 10 μ l de una solución de timidina ^{14}C (0,1
- 20 μ Ci/pocillo, Perkin Elmer #NEC56825000). La incorporación de timidina ^{14}C se mide 96 horas después del principio del experimento con un contador radioactivo microbeta (Perkin Elmer). Los datos se expresan en forma de porcentaje de supervivencia calculando la relación entre el recuento obtenido con las células tratadas con el citotóxico y el obtenido con las células de los pocillos controles (tratados con el medio de cultivo solo).

Tabla III	IC ₅₀ (nM)		
	HCT116	MDA-MB-231	MDA-A1
Compuesto 1	0,032	0,041	1,07
Compuesto 7	0,315	0,303	7,946
Compuesto 8	0,052	0,104	0,828
Compuesto 13	0,336	0,529	9,763
Compuesto 19	0,152	0,149	2,705
Compuesto 30	0,031	0,03	11,95
Compuesto 40	0,12	0,293	1,579
Compuesto 44	0,135	0,156	15,552
Compuesto 57	1,131	1,185	29,01
Compuesto 62	0,035	0,095	10,88
Compuesto 77	0,105	0,170	15,06

Ejemplo 29: evaluación de la inhibición de la proliferación de las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-A1 y HCT116 por los conjugados anticuerpo-citotóxico

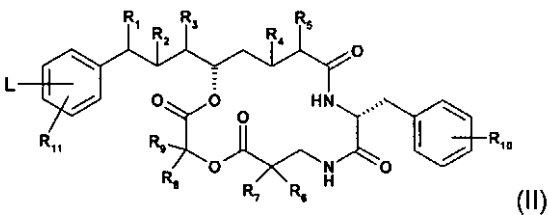
Las células MDA-MB-231, MDA-A1 o HCT116 en su fase de crecimiento exponencial son tripsinadas y puestas en suspensión en su medio de cultivo respectivo (DMEM/F12 Gibco #21331, SVF al 10 % Gibco #10500-056, Glutamina 2 nM Gibco #25030 para las células MDA; DMEM Gibco #11960, SVF al 10 % Gibco #10500-056, Glutamina 2 mM Gibco #25030 para las células HCT116). La suspensión celular se siembra en placas de cultivo de 96 pocillos Cytostar (GE Healthcare Europe, #RPNQ0163) en el medio de cultivo completo que contiene suero a una densidad de 5000 células/pocillo (MDA-MB-231, MDA-A1, HCT116). Después de 4 h de incubación, se añaden a los pocillos diluciones sucesivas de los derivados de criptoficina a concentraciones decrecientes de 10⁻⁷ a 10⁻¹² M (por triplicado para cada concentración). Las células se cultivan a 37 °C en una atmósfera con CO₂ al 5 % en presencia de los inmunconjugados anticuerpo-citotóxico durante 3 días. El cuarto día, se añaden a cada pocillo 10 µl de una solución de timidina ¹⁴C (0,1 µCi/pocillo, Perkin Elmer #NEC56825000). La incorporación de timidina ¹⁴C se mide 96 horas después del principio del experimento con un contador radioactivo microbeta (Perkin Elmer). Los datos se expresan en forma de porcentaje de supervivencia calculando la relación entre el recuento obtenido con las células tratadas con el inmunconjugado y el obtenido con las células de los pocillos controles (tratados con el medio de cultivo solo). En ciertos experimentos, el anticuerpo desnudo hu2H11 ha sido añadido a los

pocillos a una concentración de 1 μ M al principio del experimento y la inhibición de la proliferación ha sido medida como se ha descrito precedentemente.

Tabla IV	IC ₅₀ (nM), MDA-MB-231	
	Conjugado solo	en presencia de anticuerpo desnudo
Ej.9	0,150	0,856
Ej.25	0,710	4,918

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de criptoficina de la fórmula (II):



5 en la que:

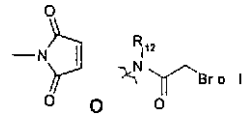
- **R₁** representa un átomo de halógeno y **R₂** representa un grupo –OH, un grupo acilo derivado de un aminoácido **AA** o un grupo alcanoiloxi(C₁-C₄);
o bien **R₁** y **R₂** forman conjuntamente un motivo epóxido;
- **AA** indica un aminoácido natural o no natural;
- **R₃** representa un grupo alquilo(C₁-C₆);
- **R₄** y **R₅** representan los dos H o forman conjuntamente un doble enlace CH=CH entre C13 y C14;
- **R₆** y **R₇** representan independientemente uno de otro H o un grupo alquilo(C₁-C₆);
- **R₈** y **R₉** representan independientemente uno de otro H o un grupo alquilo(C₁-C₆);
- **R₁₀** representa al menos un sustituyente del núcleo fenilo elegido entre: H, un grupo OH, alcoxi(C₁-C₄), un átomo de halógeno o bien un grupo –NH₂, –NHalquilo(C₁-C₆) o –N(alquilo(C₁-C₆))₂;
- **R₁₁** representa al menos un sustituyente del núcleo fenilo elegido entre H o un grupo alquilo(C₁-C₄);
- **L** representa un conector en posición orto (o), meta (m) o para (p), con preferencia para, del núcleo fenilo portador del motivo GCR₁ elegido entre:
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l(OCH₂CH₂)_y(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l(OCH₂CH₂)_y-Y'-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_y Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l(OCH₂CH₂)_y(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l-fenil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l-fúril-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l-oxazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l-tiazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l-tienil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l-imidazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l-piperazinil-CO(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l-piperidinil-metil-NR₁₂-CO(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 - G' X (CR₁₃R₁₄)_l-piperidinil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;

- G' X (CR₁₃R₁₄)_l-piperidinil-NR₁₂-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-triazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-triazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-fenil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 5 -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-fural-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-oxazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-tiazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-tienil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-imidazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 10 -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-piperazinil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-piperidinil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-piperidinil-metil-NR₁₂-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-piperidinil-NR₁₂-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G' X (CR₁₃R₁₄)_l-triazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 15 o
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l(OCH₂CH₂)_y(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l(OCH₂CH₂)_y-Y'-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_y Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l(OCH₂CH₂)_y(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 20 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-fenil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-fural-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-oxazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-tiazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-tienil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 25 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-imidazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-piperazinil-CO(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-piperidinil-metil-NR₁₂-CO(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-piperidinil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-piperidinil-NR₁₂-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 30 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-triazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Y' Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-fenil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-fural-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-oxazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-tiazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 35 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-tienil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-imidazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-piperazinil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
 -G" Y (CR₁₃R₁₄)_l-piperazinil-(CR₁₅R₁₆)_u Q CCR₁;

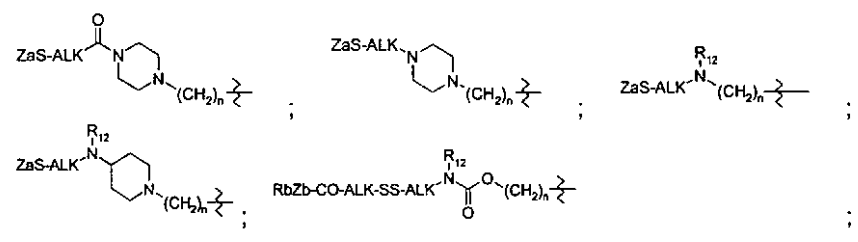
- G'' Y (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
- G'' Y (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-metil-NR₁₂-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
- G'' Y (CR₁₃R₁₄)_t-piperidinil-NR₁₂-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;
- G'' Y (CR₁₃R₁₄)_t-triazolil-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁;

5 fórmulas en las que:

- **G'** representa un grupo -CH=CH- o -(CH₂)_n-;
- **G''** representa un grupo -(CH₂)_n-;
- **n** representa un número entero que va de 1 a 6;
- **X** representa un enlace simple o un grupo -CO-, -COO-, o -CONR₁₂-, estando el grupo CO unido a **G'**;
- **Y** representa un grupo -O-, -OCO-, -OCOO-, -OCONR₁₂-, -NR₁₂-, -NR₁₂CO-, -NR₁₂CONR'₁₂-, -NR₁₂COO-, o -S(O)_q-, estando el átomo O o el grupo NR₁₂ unidos a **G''**;
- **q** representa un número entero que puede valer 0, 1 o 2;
- **Y'** representa un grupo -O-, -OCO-, -OCOO-, -OCONR₁₂-, -NR₁₂-, -NR₁₂CO-, -NR₁₂CONR'₁₂-, -NR₁₂COO-, -S(O)_q-, -CO-, -COO-, o -CONR₁₂-;
- **R₁₂, R'₁₂, R₁₃, R₁₄, R₁₅, R₁₆, R₁₇ y R₁₈** representan independientemente uno de otro H o un grupo alquilo(C₁-C₆);
- **t, u e y** representan números enteros que pueden ir cada uno de 0 a 20 y tales que t+u+y sea superior o igual a 1;
- en el caso del conector de la fórmula -G'' Y (CR₁₃R₁₄)_t(OCH₂CH₂)_y-Y'-(CR₁₅R₁₆)_u Q GCR₁, si **y** vale 0 y cuando Q representa un enlace simple, entonces u no puede valer 0;
- **Q** representa un enlace simple, un grupo alquilen(C₁-C₁₀) o un grupo (OCH₂CH₂)_i, representando **i** un número entero que va de 1 a 20, más particularmente de 1 a 10, más particularmente aún de 1 a 8, o de 1 a 6 y aún más particularmente de 2 a 5;

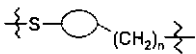
- **GCR1** representa -SZ_a, -C(=O)-Z_bR_b,  con **R₁₂** representando H o alquilo(C₁-C₆), más particularmente el grupo metilo;

30 o bien **L** se elige entre:

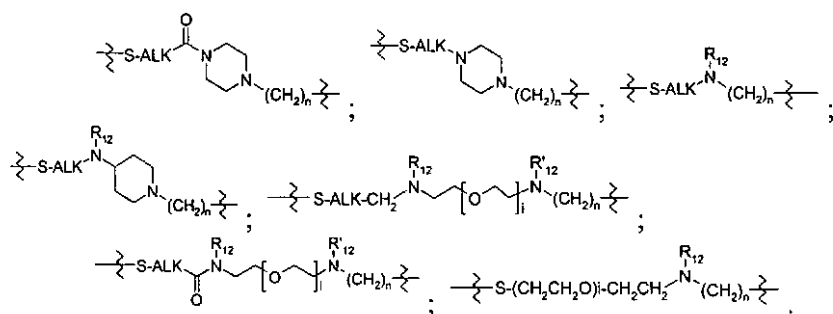


- **Z_a** representa H o el grupo -SR_a, con **R_a** representando un grupo alquilo(C₁-C₆), cicloalquilo(C₃-C₇), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo(C₃-C₇);
- **Z_b** representa un enlace simple, -O- o -NH-, con **R_b** representando H o un grupo alquilo(C₁-C₆), cicloalquilo(C₃-C₇), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo(C₃-C₇).

2. Un derivado de criptoficina según la reivindicación 1, en el que R_{10} representa al menos un sustituyente del núcleo fenilo elegido entre: H, un grupo OH, alcoxi(C_1 - C_4), un átomo de halógeno.
- 5 3. Un derivado de criptoficina según las reivindicaciones 1 o 2, en el que GCR1 representa $-SZ_a$ o $-C(=O)-Z_bR_b$.

4. Un derivado de criptoficina según las reivindicaciones 1 a 3, en el que , representa uno de los 7 grupos siguientes:

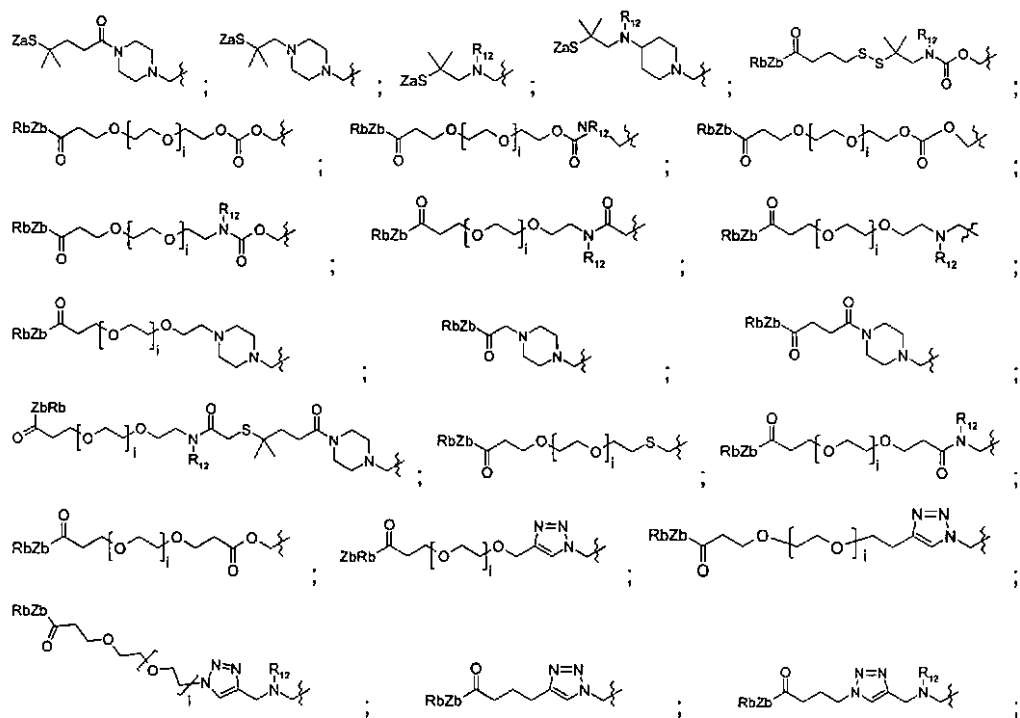
10

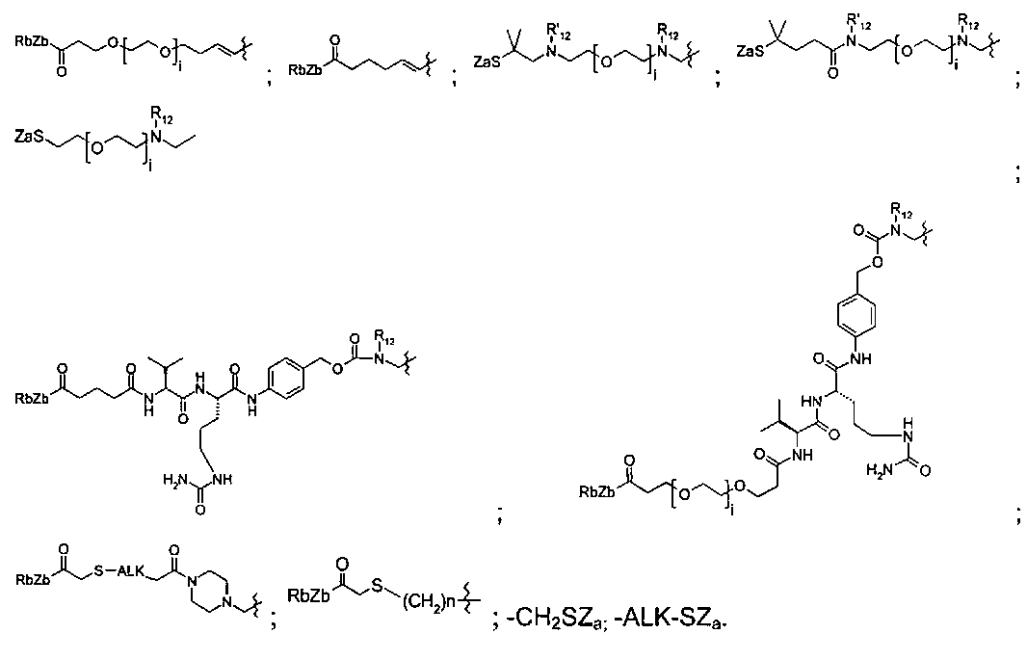


15

5. Un derivado de criptoficina según las reivindicaciones 1 a 4, en el que n vale 1.
6. Un derivado de criptoficina según la reivindicación 1, en el que L se elige entre:

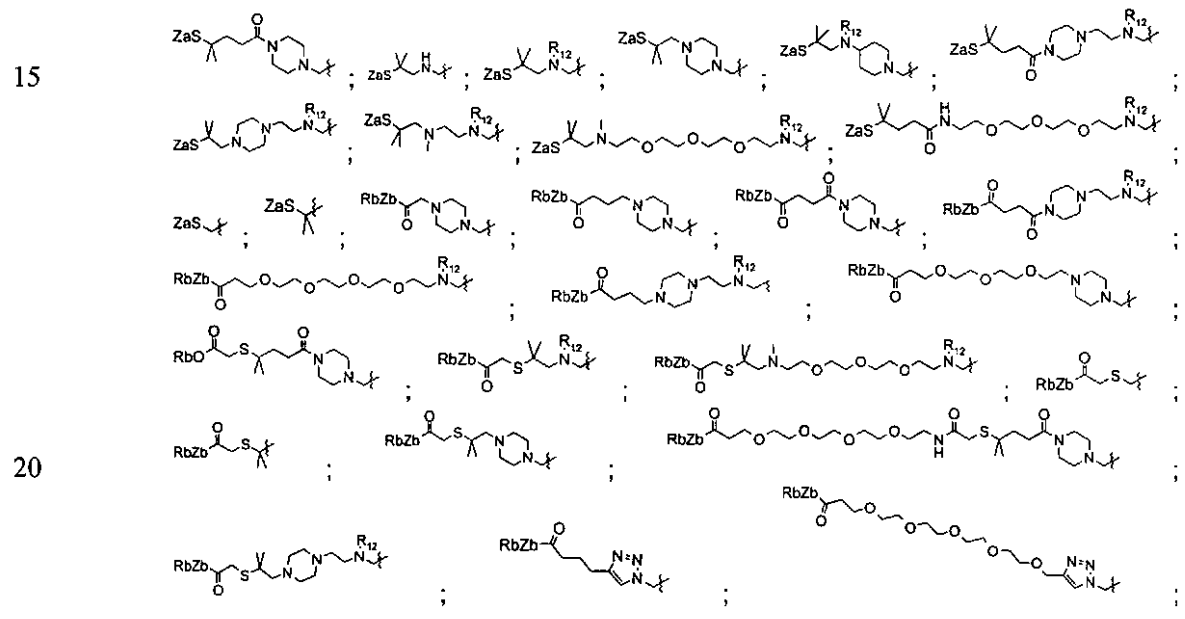
20

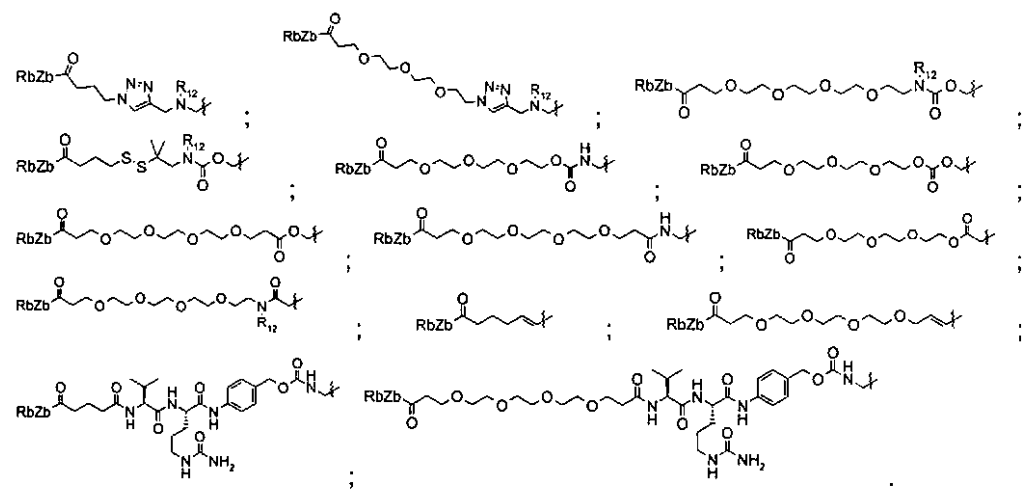




- 5
- R₁₂ y R'₁₂ representan independientemente uno de otro H o un grupo alquilo(C₁-C₆), más particularmente el grupo metilo;
 - i representa un número entero que va de 1 a 20, más particularmente de 1 a 10, más particularmente aún de 1 a 8, o de 1 a 6 y aún más particularmente de 2 a 5;
 - Z_a representa H o el grupo -SR_a, con R_a representando un grupo alquilo(C₁-C₆), cicloalquilo(C₃-C₇), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo(C₃-C₇);
 - Z_b representa un enlace simple, -O- o -NH-, con R_b representando H o un grupo alquilo(C₁-C₆), cicloalquilo(C₃-C₇), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo(C₃-C₇).
- 10

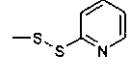
7. Un derivado de criptoficina según la reivindicación 1, en el que L se elige entre:

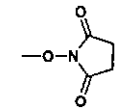


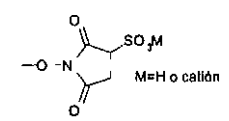
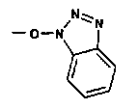
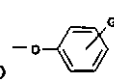


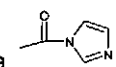
con R_{12} representando H o un grupo alquilo(C_1-C_6), más particularmente el grupo metilo.

8. Un derivado de criptoficina según la reivindicación 7, en el que R_{12} representa H.
9. Un derivado de criptoficina según la reivindicación 7, en el que R_{12} representa alquilo(C_1-C_6), más particularmente el grupo metilo.
10. Un derivado de criptoficina según las reivindicaciones 1 a 9, en el que Z_a representa H o

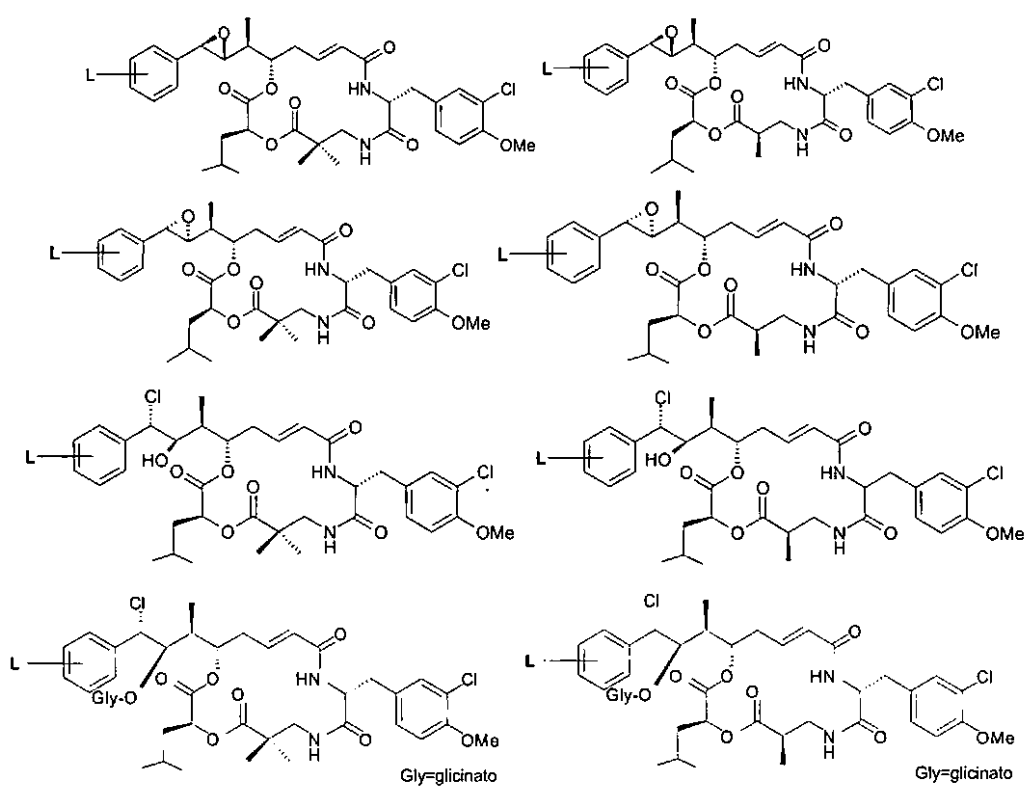
15 $-S$ alquilo(C_1-C_6), especialmente $-SMe$, o $-S$ -heteroarilo, especialmente  o

Z_bR_b representa $-O$ alquilo(C_1-C_6), $-OH$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH=CH_2$,  o

,  o el grupo  en el que $G1$ representa al menos

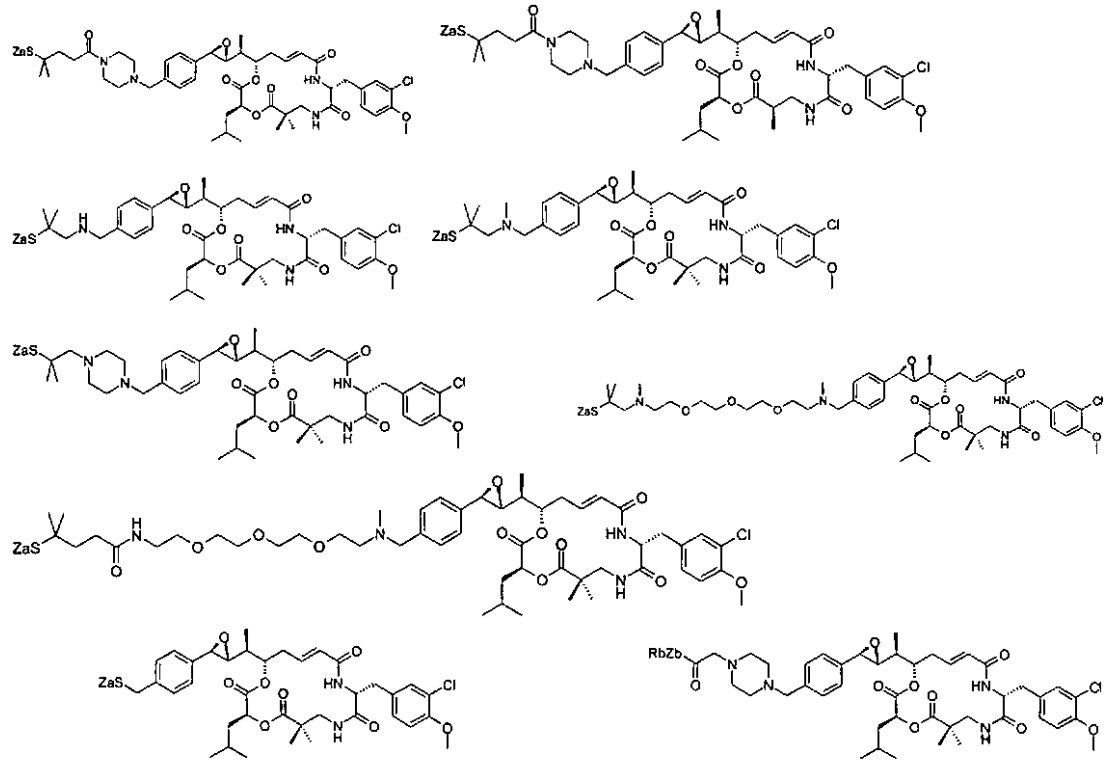
un grupo electroinductivo, o también en el que $-C(=O)Z_bR_b$ representa .

- 20 11. Un derivado de criptoficina según una de las reivindicaciones 1 a 10, definido según una de las fórmulas siguientes, estando L con preferencia en posición para:



5

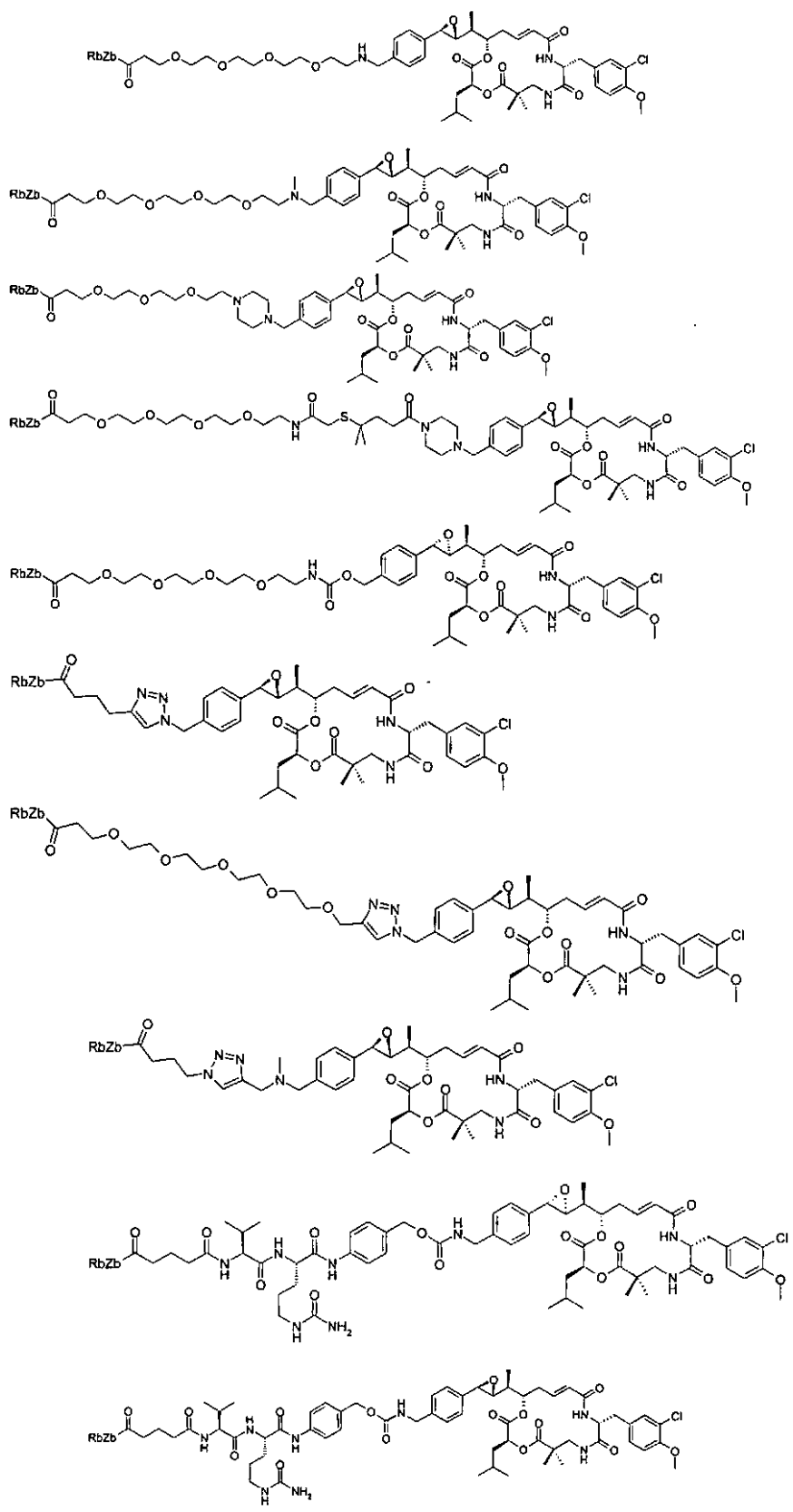
12. Un derivado de criptoficina según la reivindicación 1, elegido entre:

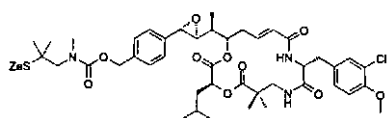


10

5

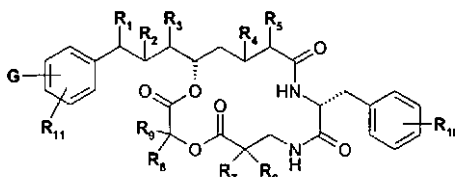
10



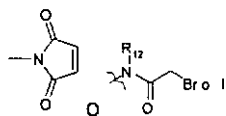


siendo Z_a , Z_b y R_b tal como se han definido en las reivindicaciones 1 o 10.

13. Un derivado de criptoficina de la fórmula (III):



en la que los grupos R_1 a R_{11} tienen los mismos significados que en las reivindicaciones 1, 11 o 12 y G representa un grupo $-(CH_2)_nY$, situándose en posición orto (o), meta (m) o para (p) del núcleo fenilo portador del motivo CR_1 , con preferencia en posición para, siendo n un número entero que va de 1 a 6 y representando Y $-N_3$; $-NR_{12}-CH_2-C=CH$ en el que R_{12} representa H o un grupo alquilo(C_1-C_6); $-OMs$; $-OC(=O)-O-(4\text{-nitrofenilo})$,



, representando R_{12} H o alquilo(C_1-C_6), más particularmente el grupo metilo.

14. Un derivado de criptoficina según la reivindicación 13, en el que Y representa $-N_3$; $-NR_{12}-CH_2-C=CH$ en el que R_{12} representa H o un grupo alquilo(C_1-C_6); $-OMs$ o $-OC(=O)-O-(4\text{-nitrofenilo})$.

15. Un derivado de criptoficina según una de las reivindicaciones 1 a 12, o bien según la fórmula (III) de la reivindicación 13 con $G = -(CH_2)_nY$ con $Y = -Cl$, $-N_3$, $-OH$, $-NH_2$, maleimido, haloacetamido destinado a ser conjugado con un agente de selección de la diana.

16. Un derivado de criptoficina según la reivindicación 15, en el que el agente de selección de la diana es un ligando, una proteína, un anticuerpo, más particularmente monoclonal, un fragmento de proteína o de anticuerpo, un péptido, un oligonucleótido o un oligosacárido.

17. Un procedimiento de preparación de un agente de selección de la diana al que está unido al menos un derivado de criptoficina, denominado conjugado, que consiste en:

(i) poner en contacto y dejar reaccionar una solución acuosa de un agente de selección de la diana eventualmente tamponada y una solución del derivado de criptoficina tal

como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 16;

(ii) después separar opcionalmente el conjugado formado en la etapa (i) del derivado de criptoficina y/o del agente de selección de la diana que no haya reaccionado y/o de los agregados que se hayan formado.

5

18. Un procedimiento según la reivindicación 17, en el cual:

- en presencia de un derivado de criptoficina que comprende un grupo químico reactivo GCR1 de tipo $-SZ_a$, el agente de selección de la diana comprende:
 - grupos químicos disulfuros en el caso en que GCR1 representa $-SH$;
 - grupos químicos tioles en el caso en que GCR1 representa $-SZ_a$ con $Z_a \neq H$;
 - grupos químicos maleimido o yodoacetamido en el caso en que GCR1 representa $-SH$;
- en presencia de un derivado de criptoficina que comprende un grupo químico reactivo GCR1 de tipo $-C(=O)-Z_bR_b$, se hace reaccionar el derivado de criptoficina con las funciones amino del agente de selección de la diana, especialmente los grupos ϵ -amino portados por las cadenas laterales de los residuos de lisina (Lys) de un anticuerpo;
- en presencia de un derivado de criptoficina de la fórmula (III) con $G = -(CH_2)_nY$, el agente de selección de la diana comprende grupos $-SH$ cuando $Y = -Cl$ o $-maleimido$, grupos $-C \equiv CH$ cuando $Y = -N_3$ o grupos ácido carboxílico cuando $Y = -OH$ o $-NH_2$;
- en presencia de un derivado de criptoficina que comprende un grupo químico reactivo GCR1 de tipo maleimido o haloacetamido, el agente de selección de la diana comprende grupos químicos tioles.

10

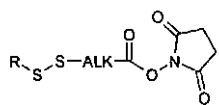
15

20

25

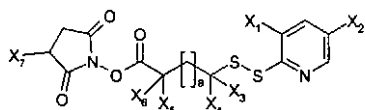
19. Un procedimiento según las reivindicaciones 17 o 18, en el cual:

- en presencia de un derivado de criptoficina que comprende un grupo químico reactivo GCR1 de tipo $-SZ_a$, el agente de selección de la diana se modifica con ayuda de un agente de modificación elegido entre un compuesto de la fórmula:

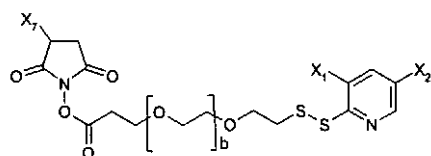


30

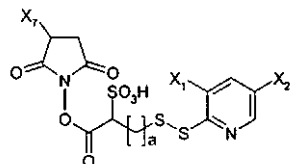
en la que R representa un grupo alquilo (C_1-C_6), arilo, heteroarilo, cicloalquilo (C_3-C_7), heterocicloalquilo (C_3-C_7) y ALK representa un grupo alquilen (C_1-C_6);



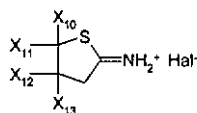
, un análogo pegilado de fórmula:



o un análogo sulfónico de fórmula



en los cuales X_3 , X_4 , X_5 , X_6 representan H o un grupo alquilo (C_1-C_6), X_1 y X_2 representan -H, $-CONX_8X_9$, $-NO_2$, X_8 y X_9 representan H o un grupo alquilo (C_1-C_6), X_7 representa $-SO_3^+M^+$ o H o bien un grupo de amonio cuaternario y a indica un número entero que va de 0 a 4 y b indica un número entero



que va de 0 a 2000;

en la que:

- Hal representa un átomo de halógeno;

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

- cada uno de los X_{11} , X_{12} , X_{13} representa independientemente un átomo de hidrógeno o bien puede representar X_3 ;

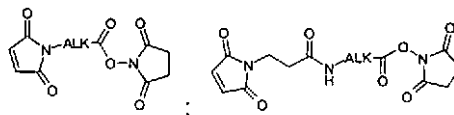
o X_{10} y X_{11} forman conjuntamente un ciclo alqueno (C_2-C_5), no sustituido o sustituido con uno a cinco grupos alquilo (C_1-C_4);

o X_{10} o X_{11} forman conjuntamente con X_{12} un ciclo alqueno (C_1-C_5), no sustituido o sustituido con uno a cinco grupos alquilo (C_1-C_4)

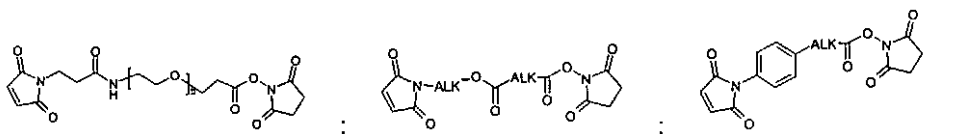
y X_{14} es -H o un grupo alquilo (C_1-C_8);

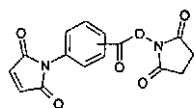
➤ en presencia de un derivado de criptocina que comprende un grupo químico reactivo GCR1 de tipo -SH, el agente de selección de la diana se modifica con ayuda de un agente de modificación elegido entre succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato;

sulfosuccinimidil-4-(N-



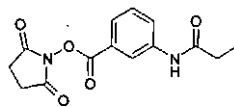
maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato;



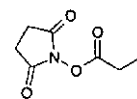


indicando ALK un grupo alquileo(C₁-C₁₂) y siendo b un número

entero comprendido entre 0 y 2000;

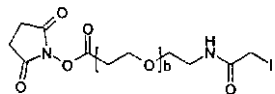


;



succinimidil-N-bromoacetato;

succinimidil-3-(N-bromoacetamido)propionato;



, siendo b un número entero comprendido entre 0 y 2000.

5

20. Un conjugado susceptible de ser obtenido por el procedimiento según una de las reivindicaciones 17 a 19.

10

21. Un conjugado según la reivindicación 20, caracterizado por una DAR determinada a partir de la desconvolución del espectro HRMS superior a 1, con preferencia comprendida entre 2 y 10 y más particularmente entre 2 y 7.

15

22. Un conjugado según la reivindicación 20, caracterizado por una DAR determinada con ayuda de un espectrofotómetro UV superior a 0,5, con preferencia superior a 1, más particularmente comprendida entre 1 y 10, aún más particularmente entre 2 y 7, siendo calculada la DAR por la ecuación:

$$DAR = C_D / C_A$$

en la que:

$$C_D = [(\epsilon_{A\lambda 1} \times A_{\lambda 2}) - (\epsilon_{A\lambda 2} \times A_{\lambda 1})] / [(\epsilon_{D\lambda 2} \times \epsilon_{A\lambda 1}) - (\epsilon_{A\lambda 2} \times \epsilon_{D\lambda 1})]$$

20

$$C_A = [A_{\lambda 1} - (C_D \times \epsilon_{D\lambda 1})] / \epsilon_{A\lambda 1}$$

y

indicando $A_{\lambda 1}$ y $A_{\lambda 2}$ respectivamente las absorbancias de la solución de conjugado respectivamente a las longitudes de onda $\lambda 1$ y $\lambda 2$;

25

indicando $\epsilon_{D\lambda 1}$ y $\epsilon_{D\lambda 2}$ respectivamente los coeficientes de absorción molares del derivado de criptoficina antes de la conjugación a dos longitudes de onda $\lambda 1$ y $\lambda 2$, coeficientes medidos sobre los compuestos de la fórmula (II) de tipo -SZ_a con Z_a = -SMe o de tipo -C(=O)-Z_bR_b con Z_bR_b = -OMe o -OCH₂-CH=CH₂;

indicando $\epsilon_{A\lambda 1}$ y $\epsilon_{A\lambda 2}$ respectivamente los coeficientes de absorción molares del anticuerpo desnudo antes de la conjugación a las dos longitudes de onda $\lambda 1$ y $\lambda 2$.

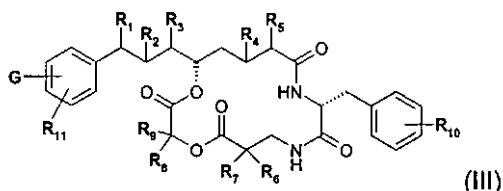
30

23. Un conjugado según la reivindicación 22, en el que $\lambda 1$ = 280 nm y $\lambda 2$ se elige en la gama de longitudes de onda específicas 246 nm - 252 nm.

24. Una solución de conjugado susceptible de ser obtenida por el procedimiento según una de las reivindicaciones 17 a 19, o que comprende el conjugado tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 20 a 23.

5 25. La utilización de un derivado de criptoficina según una de las reivindicaciones 1 a 13, para la preparación de un agente de selección de la diana al que está unido al menos uno de dichos derivados de criptoficina.

26. La utilización de un derivado de criptoficina de la fórmula (III):

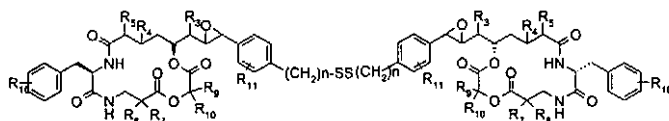


en la que:

G representa un grupo $-\text{CH}=\text{CH}_2$ o $-(\text{CH}_2)_n\text{Y}$, que se sitúa en posición orto (o), meta (m) o para (p) del núcleo fenilo portador del motivo CR_1 , con preferencia en posición para;

Y representa $-\text{OH}$; $-\text{Cl}$; $-\text{N}_3$; $-\text{NH}_2$; $-\text{SH}$; $-\text{COOH}$; $-\text{NR}_{12}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{CH}$ en el que R_{12} representa H o un grupo alquilo (C_1-C_6), más particularmente el grupo metilo; $-\text{OGP}$ en el que GP indica un grupo saliente; $-\text{OC}(=\text{O})-\text{O}$ - (4-nitrofenilo); -maleimido.

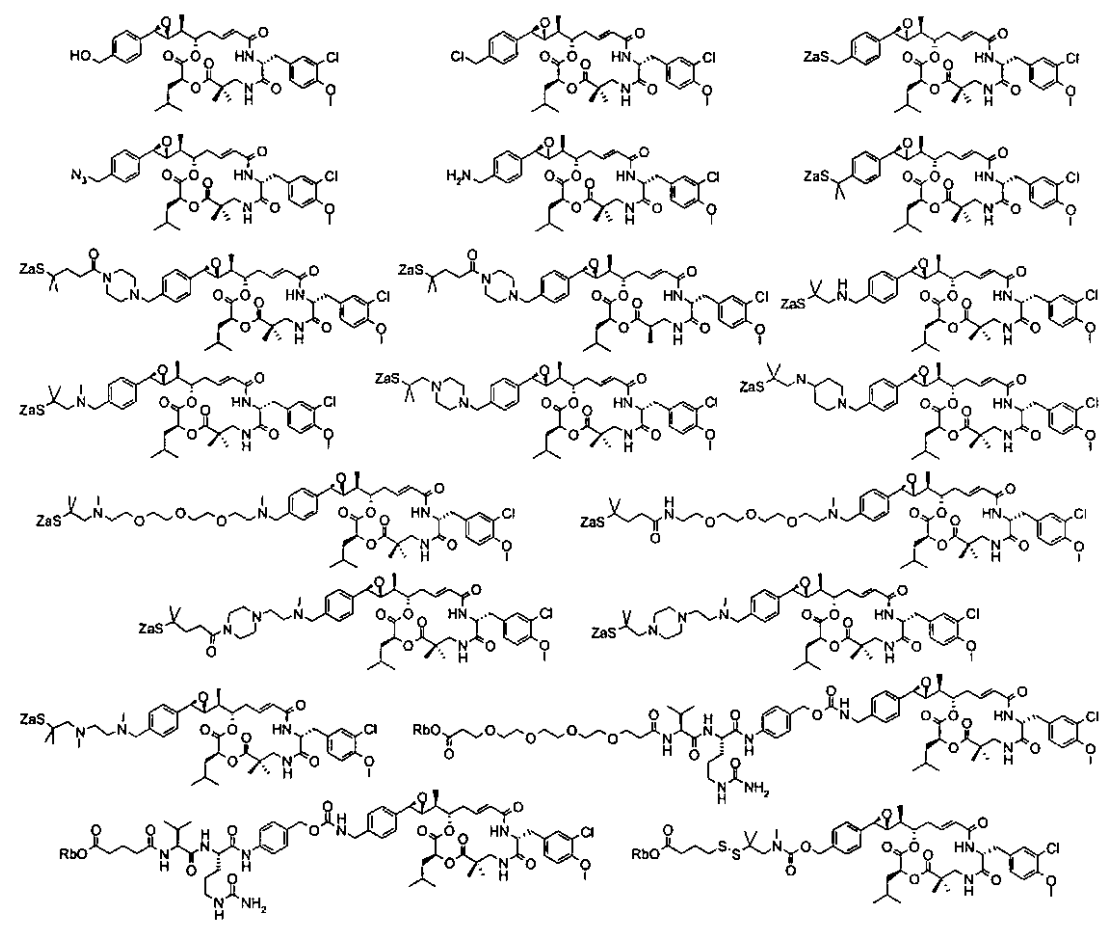
o de la fórmula:

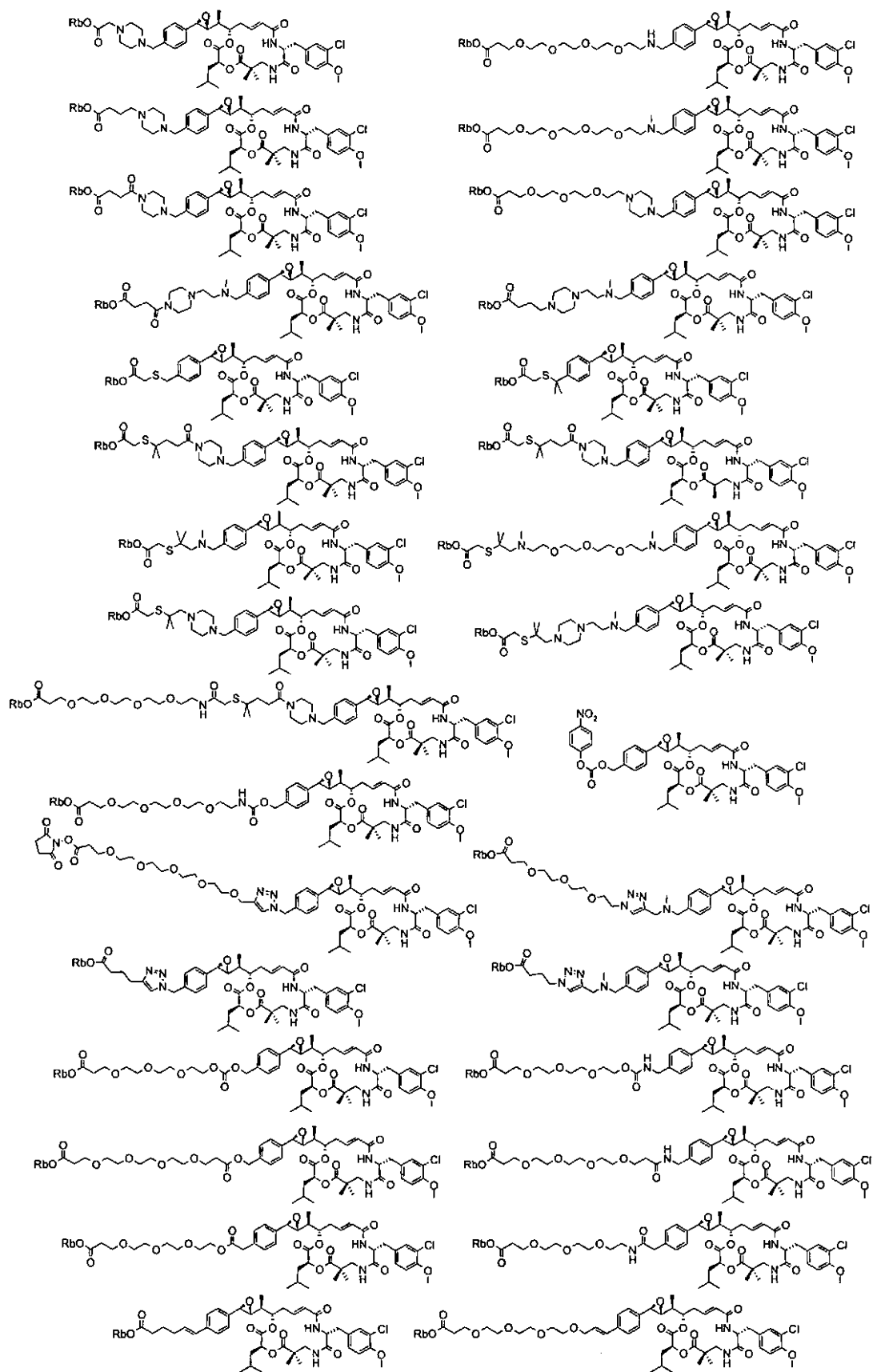


teniendo los grupos R_1 a R_{11} los mismos significados que en las reivindicaciones 1, 11 o 12 y siendo n un número entero que va de 1 a 6,

para la preparación de un agente de selección de la diana al que está unido al menos uno de dichos derivados de criptoficina.

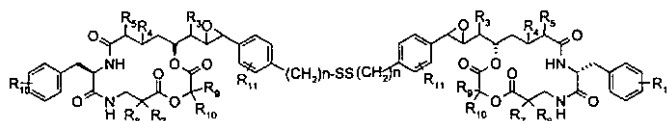
27. La utilización de un derivado de criptoficina elegido entre uno de los siguientes:





siendo Z_a , Z_b y R_b tal como se han definido en las reivindicaciones 1 o 10, para la preparación de un agente de selección de la diana al que está unido al menos un derivado de criptoficina.

- 5 28. Un derivado de criptoficina de la fórmula:



teniendo los grupos R_1 a R_{11} los mismos significados que en las reivindicaciones 1, 11 o 12 y siendo n un número entero que va de 1 a 6,

- 10 29. Un derivado de criptoficina según una de las reivindicaciones 1 a 15, para utilización como anticanceroso.
30. Un conjugado según las reivindicaciones 20 a 23, para utilización como anticanceroso.
- 15 31. Una solución de conjugado según la reivindicación 24, para utilización como anticanceroso.
32. La utilización de un derivado de criptoficina según una de las reivindicaciones 1 a 15, para la preparación de un medicamento anticanceroso.
- 20 33. La utilización de un conjugado según las reivindicaciones 20 a 23, para la preparación de un medicamento anticanceroso.
- 25 34. La utilización de una solución de conjugado según la reivindicación 24, para la preparación de un medicamento anticanceroso.

Resumen:

La invención se refiere a un agente de selección de la diana al que está unido al menos un derivado de criptoficina de la fórmula (I), en la que: R1 representa un átomo de halógeno y R2
5 representa un grupo -OH, un grupo acilo derivado de un aminoácido AA o un grupo alcanilo(C1-C4); o bien R1 y R2 forman conjuntamente un motivo epóxido; AA indica un aminoácido natural o no natural; R3 representa un grupo alquilo(C1-C6); R4 y R5 representan los dos H o forman conjuntamente un doble enlace CH=CH entre C13 y C14; R6 y R7 representan independientemente uno de otro H o un grupo alquilo(C1-C6); R8 y R9 representan
10 independientemente uno de otro H o un grupo alquilo(C1-C6); R10 representa al menos un sustituyente del núcleo fenilo elegido entre: H, un grupo OH, alcoxi(C1-C4), un átomo de halógeno o bien un grupo -NH₂, -NHalquilo(C1-C6) o -N(alquilo(C1-C6))₂; R11 representa al menos un sustituyente del núcleo fenilo elegido entre H o un grupo alquilo(C1-C4); estando
15 unidos el agente de selección de la diana y el derivado de criptoficina de forma covalente, situándose la unión en posición orto (o), meta (m) o para (p) del núcleo fenilo portador del motivo CR1.

20

25

30

35

Figura 1

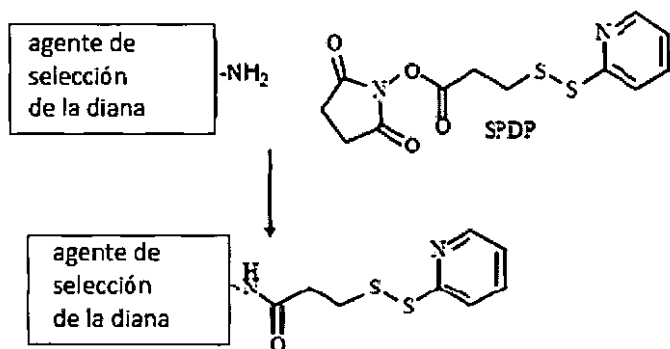
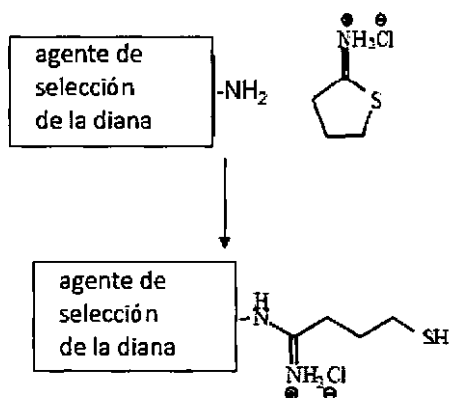


Figura 2

5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2010/050986

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D273/08 A61K31/395 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/08505 A1 (LILLY CO ELI [US]; UNIV HAWAII [US]; UNIV WAYNE STATE [US]; AL AWAR RI) 5 March 1998 (1998-03-05) cited in the application	1-5, 10, 11, 15, 16
Y	page 2, lines 1-10 examples 1-78 claim 1 ----- -/--	6-9, 12-14, 17-34

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 November 2010

Date of mailing of the international search report

30/11/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Samsam Bakhtiary, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2010/050986

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AL-AWAR RIMA S ET AL: "A convergent approach to Cryptophycin 52 analogues: Synthesis and biological evaluation of a novel series of fragment a epoxides and chlorohydrins", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 46, no. 14, 3 July 2003 (2003-07-03), pages 2985-3007, XP002467582, ISSN: 0022-2623	15,16
Y	* abstract; table 2; compounds 28-51	1-14, 17-34
Y	WO 2009/002993 A1 (ENDOCYTE INC [US]; LEAMON CHRISTOPHER PAUL [US]; WANG YU [US]; VLAHOV) 31 December 2008 (2008-12-31) paragraph [0001] paragraph [0037]	1-34
Y	WO 2005/116255 A2 (ARCHEMIX CORP [US]; STANTON MARTIN [US]; KURZ MARKUS [US]; WILSON CHAR) 8 December 2005 (2005-12-08) page 1, lines 7-12 page 46, lines 3-11	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2010/050986

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9808505	A1	05-03-1998	AT 328592 T 15-06-2006
		AU 722492 B2 03-08-2000	
		BR 9711986 A 24-08-1999	
		CA 2264063 A1 05-03-1998	
		CN 1233957 A 03-11-1999	
		CZ 9900645 A3 13-10-1999	
		DE 69736067 T2 10-05-2007	
		DK 0934065 T3 09-10-2006	
		EP 0934065 A1 11-08-1999	
		ES 2267149 T3 01-03-2007	
		HK 1025036 A1 22-09-2006	
		IL 128610 A 25-07-2004	
		JP 4364944 B2 18-11-2009	
		JP 2002514175 T 14-05-2002	
		NO 990833 A 26-04-1999	
		PT 934065 E 31-10-2006	
		SI 0934065 T1 28-02-2007	
		TR 9901104 T2 21-07-1999	
WO 2009002993	A1	31-12-2008	AU 2008268432 A1 31-12-2008
		CA 2690943 A1 31-12-2008	
		CN 101784565 A 21-07-2010	
		EP 2176293 A1 21-04-2010	
		JP 2010531363 T 24-09-2010	
WO 2005116255	A2	08-12-2005	EP 1756318 A2 28-02-2007

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2010/050986

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07D273/08 A61K31/395 A61P35/00 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07D A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98/08505 A1 (LILLY CO ELI [US]; UNIV HAWAII [US]; UNIV WAYNE STATE [US]; AL AWAR RI) 5 mars 1998 (1998-03-05) cité dans la demande page 2, ligne 1-10 exemples 1-78 revendication 1 ----- -/--	1-5, 10, 11, 15, 16
Y		6-9, 12-14, 17-34
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 16 novembre 2010		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 30/11/2010
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040. Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Samsam Bakhtiary, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2010/050986

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	AL-AWAR RIMA S ET AL: "A convergent approach to Cryptophycin 52 analogues: Synthesis and biological evaluation of a novel series of fragment a epoxides and chlorohydrins", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 46, no. 14, 3 juillet 2003 (2003-07-03), pages 2985-3007, XP002467582, ISSN: 0022-2623	15,16
Y	* abrégé; tableau 2; composés 28-51	1-14, 17-34
Y	WO 2009/002993 A1 (ENDOCYTE INC [US]; LEAMON CHRISTOPHER PAUL [US]; WANG YU [US]; VLAHOV) 31 décembre 2008 (2008-12-31) alinéa [0001] alinéa [0037]	1-34
Y	WO 2005/116255 A2 (ARCHEMIX CORP [US]; STANTON MARTIN [US]; KURZ MARKUS [US]; WILSON CHAR) 8 décembre 2005 (2005-12-08) page 1, ligne 7-12 page 46, ligne 3-11	1-34

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2010/050986

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9808505	A1	05-03-1998	AT 328592 T	15-06-2006
			AU 722492 B2	03-08-2000
			BR 9711986 A	24-08-1999
			CA 2264063 A1	05-03-1998
			CN 1233957 A	03-11-1999
			CZ 9900645 A3	13-10-1999
			DE 69736067 T2	10-05-2007
			DK 0934065 T3	09-10-2006
			EP 0934065 A1	11-08-1999
			ES 2267149 T3	01-03-2007
			HK 1025036 A1	22-09-2006
			IL 128610 A	25-07-2004
			JP 4364944 B2	18-11-2009
			JP 2002514175 T	14-05-2002
			NO 990833 A	26-04-1999
			PT 934065 E	31-10-2006
			SI 0934065 T1	28-02-2007
			TR 9901104 T2	21-07-1999
WO 2009002993	A1	31-12-2008	AU 2008268432 A1	31-12-2008
			CA 2690943 A1	31-12-2008
			CN 101784565 A	21-07-2010
			EP 2176293 A1	21-04-2010
			JP 2010531363 T	24-09-2010
WO 2005116255	A2	08-12-2005	EP 1756318 A2	28-02-2007

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS PCT/FR2010/050986

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

**NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT**

(règle 92bis.1 et instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire :

SENNINGER, Thierry
c/o sanofi-aventis
Département Brevets
174 avenue de France
F-75013 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 13 octobre 2011 (13.10.2011)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire FR2009/071	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale n° PCT/FR2010/050986	Date du dépôt international (jour/mois/année) 20 mai 2010 (20.05.2010)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne :

☒ le déposant ☐ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse SANOFI-AVENTIS 174 avenue de France F-75013 Paris FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	n° de téléphone +33 1 55 71 40 91	
	n° de télécopieur +33 1 53 77 87 51	
	Address électronique	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne :

☐ la personne ☒ le nom ☐ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse SANOFI 174 avenue de France F-75013 Paris FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	n° de téléphone +33 1 55 71 40 91	
	n° de télécopieur +33 1 53 77 87 51	
	Address électronique ☐ Autorisation de recourir au courrier électronique	

3. Observations complémentaires, le cas échéant :

4. Une copie de cette notification a été envoyée

☒ à l'office récepteur	☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale	☒ aux offices désignés concernés
☐ [à l'] [aux] administration(s) indiquée(s) pour la recherche supplémentaire	☐ aux offices élus concernés
	☐ autre destinataire :

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse n° de télécopieur +41 22 338 71 30	Fonctionnaire autorisé Soleiman Ali e-mail pt09.pct@wipo.int n° de téléphone +41 22 338 74 09
--	---

Sobre

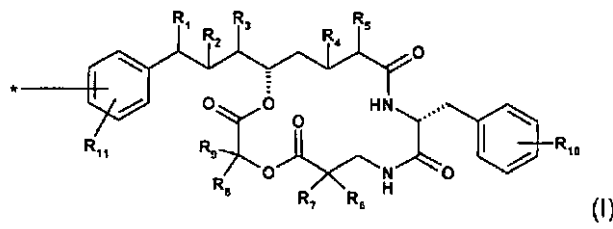
con

Artes

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud:		(51) Int Cl: C07D 273/008 (71) Solicitante(s) SANOFI	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 0903170 0905651	(32) Fecha 29/06/2009 25/11/2009	(33) País FR FR
		(72) Inventor(es) HERVÉ BOUCHARD Y OTROS	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 29/01/2012 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 20/05/2010 No. de solicitud PCT/FR2010/050986		(87) Publicación internacional Fecha: 06/01/2011 N° publicación: WO 2011/001052 A1	
(54) Titulo: NUEVOS CONJUGADOS, SU PREPARACIÓN Y SU APLICACIÓN TERAPÉUTICA			

Resumen:

La invención se refiere a un agente de selección de la diana al que está unido al menos un derivado de criptoficina de la fórmula (I), en la que: R1 representa un átomo de halógeno y R2 representa un grupo -OH, un grupo acilo derivado de un aminoácido AA o un grupo alcaniloxi(C1-C4); o bien R1 y R2 forman conjuntamente un motivo epóxido; AA indica un aminoácido natural o no natural; R3 representa un grupo alquilo(C1-C6); R4 y R5 representan los dos H o forman conjuntamente un doble enlace CH=CH entre C13 y C14; R6 y R7 representan independientemente uno de otro H o un grupo alquilo(C1-C6); R8 y R9 representan independientemente uno de otro H o un grupo alquilo(C1-C6); R10 representa al menos un sustituyente del núcleo fenilo elegido entre: H, un grupo OH, alcoxi(C1-C4), un átomo de halógeno o bien un grupo -NH2, -NHalquilo(C1-C6) o -N(alquilo(C1-C6))2; R11 representa al menos un sustituyente del núcleo fenilo elegido entre H o un grupo alquilo(C1-C4); estando unidos el agente de selección de la diana y el derivado de criptoficina de forma covalente, situándose la unión en posición orto (o), meta (m) o para (p) del núcleo fenilo portador del motivo CR1



799
180

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 126467
		Bogotá D.C., Diciembre 28 de 2011 - 11:27:04

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470816	28/12/2011	19.709.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00 571.000.00
			<u>\$571.000.00</u>
			=====

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-180696- -00000-0000
Fecha: 2011-12-29 11:52:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 188
Act. 411 PRESENTACION Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 187

COLO: 00751-841-033-2.

780
181

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 122614
		Bogotá D.C., Diciembre 16 de 2011 - 18:38:37

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470886	16/12/2011	36.506.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1641 S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACION (CB.NOMBRE, DOMICIL)	289.000.00 289.000.00
			\$289.000.00

SON: **DOSCIENTOS OCHENTA Y NUEVE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-180696- -00000-0000

Fecha: 2011-12-29 11:52:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 188

Act. 411 PRESENTACION Folios: 187

COLO:00751-841-033-2

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Diciembre 16 de 2011 - 18:38:47

781
182

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

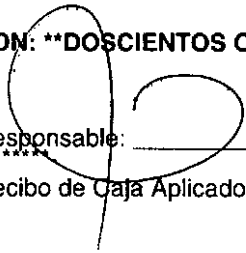
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 122615
		Bogotá D.C., Diciembre 16 de 2011 - 18:38:37

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470886	16/12/2011	36.506.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1641 S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACION (CB.NOMBRE, DOMICIL)	289.000.00	289.000.00
			\$289.000.00
=====			

SON: **DOSCIENTOS OCHENTA Y NUEVE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-180698- -00000-0000

Fecha: 2011-12-29 11:52:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 188

Act. 411 PRESENTACION Eve: 378 FASENACIONALI
~~Folios: 187~~

0010:00751-841-033-2.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Líneas: 018000-810165 Call Center: (571) 6513240

Diciembre 16 de 2011 - 18:38:47

782
183

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 125023
		Bogotá D.C., Diciembre 23 de 2011 - 14:04:17

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

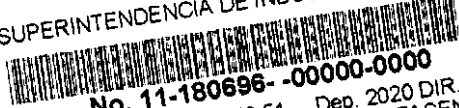
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470901	23/12/2011	12.939.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	27.000.00 27.000.00
			\$27.000.00
=====			

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-180696-00000-0000
Fecha: 2011-12-29 11:52:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 188
Act. 411 PRESENTACION Folios: 187

COLO:00751+841-033-2.

183
184

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 122578
		Bogotá D.C., Diciembre 16 de 2011 - 18:38:37

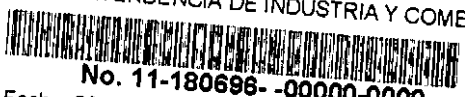
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470886	16/12/2011	36.506.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	21 CERTIFICACIONES	14.000.00 14.000.00
			\$14.000.00

SON: **CATORCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Resibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-180696- -00000-0000
Fecha: 2011-12-29 11:52:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 188
Act. 411 PRESENTACION Folios: 187

0010: 00751-841-033-2.

784
185

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 122576
		Bogotá D.C., Diciembre 16 de 2011 - 18:38:37

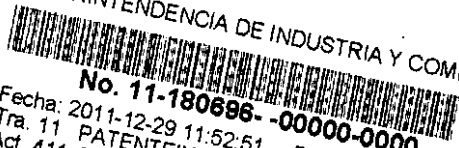
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470886	16/12/2011	36.506.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNEDITABIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	21 CERTIFICACIONES	14.000.00	14.000.00
				\$14.000.00

SON: **CATORCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-180696-00000-0000
Fecha: 2011-12-29 11:52:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 188
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION Editos: 187

COLO: 00751-841-033-2.

185
186

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 122577
		Bogotá D.C., Diciembre 16 de 2011 - 18:38:37

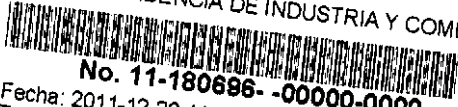
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470886	16/12/2011	36.506.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	21 CERTIFICACIONES	14.000.00 14.000.00
			\$14.000.00

SON: **CATORCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-180686- -00000-0000
Fecha: 2011-12-29 11:52:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 188
Act. 411 PRESENTACION Folios: 187

0010: 00751-841-033-2

786
187

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 122676
		Bogotá D.C., Diciembre 16 de 2011 - 18:38:37

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470886	16/12/2011	36.506.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00
			\$1.000.00

SON: **MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-180696-00000-0000
Fecha: 2011-12-29 11:52:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 188
Act. 411 PRESENTACION Folios: 187

COLO: 00751-841-033-2.



No. 11-180696-00000-0000

Fecha: 2011-12-29 11:52:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 188

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐