

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-029986- -00000-0000

Fecha: 2012-02-21 11:35:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 93

Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** _____ CONJUGADOS DE DIMEROS DE PIRROLO (1,4) BENZODIAZEPINA

_____ COMO AGENTES ANTICANCEROSOS

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

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-029986- -00000-0000
Fecha: 2012-02-21 11:35:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 93

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: 54 rue La Boétie,
75008 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. Alain **COMMERÇON**
c/o Sanofi-aventis,
Département Brevets,
174 avenue de France,
F-75013 Paris,
Francia

2. Laurence **GAUZY-LAZO**
c/o Sanofi-aventis,
Département Brevets,
174 avenue de France,
F-75013 Paris,
Francia

5

PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/FR2010/051709 Fecha: 12 de agosto de 2010
Publicación Internacional No. WO 2011/023883 A1 Fecha: 03 de marzo de 2011

6

Título (54)
CONJUGADOS DE DÍMEROS DE PIRROLO[1,4]BENZODIAZEPINA COMO AGENTES ANTICANCEROSOS

7

Clasificación Internacional (51) C07D 519/000

8

Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

FR
FR

(32) Fecha

25 de agosto de 2009
11 de septiembre de 2009

(31) Número de Solicitud

0904043
0904368

9

Comprobante de pago No.: 12-0015902 **Fecha:** 16 de febrero de 2012
Comprobante de pago No.: 12-0011425 **Fecha:** 03 de febrero de 2012

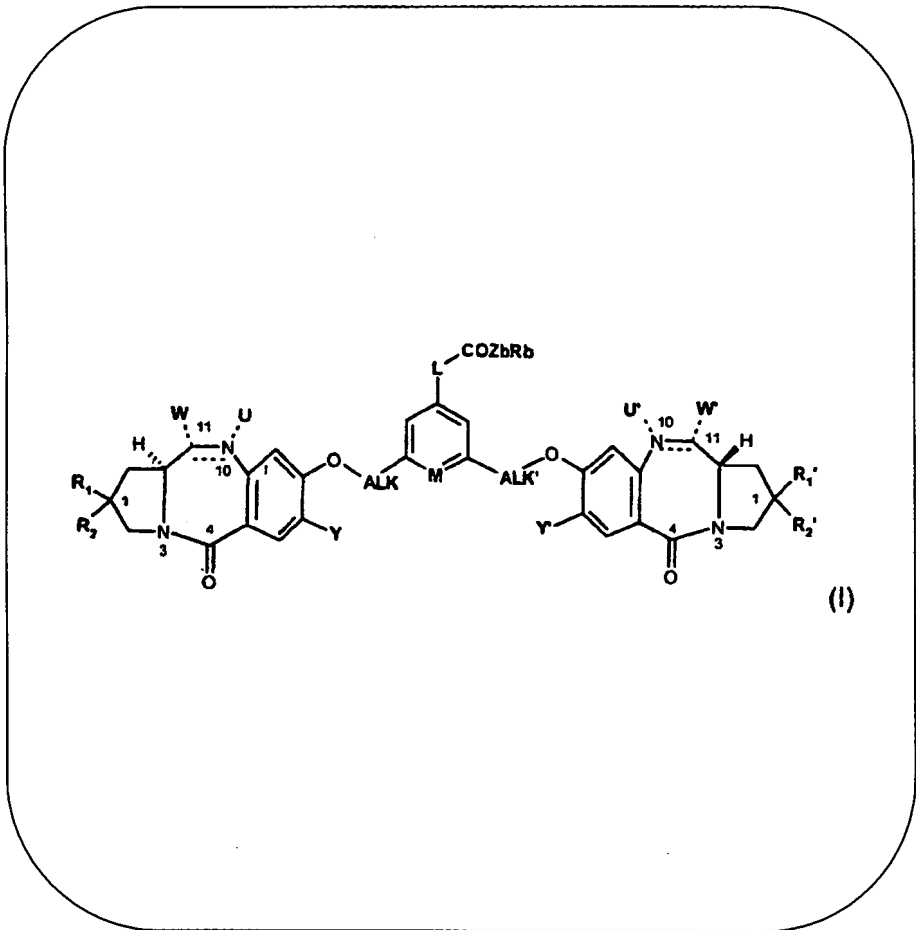
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 590.000.00.
- ☒ Comprobante de pago por 24 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$720.000.00.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poder de
- ☒ 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 2011/023883 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

JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2011/023883 A1

Descripción:

Páginas 50 en español

Reivindicaciones: Número (s) 34

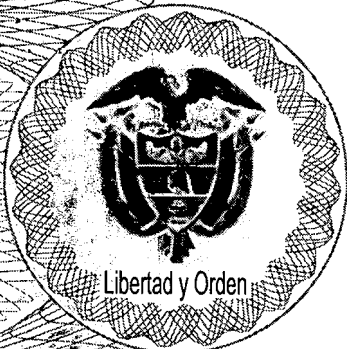
Figuras: Número (s) 5

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

3. ☒ Forma PCT/IB/306. Notificación de la inscripción del cambio de nombre del solicitante
SANOFI-AVENTIS por **SANOFI**

4. ☒ Extracto de publicación.

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



REPÚBLICA DE COLOMBIA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
LEGALIZACION

País: **REPUBLICA DE COLOMBIA**
(Country: - Pays:)

El presente documento público
(This public document - Le présent acte public)

Ha sido firmado por: **CALADO NOGUERA EDUARDO**
(Has been signed by: - A été signé par:)

Actuando en calidad de: **TRADUCTOR OFICIAL**
(Acting in the capacity of: - Agissant en qualité de:)

Lleva el sello/estampilla de: **TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL**
(Bears the seal/stamp of: - Est revêtu du sceau de / timbre de:)

Certificado
(Certified - Attesté)

En: **BOGOTA D.C**
(At: - À:)

El: **2/14/2012 12:10:58 p.m.**
(On: - Le:)

Por: **APOSTILLA Y LEGALIZACIÓN**
(By: The Ministry of Foreign Affairs of Colombia - Par: Ministère des Affaires Étrangères de la Colombie)

No: **LMCO121058397**
(Under Number: - Sous le numéro:)

Nombre del Titular: **87819**
(Name of the holder of document: - Nom du titulaire:)

Tipo de documento: **TRADUCCION APOSTILLA**
(Type of document: - Type du document:)

Número de hojas: **4**
(Number of pages: - Nombre de pages:)

01304100118793901256

Firmado Digitalmente por: (Digitally Signed by:)
Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia
AMPARO DE LA CRUZ TAMAYO RODRIGUEZ
Reason: DOCUMENT AUTHENTICITY
BOGOTA - COLOMBIA

La autenticidad de este documento puede ser verificada en el Registro Electrónico que se encuentra en la siguiente página
The authenticity of this document may be verified by accessing the e-Register on the following web site:
L'authenticité de cette document peut être vérifiée en accédant l'e-Registre sur le site web suivant:

www.cancilleria.gov.co/legalizaciones



REPÚBLICA DE COLOMBIA

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

LEGALIZACION

País: **REPUBLICA DE COLOMBIA**
(Country: - Pays:)

El presente documento público
(This public document - Le présent acte public)

Ha sido firmado por: **TRUQUE VELEZ COLOMBIA**
(Has been signed by: - A été signé par:)

Actuando en calidad de: **TRADUCTOR OFICIAL**
(Acting in the capacity of: - Agissant en qualité de:)

Lleva el sello/estampilla de: **TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL**
(Bears the seal/stamp of: - Est revêtu du sceau de / timbre de:)

Certificado
(Certified - Attesté)

En: **BOGOTA D.C**
(At: - À:)

El: **2/14/2012 12:11:19 p.m.**
(On: - Le:)

Por: **APOSTILLA Y LEGALIZACIÓN**
(By: The Ministry of Foreign Affairs of Colombia - Par: Ministère des Affaires Étrangères de la Colombie)

No: **LMCO121118788**
(Under Number: - Sous le numéro:)

Nombre del Titular: **87819**
(Name of the holder of document: - Nom du titulaire:)

Tipo de documento: **TRADUCCION APOSTILLA**
(Type of document: - Type du document:)

Número de hojas: **1**
(Number of pages: - Nombre de pages:)

01304100118793901256

Firmado Digitalmente por: (Digitally Signed by:)
Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia
AMPARO DE LA CRUZ TAMAYO RODRIGUEZ
Reason: DOCUMENT AUTHENTICITY
BOGOTA - COLOMBIA

La autenticidad de este documento puede ser verificada en el Registro Electrónico que se encuentra en la siguiente página
The authenticity of this document may be verified by accessing the e-Register on the following web site:
L'autenticité de cette document peut être vérifiée en accédant l'e-Registre sur le site web suivant:

www.cancilleria.gov.co/legalizaciones

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

sanofi-aventis Ref No. FR2009/092

ASSIGNMENT AND AGREEMENT

Effective as of 25 August 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.FR2009/092, and entitled

New anticancer agents, preparation of said agents and the therapeutic use of said agents

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

Priority Application Filing Date: 25 August 2009
Priority Application No.: France 0904043

Priority Application Filing Date: 11 September 2009
Priority Application No.: France 0904368

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: _____

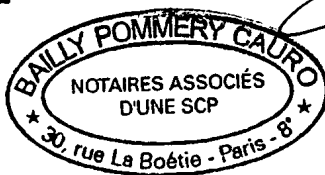
Inventor's Name: **COMMERÇON Alain**

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

Witnessed by:

Jidong ZHANG

Catherine DANIEL



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 19 DEC. 2011

6. le.....

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

8. sous n° 87 879.....

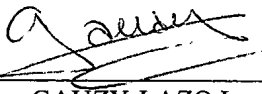
9. Sceau :.....

10. Signature :

JOAN BAILLY
Avocat général

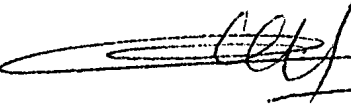
"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"

Signed at Vitry / Seine - France on this 21 day of July 2010,
(City, State and Nation)

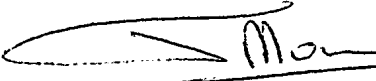
Signature: 
Inventor's Name: GAUZY-LAZO Laurence
Residential Address: c/o sanofi-aventis,
Département Brevets,
174 avenue de France,
75013 PARIS, FRANCE

Witnessed by:

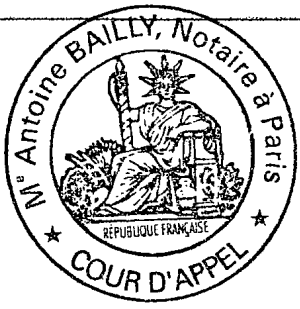
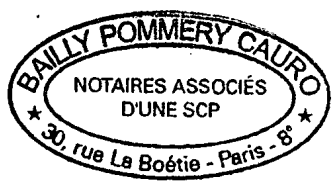
Alexandra FERRIER



Pierre MOURIER



Je soussigné Me **Antoine BAILLY**
Notaire à Paris, certifie matériellement
la signature de Monsieur Alain COMTESSON
et Madame Laurence GAUZY-LAZO.
apposée sur le présent document.
Cette certification ne comporte aucune
vérification de l'exactitude des faits et
actes mentionnés dans le présent document.





TRADUCCIÓN OFICIAL 057/2012 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL AUTORIZADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 Y DEBIDAMENTE INSCRITO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA.

SANOFI-AVENTIS REF NO. FR2009/092

CESIÓN Y CONVENIO

En vigor a partir del 25 de agosto de 2009, por el valor recibido y con la intención de ser obligatoria, yo el abajo firmante cedente, vendo, cedo y transfiero a **SANOFI-AVENTIS** (CESIONARIO), domiciliado en 174 Avenue de France, 75013 PARIS, FRANCIA, y a sus sucesores, cesionarios y representantes legales, todo el derecho, título e interés sobre mi invento y mis mejoras sobre el mismo en todos los países del mundo, relacionados con la solicitud de patente, con número de expediente jurídico No. FR2009/092, titulada **NUEVOS AGENTES ANTICANCERÍGENOS, PREPARACIÓN DE LOS MISMOS Y EL USO TERAPÉUTICO DE DICHOS AGENTES**

Y para todas las solicitudes de patente que reivindican prioridad sobre o se derivan de dichas solicitudes de prioridad:

Fecha de radicación de solicitud de prioridad: 25 de agosto
De 2009

Solicitud de prioridad número FRANCE 0904043

Fecha de radicación de solicitud de prioridad: 11 de
septiembre de 2009

Solicitud de prioridad Número FRANCE 0904368


Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

Junto con todos los derechos y privilegios, incluyendo todos y cada uno de los beneficios de acuerdo con la Convención Internacional para la protección de la propiedad industrial, incluyendo el derecho a reivindicar prioridad con base en las solicitudes arriba informadas, y de acuerdo con todas y cada una de las patentes que se puedan otorgar en relación con ellas, junto con todo el derecho, título e interés sobre toda solicitud de patente presentada o que vaya a presentarse sobre dicho invento en cualquier otro país u organización patentaria, incluyendo continuaciones, divisiones, renovaciones, reanimaciones y cualesquiera solicitudes sustitutivas de dicha solicitud prioritaria, y todas y cada una de las patentes que se pudieren expedir con respecto a ellas, y cualquier segunda publicación, patente transitoria y ampliación así como derechos gubernamentales de exclusividad de los mismos.

Autorizo y solicito a las autoridades competentes que otorguen y expidan todas y cada una de las patentes sobre dicho invento a dicho cesionario o su sucesor o representante legal, o a los nominatarios que dicho cesionario pueda designar.

Acuerdo que, cuando se me lo solicite, en forma gratuita para dicho cesionario, pero por su cuenta, firmaré todos los documentos, haré los juramentos de ley y realizaré todos los actos que puedan ser necesarios, deseables o convenientes para obtener y mantener patentes sobre este invento en todos los países y transferiré título sobre el mismo a dicho

Eduardo Calado N.
Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

cesionario, sus sucesores, cesionarios, representantes legales o nominatarios.

Pacto con dicho cesionario, sus sucesores, cesionarios y representantes legales, que los derechos y propiedad aquí transferidos están libres de cualquier gravamen y que tengo pleno derecho a transferir los mismos tal como aquí se expresa.

Firmado en Vitry/Seine, Francia, hoy 31 de marzo de 2010.

Firma: ILEGIBLE

NOMBRE DEL INVENTOR: COMMERÇON, Alain

Dirección residencial: c/o sanofi-aventis,

Département Brevets, 174 avenue de France,

75013, PARIS, FRANCIA

Atestiguado por:

FIRMA : JIDONG ZHANG

FIRMA: CATHERINE DANIEL

SELLO: BAILLY POMMERY CAURO,

NOTARIOS ASOCIADOS D'UNE SCP

30, RUE LA BOÉTIE - PARIS - 8

Firmado en Vitry/Seine- Francia, el 21 de julio de 2010.

Firma: ILEGIBLE

NOMBRE DEL INVENTOR: GAUZY-LAZO Laurence

Dirección residencial: c/o sanofi-aventis,

Département Brevets, 174 avenue de France,

75013, PARIS, FRANCIA

Atestiguado por

FIRMA : ALEXANDRA FERRIER

Eduardo Calado N.
Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
 Inglés - Español - Inglés
 Res. 541 Febrero de 1976

FIRMA: PIERRE MOURIER

SELLO: BAILLY POMMERY CAURO,

NOTARIOS ASOCIADOS D'UNE SCP

30, RUE LA BOÉTIE - PARIS - 8

Sello para autenticar la firma de los arriba firmantes.

SELLO: ANTOINE BAILLY, NOTARIO DE PARIS. FIRMA ILEGIBLE.

APOSTILLA NO. 87819 DEL 19 DE DICIEMBRE DE 2011

COLO-0751-841-040-7

618 palabras. 2 horas.

ECN\ECN\ID-210523\WPCL0751

Bogotá, 10 de febrero de 2012.

Eduardo Calado N.
Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

13

Traducción Oficial de las legalizaciones en FRANCÉS de un documento de
CESIÓN escrito en INGLÉS, identificado con la referencia No. FR2009/092:

PÁGINAS 1 Y 2: Sello de los Notarios Asociados BAILLY, POMMERY,
CAURO, con despacho en el N° 30, rue de La Boétie, PARIS 8.

El suscrito ANTOINE BAILLY, Notario de París, certifica la autenticidad de las
firmas puestas al pie del presente documento por el Sr. ALAIN COMMERÇON
y la Sra. LAURENCE GAUZY-LAZO. Esta autenticación no implica ninguna
verificación de los hechos y documentos mencionados en el presente
documento.

(Firma manuscrita ilegible y sello del Señor ANTOINE BAILLY, Notario).

Es copia auténtica del documento original que he tenido a la vista.

(Firma manuscrita ilegible y sello del Señor ANTOINE BAILLY, Notario).

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

País: República Francesa

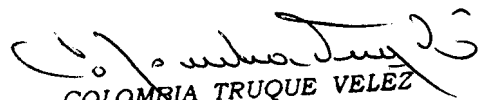
El presente documento público,
está firmado por el Sr. BAILLY
actuando en calidad de: Notario
y lleva el sello de: la Notaría.

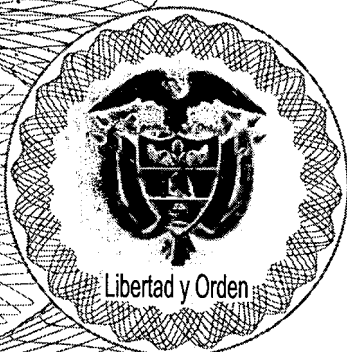
Se hace constar
en PARÍS, con fecha 19 de diciembre de 2011
por: el Procurador General del Tribunal de Apelación de París,
con el N° 87819

Firma ilegible de JEAN MARTIN, Abogado General, y sello del Tribunal de
Apelación.

Nota: "La apostilla confirma solamente la autenticidad de la firma, del sello o del
timbre del documento. No significa que el contenido del documento sea correcto o
que la República Francesa apruebe su contenido."

**ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DEL DOCUMENTO ORIGINAL,
HECHA EN BOGOTÁ, D.C., EL 10 DE FEBRERO DE 2012.**


COLOMBIA TRUQUE VELEZ
Traductora e Interprete Oficial
Resolución No. 1614 - Minjusticia



14

REPÚBLICA DE COLOMBIA

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

LEGALIZACION

País: REPUBLICA DE COLOMBIA
(Country: - Pays:)

El presente documento público
(This public document - Le présent acte public)

Ha sido firmado por: TRUQUE VELEZ COLOMBIA
(Has been signed by: - A été signé par:)

Actuando en calidad de: TRADUCTOR OFICIAL
(Acting in the capacity of: - Agissant en qualité de:)

Lleva el sello/estampilla de: TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
(Bears the seal/stamp of: - Est revêtu du sceau de / timbre de:)

Certificado
(Certified - Attesté)

En: BOGOTA D.C
(At: - À:)

El: 2/15/2012 11:47:18 a.m.
(On: - Le:)

Por: APOSTILLA Y LEGALIZACIÓN
(By: The Ministry of Foreign Affairs of Colombia - Par: Ministère des Affaires Étrangères de la Colombie)

No: LMCP114718634
(Under Number: - Sous le numéro:)

Nombre del Titular: 87818
(Name of the holder of document: - Nom du titulaire:)

Tipo de documento: TRADUCCION APOSTILLA
(Type of document: - Type du document:)

Número de hojas: 2
(Number of pages: - Nombre de pages:)

01304100119033901080

Firmado Digitalmente por: (Digitally Signed by:)
Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia
AMPARO DE LA CRUZ TAMAYO RODRIGUEZ
Reason: DOCUMENT AUTHENTICITY
BOGOTA - COLOMBIA

La autenticidad de este documento puede ser verificada en el Registro Electrónico que se encuentra en la siguiente página
The authenticity of this document may be verified by accessing the e-Register on the following web site:
L'authenticité de cette document peut être vérifiée en accédant l'e-Registre sur le site web suivant:

www.cancilleria.gov.co/legalizaciones

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

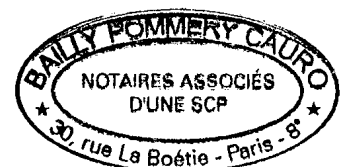
VINGT-SEPTIEME RESOLUTION

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

1 9 DEC. 2011

6. le.....

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

8. sous n° **87 818**.....

9. Sceau : **Jean D. SARTIN**.....

..... **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"

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

17

TRADUCCIÓN OFICIAL de un documento escrito en FRANCÉS, el cual para su identificación se sella con el sello de COLOMBIA TRUQUE VÉLEZ, Traductora e Intérprete Oficial según Resolución No. 1614 del Ministerio de Justicia.

SANOFI-AVENTIS

Sociedad Anónima con capital de 2.621.995.570 Euros

Sede social: 174, 174 avenue de France – 75013 PARIS

Matrícula en el Registro de Comercio y Sociedades de París: 395 030 844

ASAMBLEA GENERAL MIXTA DEL 6 DE MAYO DE 2011

EXTRACTO DEL ACTA

Resoluciones que son de la competencia de la asamblea general extraordinaria

VIGÉSIMO SEXTA DECISIÓN

Cambio de razón social y modificación correlativa de los estatutos.

La asamblea general, decidiendo en las condiciones de quórum y mayoría exigidas para las asambleas extraordinarias, después de conocer el informe del Consejo de Administración, decide cambiar la razón social de la sociedad a SANOFI a partir de la fecha y modificar en consecuencia el artículo 2º de los estatutos de la siguiente forma:

“Artículo 2º - Razón social

La razón social de la sociedad es: Sanofi.”

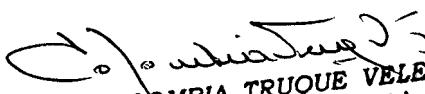
Esta decisión es adoptada de la siguiente forma:

970.406.003 votos a favor

1.407.729 votos en contra o abstenciones.

VIGÉSIMO SÉPTIMA DECISIÓN

Poderes para las formalidades.


COLOMBIA TRUQUE VELEZ
Traductora e Intérprete Oficial
Resolución No. 1614 - Minjusticia

La asamblea general, decidiendo en las condiciones de quórum y mayoría exigidas para las asambleas extraordinarias, confiere todos los poderes al portador de un original, de una copia o de un extracto del acta de sus decisiones, para efectuar cualesquiera registros (incluido cualquier registro en la secretaría competente) exigidos por la ley.

Esta decisión es adoptada de la siguiente forma:

970.704.471 votos a favor

1.109.261 votos en contra o abstenciones.

(Firma manuscrita ilegible del Señor FELITTI).

Es copia auténtica del documento original que he tenido a la vista.

(Firma manuscrita ilegible y sello del Señor ANTOINE BAILLY, Notario).

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

País: República Francesa

El presente documento público,

está firmado por el Sr. BAILLY
actuando en calidad de: Notario
y lleva el sello de: la Notaría.

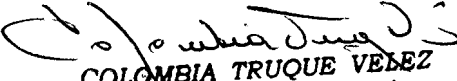
Se hace constar

en PARÍS, con fecha 19 de diciembre de 2011
por: el Procurador General del Tribunal de Apelación de París,
con el N° 87 818

Firma ilegible de JEAN MARTIN, Abogado General, y sello del Tribunal de Apelación.

Nota: "La apostilla confirma solamente la autenticidad de la firma, del sello o del timbre del documento. No significa que el contenido del documento sea correcto o que la República Francesa apruebe su contenido."

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DEL DOCUMENTO ORIGINAL,
HECHA EN BOGOTÁ, D.C., EL 10 DE FEBRERO DE 2012.


COLOMBIA TRUQUE VELEZ
Traductora e Interprete Oficial
Resolución No. 1614 - Minjusticia

(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
3 mars 2011 (03.03.2011)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/023883 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07D 519/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/551 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2010/051709

(22) Date de dépôt international :
12 août 2010 (12.08.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0904043 25 août 2009 (25.08.2009) FR
0904368 11 septembre 2009 (11.09.2009) FR

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

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
COMMERÇON, Alain [FR/FR]; c/o sanofi-aventis,
Département Brevets, 174 avenue de France, F-75013
Paris (FR). GAUZY-LAZO, Laurence [FR/FR]; c/o
sanofi-aventis, Département Brevets, 174 avenue de
France, F-75013 Paris (FR).

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

(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.

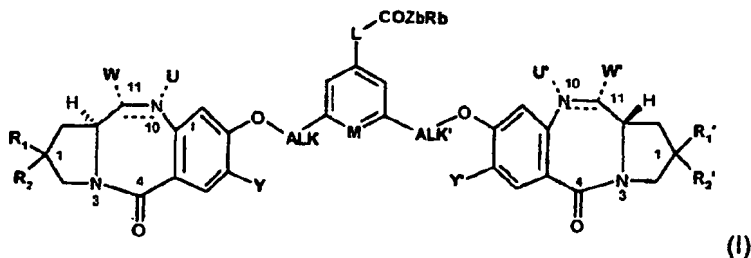
(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, 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).

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)

(54) Title : CONJUGATES OF PYRROLO[1,4]BENZODIAZEPINE DIMERS AS ANTICANCER AGENTS

(54) Titre : CONJUGUES DE DIMERES DE PYRROLO [1, 4] BENZODIAZEPINE EN TANT QU' ANTICANCEREUX



(57) Abstract : The invention relates to novel conjugates of pyrrolo[1,4]benzodiazepine dimers (I) which can be used as anticancer agents.

(57) Abrégé : L'invention est relative à de nouveaux conjugués de dimères de pyrrolo[1,4]benzodiazépine (I) qui peuvent être utilisés en tant qu'anticancéreux.

WO 2011/023883 A1

CONJUGADOS DE DÍMEROS DE PIRROLO[1,4]BENZODIAZEPINA COMO AGENTES ANTICANCEROSOS

5 La presente invención se refiere a conjugados de dímeros de la pirrolo[1,4]benzodiazepina (PBD), las composiciones que los contienen y su aplicación en terapéutica, principalmente como compuestos anticancerosos. La invención se refiere también al procedimiento de preparación de los conjugados y su aplicación como compuestos anticancerosos, así como a los propios dímeros.

10

[Área técnica]

Los dímeros de las pirrolo[1,4]benzodiazepinas son compuestos anticancerosos que actúan uniéndose de forma covalente al ADN de las células. Estos derivados han sido descritos en las solicitudes **WO 00/12508** y **WO 2005/085260** así como en las publicaciones siguientes: *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 641–654; *Tetrahedron Letters* **1988**, *29* (40), 5105-5108.

15

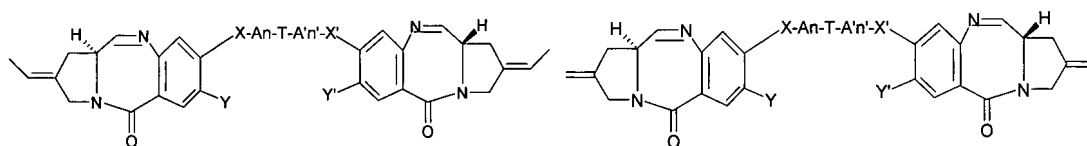
La química de los conjugados es conocida desde hace muchos años y ha sido aplicada a varias familias de citotóxicos como por ejemplo los maitansinoides (**WO 04103272**), los taxanos (**WO 06061258**), las leptomicinas (**WO 07144709**), el **CC-1065** y sus análogos (**WO 2007102069**); véase también a propósito de los conjugados, los documentos 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; Singh R. y Rickson H. K., *<Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, **2009**, 525, 445-467.

20

[Técnica anterior]

Conjugados de dímeros de la pirrolo[1,4]benzodiazepina ya han sido descritos en las solicitudes **WO 07085930** o **WO 2009/016516**. Los dímeros usados tienen más particularmente como fórmulas:

25

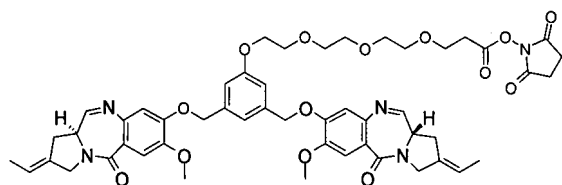


30 en las que T puede representar un grupo arilo o heteroarilo sustituido con $-G-D-(Z)_p-SZ_a$ o $-G-D-(Z)_p-C(=O)Z_bR_b$. G representa un enlace sencillo o doble o bien $-O-$, $-S-$ o $-NR-$. D representa un enlace sencillo o bien uno de los grupos siguientes: $-E-$, $-E-NR-$, $-E-NR-F-$, $-E-O-$, $-E-O-F-$, $-E-NR-CO-$, $-E-NR-CO-F-$, $-E-CO-$, $-CO-E-$, $-E-CO-F$, $-E-S-$, $-E-S-F-$, $-E-NR-CS-$, $-E-NR-CS-F-$ para los que E y F se eligen entre $-(OCH_2CH_2)_i$ alquil $(OCH_2CH_2)_j-$, $-alquil(OCH_2CH_2)_i$ alquil-, $-(OCH_2CH_2)_i-$, $-(OCH_2CH_2)_i$ cicloalquil $(OCH_2CH_2)_j-$, $-(OCH_2CH_2)_i$ heterocicilil $(OCH_2CH_2)_j-$, $-(OCH_2CH_2)_i$ aril $(OCH_2CH_2)_j-$, $-(OCH_2CH_2)_i$ heteroaril $(OCH_2CH_2)_j-$, $-alquil-(OCH_2CH_2)_i$ alquil-

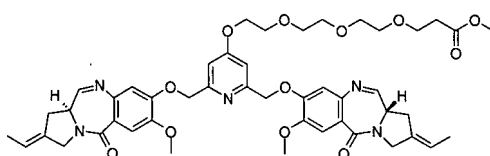
35

(OCH₂CH₂)_j-, -alquil-(OCH₂CH₂)_j-, -alquil-(OCH₂CH₂)_jcicloalquil(OCH₂CH₂)_j-, -alquil(OCH₂CH₂)_i heterociclil(OCH₂CH₂)_j-, -alquil-(OCH₂CH₂)_iaril(OCH₂CH₂)_j-, -alquil(OCH₂CH₂)_iheteroaril-(OCH₂CH₂)_j-, -cicloalquil-alquil-, -alquil-cicloalquil-, -heterociclil-alquil-, -alquil-heterociclil-, -alquil-aril-, -aril-alquil-, -alquil-heteroaril-, -heteroaril-alquil-. i y j representan números enteros que van de 0 a 2000. Z representa un grupo alquilo y p es un número entero que vale 0 ó 1.

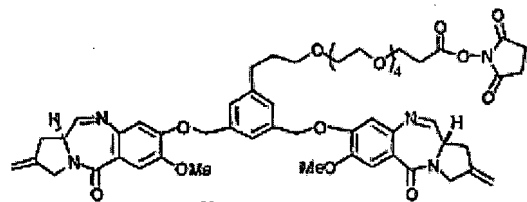
El grupo L2 = -CH₂C(=O)NR₃-(CH₂CH₂O)_i-ALK- que caracteriza algunos de los compuestos de la presente invención comprende el resto amida (-CONR₃-) y no puede corresponder en WO 07085930 o en WO 2009/016516 más que al resto -E-CONR-F- siendo E = alquil y F = - (CH₂CH₂O)_i-alquil-. Sin embargo, el grupo L1 que está unido al ciclo fenilo o piridinilo y que está unido a L2 no ha sido descrito ni sugerido en estas dos solicitudes. En efecto, no podría corresponder más que al resto G. Por lo tanto, G no puede ser más que un enlace (sencillo, doble o triple) o bien -O-, -S- o -NR-. Si se trata de los otros compuestos de la presente invención que se caracterizan por el grupo de enlace -O-ALK-NR₃-ALK-S-(CH₂CH₂O)_i-ALK-, ninguno de los restos D de WO 07085930 o de WO 2009/016516 prevén la combinación de un grupo amina NR₃ y de un enlace -S-. Los dímeros siguientes se describen en el documento WO 2009/016516:



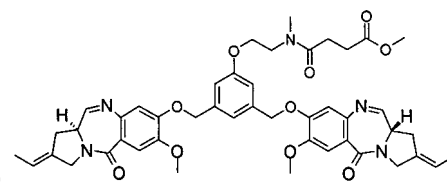
(ej. 3)



(ej. 5)



(ej. 10)



(ej. 7)

pero ninguno de estos dímeros comprende un grupo de enlace similar a los descritos en la presente invención (en particular, no incluye el resto -ALK-S-).

Por lo tanto, las dos solicitudes WO 07085930 y WO 2009/016516 no describen ni sugieren los compuestos de la presente invención.

[Problema técnico]

El problema técnico que pretende resolver la presente invención es el de proponer nuevos conjugados de dímeros de la pirrolo[1,4]benzodiazepina.

[Definiciones]

Se entiende por:

- conjugado: un agente de selección de una diana celular al que está unido de forma covalente

al menos una molécula de un compuesto citotóxico;

• agente de selección de una diana celular (o "cell binding agent" en inglés): una molécula que tiene afinidad por una diana biológica: se puede tratar por ejemplo de un ligando, una proteína, un anticuerpo, más particularmente monoclonal, un fragmento de proteína o de anticuerpo, un péptido, un oligonucleótido o un oligosacárido. El agente de selección tiene como función dirigir el compuesto biológicamente activo como un citotóxico hacia la diana biológica.

• diana biológica: un antígeno (o grupo de antígenos) localizado preferiblemente en la superficie de las células cancerosas o células estromales asociadas a este tumor; estos antígenos pueden ser por ejemplo, un receptor del factor de crecimiento, un producto de un oncogén o de un gen "supresor del tumor" mutado, una molécula relacionada con la angiogénesis, o una molécula de adhesión;

• grupo alquilo: un grupo hidrocarbonado alifático saturado obtenido quitando un átomo de hidrógeno de un alcano. El grupo alquilo puede ser lineal o ramificado. Como ejemplos, se pueden citar los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *iso*-butilo, *ter*-butilo, pentilo, 2,2-dimetilpropilo o hexilo;

• grupo cicloalquilo: un grupo alquilo cíclico que comprende entre 3 y 8 átomos de carbono implicados en la estructura cíclica. Como ejemplos, se pueden citar los grupos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo;

• grupo arilo: un grupo aromático que no contiene ningún heteroátomo, mono- o bicíclico. Se trata más particularmente de grupos fenilo y naftilo;

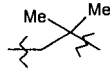
• grupo heteroarilo: un grupo aromático que comprende al menos un heteroátomo (O, S, N) implicado en el ciclo y unido a los átomos de carbono que forman el ciclo, mono- o bicíclico. Se trata más particularmente de los grupos piridinilo, pirrolilo, tienilo, furanilo, pirimidinilo o triazolilo;

• 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;

• 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 general $-C_nH_{2n}-$, obtenido quitando dos átomos de hidrógeno de un alcano. El alcano puede ser lineal o ramificado. Como ejemplos, se pueden citar los grupos metileno ($-CH_2-$), etileno ($-CH_2CH_2-$), propileno

($-CH_2CH_2CH_2-$), butileno ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$), isobutileno , hexileno ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$). Un grupo alquileno lineal puede ser más particularmente de fórmula $-(CH_2)_m-$, representando m un número entero;

• en los intervalos de valores se incluyen los extremos, (por ejemplo, un intervalo de tipo

"yendo i de 1 a 6" incluye los extremos 1 y 6.

Abreviaturas utilizadas:

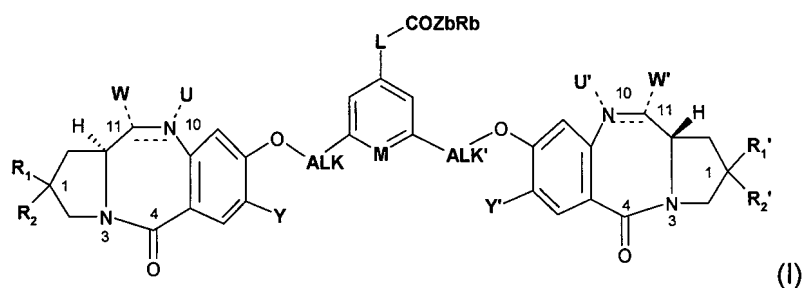
- AcOEt: acetato de etilo; ALK: grupo alquileo (C_1-C_{12}), más particularmente alquileo (C_1-C_6);
- 5 CCF: cromatografía en capa fina (TLC por sus iniciales en inglés); DAR: relación fármaco-anticuerpo, por sus iniciales en inglés: Drug Antibody Ratio; DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno; DCC: 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; ϵ :
- 10 coeficiente de extinción molar; EEDQ: 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina; EDCl: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida; EDTA: ácido etilen-diamino-tetraacético; Fmoc: fluorenilmetoxycarbonilo; GP: grupo protector; Hal: átomo de halógeno; HOBt: 1-hidroxibenzotriazol; HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico; LG: grupo saliente; NHS: N-hidroxisuccinimida; NMP: N-metilpirrolidinona; PR: presión reducida; Rf : factor
- 15 de retención; SEC: cromatografía de exclusión estérica; TA: temperatura ambiente; TBDMS: *ter*-butildimetilsililo; TEA: trietilamina; TFA: ácido trifluoroacético; TIPS: triisopropilsililo; THF: tetrahidrofurano; t_R : tiempo de retención.

[Figuras]

- 20 **Fig. 1:** espectro de masas de alta resolución del conjugado del ejemplo 1 después de desglicosilación;
- Fig. 2:** espectro de masas de alta resolución del conjugado del ejemplo 2 después de desglicosilación;
- Fig. 3:** espectro de masas de alta resolución del conjugado del ejemplo 3 después de
- 25 desglicosilación;
- Fig. 4:** espectro de masas de alta resolución del conjugado del ejemplo 4 después de desglicosilación;
- Fig. 5:** espectro de masas de alta resolución del conjugado no desglicosilado del ejemplo 6.
- 30 Estas figuras muestran para cada conjugado, después de deconvolución, la distribución de las especies que llevan de 0 a 8 dímeros de tomaimicina (D_0 : ningún dímero; D_x : x dímeros).

[Descripción de la invención]

La invención se refiere a compuestos de fórmula:



en la que:

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

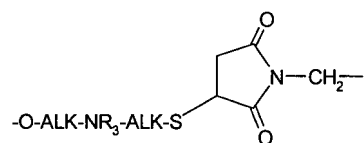
- ❖ --- representa un enlace sencillo;
- ❖ **U** y/o **U'**, idénticos o diferentes, representan independientemente el uno del otro, H;
- ❖ **W** y/o **W'**, idénticos o diferentes, representan independientemente el uno del otro, OH, -OR, -OCOR, -COOR, -OCOOR, -OCONRR', un carbamato cíclico tal que N10 y C11 estén incluidos en un ciclo, -NRCONRR', -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 estén incluidos en un ciclo, -SH, -SR, -SOR, -SOOR, -SO₃⁻, -NRSOOR', -NRR', una amina cíclica tal que N10 y C11 estén incluidos en un ciclo, -NROR', -NRCOR', -N₃, -CN, Hal, un grupo trialkilfosfonio o triarilfosfonio;

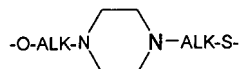
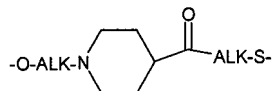
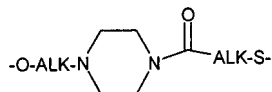
- **R₁**, **R₂**, **R₁'**, **R₂'**, idénticos o diferentes, representan independientemente uno del otro: H, Hal o un grupo alquilo (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes elegidos entre: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo, S(O)_qR siendo q = 0,1 ó 2;

o bien:

- **R₁** y **R₂** y/o **R₁'** y **R₂'** forman juntos respectivamente un enlace doble =CH₂ o =CH-CH₃;
- **Y** e **Y'**, idénticos o diferentes, representan independientemente uno del otro H u OR;
- **M** representa CH o N;
- **ALK** y **ALK'**, idénticos o diferentes, representan independientemente uno del otro un grupo alquileo (C₁-C₆);
- **R** y **R'** representan, independientemente uno del otro, H o un grupo alquilo (C₁-C₆) o arilo opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes elegidos entre: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo;
- **L** representa:
 - ❖ el grupo -L₁-L₂- en el que L₁ está unido al ciclo aromático que comprende **M** por el grupo ALK u OALK y representa uno de los grupos siguientes:

-ALK-S-





5 y L_2 representa el grupo $-CH_2C(=O)-NR_3-(CH_2CH_2O)_i-ALK-$ unido a L_1 por $-CH_2C(=O)-$ o bien:

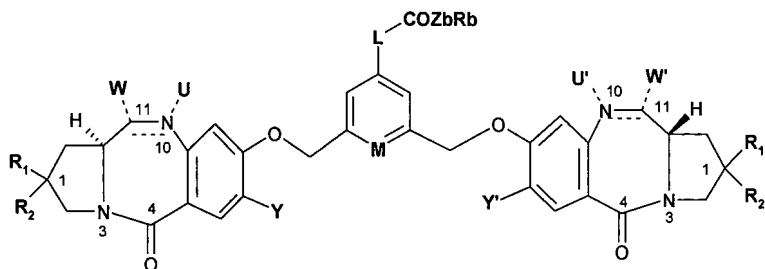
❖ el grupo $-O-ALK-NR_3-ALK-S-(CH_2CH_2O)_i-ALK-$ unido al ciclo aromático que comprende M por el grupo OALK;

- R_3 representa H o un grupo alquilo (C_1-C_6);
- i representa un número entero que va de 1 a 40, mejor de 1 a 20, preferentemente de 1 a 10;
- Z_b representa un enlace sencillo, $-O-$ o $-NH-$, representando R_b H o un grupo alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_7), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo (C_3-C_7) o bien Z_b representa un enlace sencillo y R_b representa Hal.

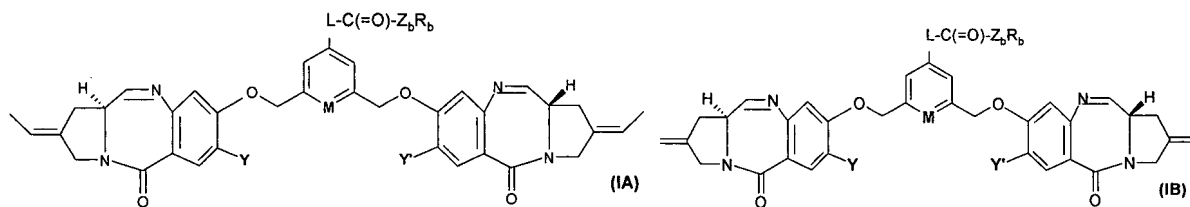
15

Los compuestos de fórmula (I), incluidos los indicados como ejemplo, pueden existir en estado de bases o de sales de adición con ácidos farmacéuticamente aceptables o también de hidratos o solvatos de estas bases o de estas sales.

20 Más particularmente, los dos grupos ALK y ALK' unidos al núcleo fenilo o piridinilo designan ambos un grupo metileno:



Más particularmente, entre los compuestos de fórmula (I) se distinguen los de fórmula (IA) o (IB):

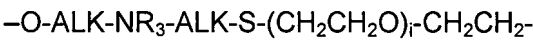
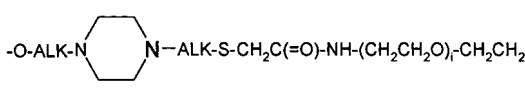
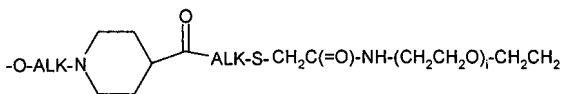
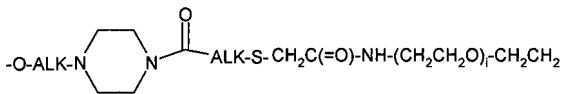
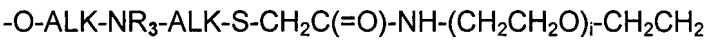
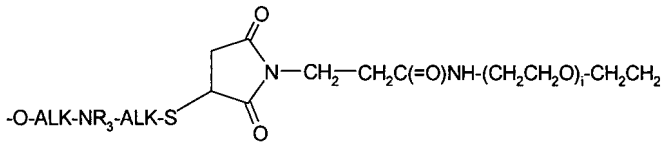
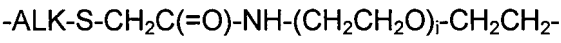


25

Y e Y' representan más particularmente un grupo alcoxi (C₁-C₄), principalmente el grupo metoxi. R y R' pueden representar más particularmente, independientemente uno del otro, H o un grupo alquilo (C₁-C₆). Según un modo particular, U = U' y/o W = W' y/o R₁ = R₁' y/o R₂ = R₂' y/o Y = Y' y/o los dos grupos ALK y ALK' unidos al núcleo fenilo o piridinilo son idénticos.

5

L se puede elegir más particularmente entre uno de los siguientes:



10

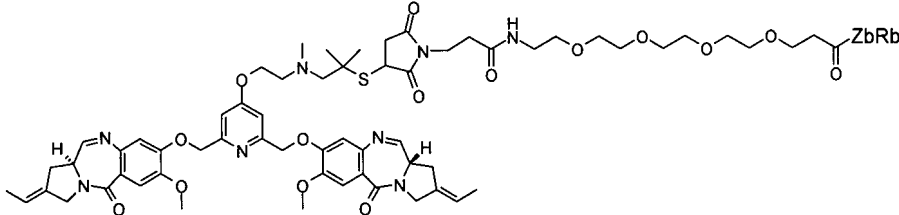
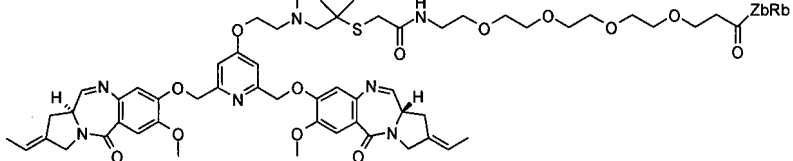
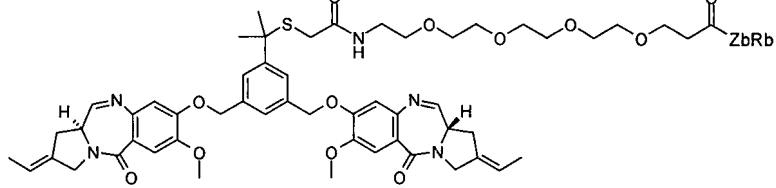
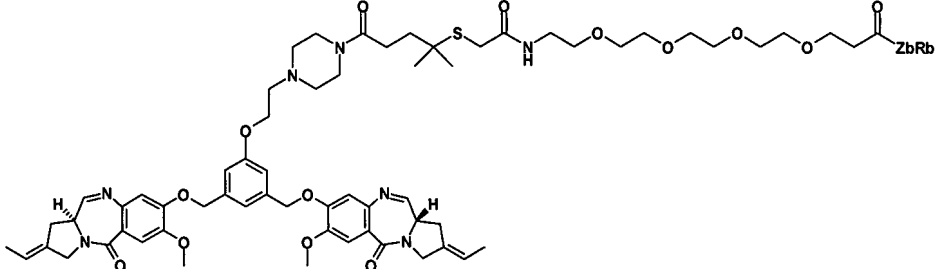
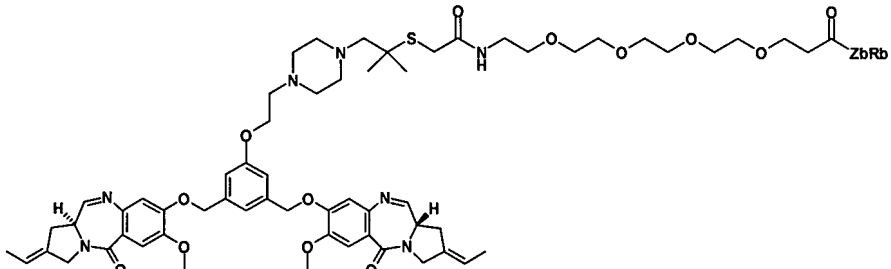
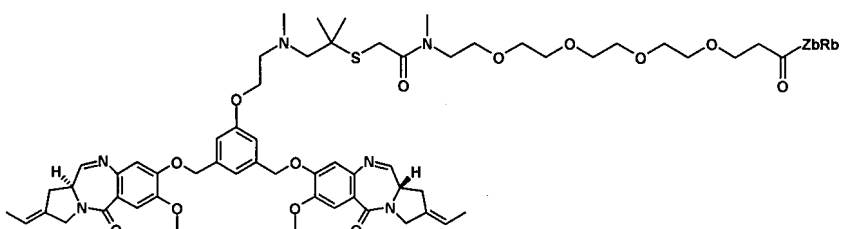
15 Entre estos, ALK representa más particularmente un grupo alquileo (C₁-C₄). En particular, ALK puede ser uno de los siguientes: -CH₂CH₂-, -CH₂CMe₂-, -CH₂CH₂CMe₂-. L también puede ser uno de los descritos en la **Tabla I** siguiente o en la **Tabla II**.

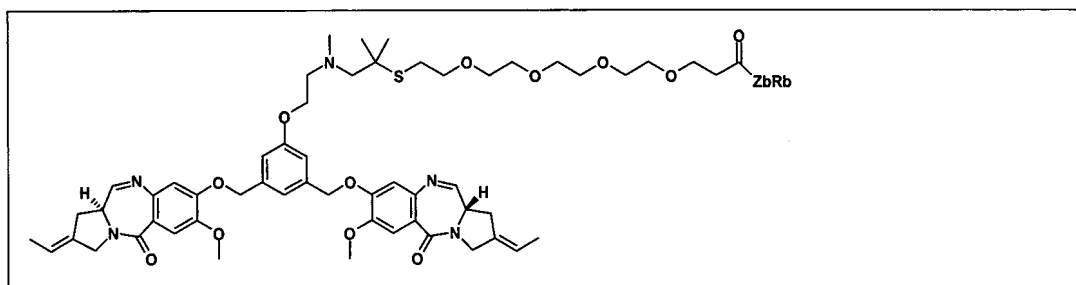
i representa un número entero que va de 1 a 40, mejor de 1 a 20, preferentemente de 1 a 10. i puede tomar cada uno de los valores que van de 1 a 40, en particular i puede valer 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10.

La **Tabla I** describe ejemplos representativos de los compuestos según la fórmula (IA). Cada compuesto de esta tabla puede existir en la forma con **M** = CH (benceno) o **M** = N (piridina). Los compuestos con **M** = N son más solubles en agua.

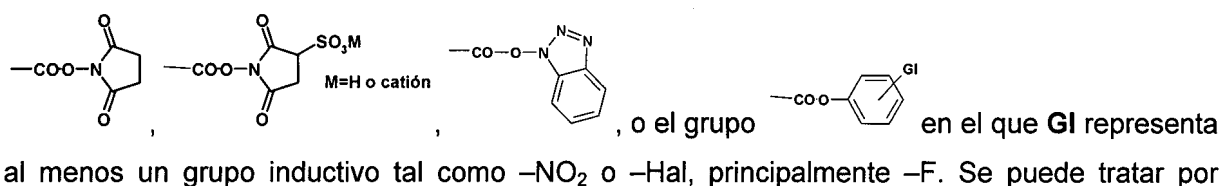
30

Tabla I

Compuesto de fórmula (Ia)









Los compuestos según la invención comprenden el grupo químico $-C(=O)Z_bR_b$ (GCR1) que es reactivo frente a un grupo químico reactivo (GCR2) presente en el agente de selección. La reacción entre GCR1 y GCR2 asegura la unión del compuesto en el agente de selección mediante la formación de un enlace covalente. Así, el compuesto es apto para ser conjugado con un agente de selección. Más particularmente, Z_b representa O; en este caso, GCR1 representa una función ácido ($R_b = H$) o éster. Más particularmente, $-C(=O)Z_bR_b$ representa $-COOH$, $-COO$ -alquilo (C_1-C_6), principalmente $-COOCH_3$, o $-COOCH_2CH=CH_2$. Entre las funciones éster, se prefieren los ésteres denominados "activos" que presentan una buena reactividad frente a los grupos GCR2, principalmente frente a los grupos amino presentes en los anticuerpos. Dos ejemplos de ésteres activados son los siguientes:



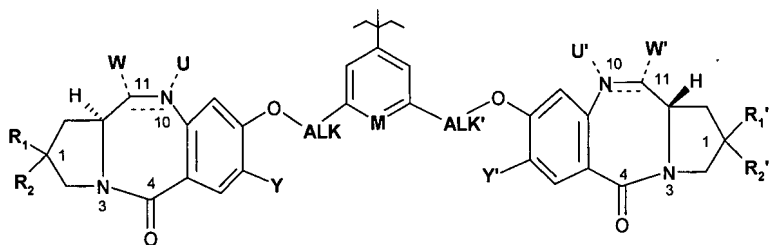
ejemplo de los grupos siguientes:

. Otro tipo de grupo $-C(=O)Z_bR_b$

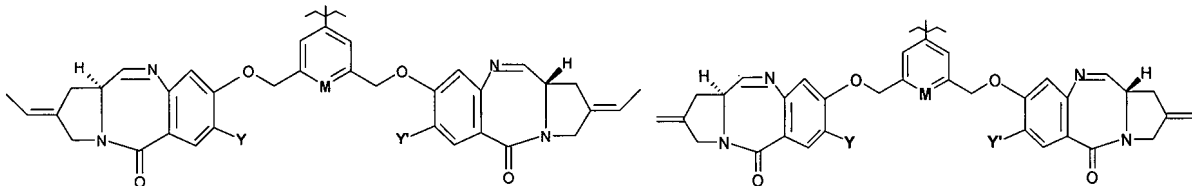
es el siguiente:

Como ejemplo de GCR2, se pueden citar los grupos ϵ -amino de las lisinas portados por las cadenas laterales de los restos de lisina que están presentes en la superficie de un anticuerpo, los grupos sacáridos de la región bisagra o los tioles de las cisteínas por reducción de los enlaces de disulfuro intra-cadenas (Garnett 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 químicas (de Graaf A. J. *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 3 de febrero de 2009 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 conocidos, en función de su estructura.

Los compuestos según la invención pueden utilizarse, por lo tanto, para la preparación de un agente de selección al que esté unido de forma covalente, en la posición para- de **M**, el dímero de fórmula:

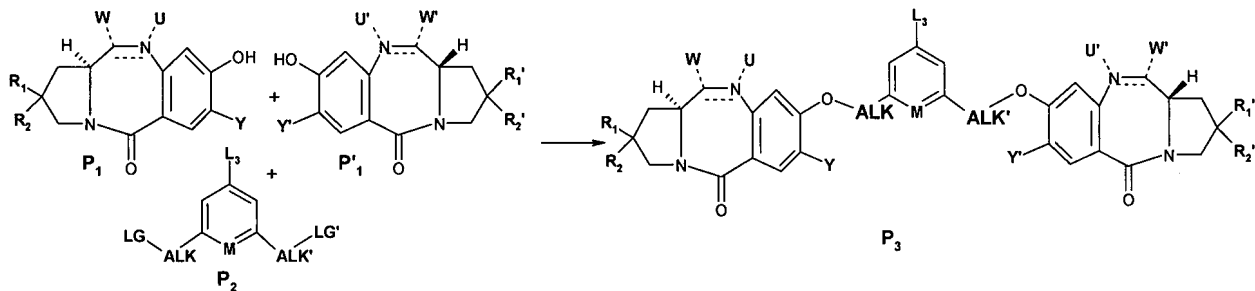


5 Más particularmente, el agente de selección es un anticuerpo. Más particularmente, el dímero tiene por fórmula:



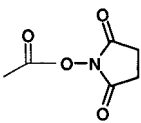
Procedimiento de preparación de compuestos de fórmula general (I)

10 Los compuestos de fórmula (I), pueden obtenerse según el **Esquema 1**:



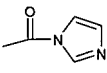
Esquema 1

Se hacen reaccionar juntos los compuestos **P₁**, **P'₁** y **P₂** para conducir a **P₃**. **LG** y **LG'** representan un grupo saliente. **L₃** puede representar el grupo $-L-C(=O)Z_bR_b$, en este caso **P₃** representa por lo tanto un compuesto de fórmula (I). En el caso en el que **P₃** no represente el grupo $-L-C(=O)Z_bR_b$, es necesario transformar **L₃** en el grupo $-L-C(=O)Z_bR_b$ mediante una o

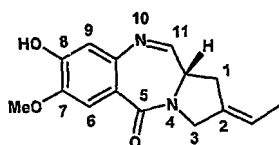


varias reacciones. En particular, en el caso en el que $-C(=O)Z_bR_b =$, se puede introducir el grupo **L₃** terminado en el grupo $-C(=O)Z_bR_b = -C(=O)O$ -alquilo (C_1-C_4)o $-C(=O)O$ -alquilo, el cual es transformado a continuación en el grupo $-C(=O)OH$, el cual reacciona finalmente con el carbonato N,N'-disuccinimidilo o con el NHS. La transformación $-COO$ alquilo/alilo en $-COOH$ se puede realizar mediante un tratamiento con litina. Es particularmente ventajoso utilizar en particular un éster metílico. La reacción con el carbonato de N,N'-disuccinimidilo se realiza en presencia de una base, por ejemplo la DIPEA; con el NHS en

presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo el DCC. Igualmente, en el caso en el que

$-\text{C}(=\text{O})\text{Z}_b\text{R}_b =$ , se puede introducir un grupo $-\text{C}(=\text{O})\text{Z}_b\text{R}_b = -\text{COOH}$ que reacciona a continuación con el N,N'-carbonildiimidazol (JACS 1958, 80, 4423; JACS 1960, 82, 4596).

- 5 Los compuestos P_1 y P'_1 se describen en las solicitudes de patente WO 00/12508, WO 00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260, WO 07085930 o WO 2009/016516 o se pueden preparar por síntesis total (Mori M. *et al.*, *Tetrahedron*, 1986, 42, 3793-3806). En el caso en el que P_1 y/o P'_1 representan la tomamicina de fórmula:



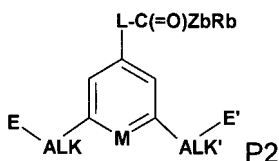
Tomamicina

- esta última puede prepararse mediante la cepa de *Streptomyces croceus* siguiendo las enseñanzas del documento FR 1516743 o bien por síntesis total (véase *J. Antibiotics* 1983, XXXVI (3), 276-282. Z.Tozuka "Studies on tomaymycin. Total syntheses of the antitumor antibiotics E- and Z- tomaymycins"). Igualmente existen compuestos comerciales P_1/P'_1 . Para la introducción de los grupos WW', la función imina ($\text{---} =$ = enlace doble) es susceptible de añadir varios compuestos HW/HW' (por ejemplo H_2O o alcohol ROH).

15

A propósito de los compuestos de fórmula P_2

Estos tienen como fórmula:



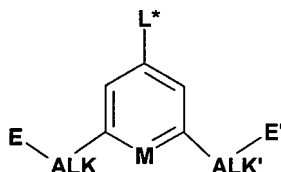
en la que:

- 20
- L, M, ALK, ALK', Z_b y R_b son tales como se han definido anteriormente;
 - E y E' representan, independientemente uno del otro, un grupo $-\text{OH}$ o un grupo saliente.

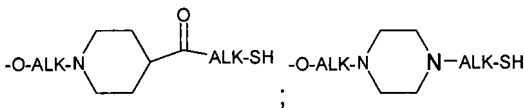
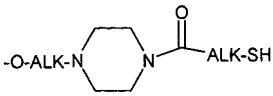
L puede representar más particularmente uno de los descritos en los esquemas 2, 2', 3, 3', 3'', 4, 5, 5', 6, 6', 6'' y 7.

25

Así se distinguen los intermediarios de fórmula:

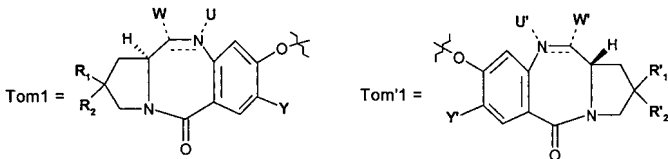


en la que L* se elige entre: -ALK-SH; -O-ALK-NR₃-ALK-SH;

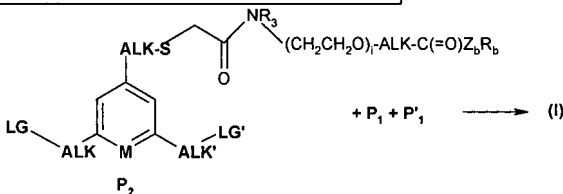


En esta invención, se denomina "grupo saliente" un átomo o un grupo de átomos que, en la reacción heterolítica entre P₂ y P₁ o P'₁, sale llevándose el par de electrones del enlace covalente que une ALK y LG o LG'. El grupo saliente se elige más particularmente entre un átomo de halógeno, principalmente cloro o bromo, un grupo mesilato, tosilato, nosilato o -OPPh₃⁺.

Para los otros esquemas siguientes, se usan las abreviaturas siguientes para simplificar:



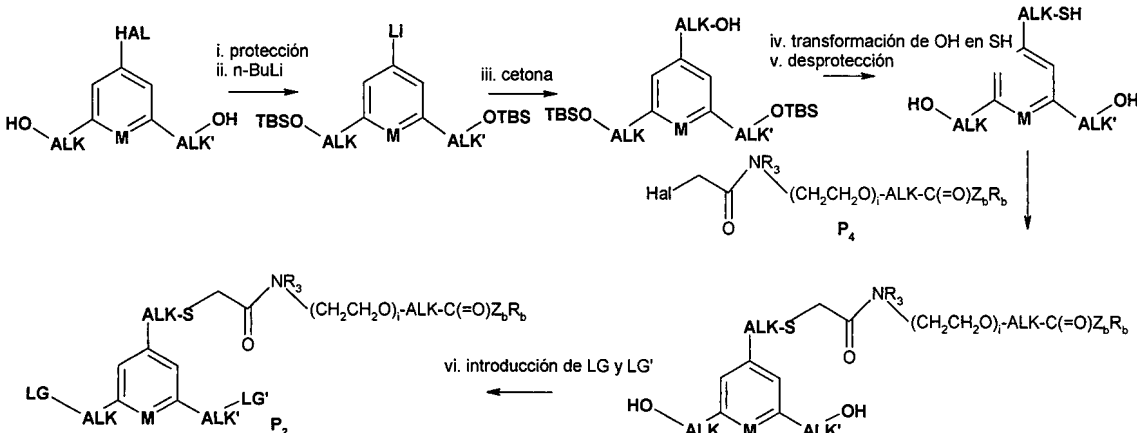
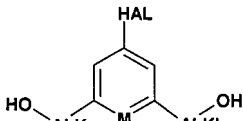
L₁ = -ALK-S- y L₂ = -CH₂C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)_i-ALK-



Esquema 2

Preparación de P₂

P₂ se obtiene a partir del diol halogenado que corresponde a la fórmula según las enseñanzas del ejemplo 3 (Esquema 2'):



Esquema 2'

- i. protección de dos funciones alcohol mediante un grupo protector, tal como por ejemplo el ter-butil-dimetil-sililoxi (TBS);
- ii. preparación del compuesto organolítico u organomagnesiano correspondiente mediante n-BuLi o magnesio respectivamente;
- 5 iii. adición nucleofílica sobre una cetona para formar una función alcohol;
- iv. preparación del tiol mediante la formación del tioacetato correspondiente (véanse los ejemplos 3.7 y 3.8);
- v. desprotección;
- vi. introducción de **LG** y **LG'**. En el caso de un grupo mesilato, se usa el cloruro de metanosulfonilo en presencia de una base, tal como una amina terciaria (por ejemplo, TEA o DIPEA) ; véase el ejemplo 1.4.
- 10

Un ejemplo de diol halogenado y de diol protegido correspondiente es el descrito en el esquema 1 en la página 48 del documento **WO 2009/016516** (compuestos 2 y 3 del esquema 1). Dos ejemplos de dioles protegidos son los de N° CAS 181225-40-1 y 181225-41-2.

15

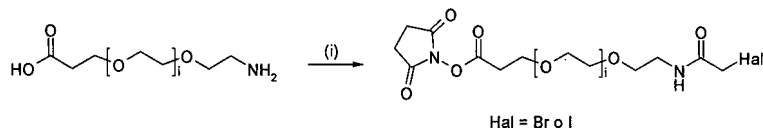
El diol halogenado puede obtenerse por reducción del compuesto diácido o diéster correspondiente, por ejemplo el de N° CAS 193010-40-1. Véase igualmente en el caso de una piridina (M = N): *Liebigs Annalen der Chemie* **1991**, 10, 987-988 o *Tetrahedron* **2005**, 61 (7), 1755-1763 (compuesto 3 del Esquema 1).

20

Preparación de P₄

Caso en que $ALK = CH_2CH_2$

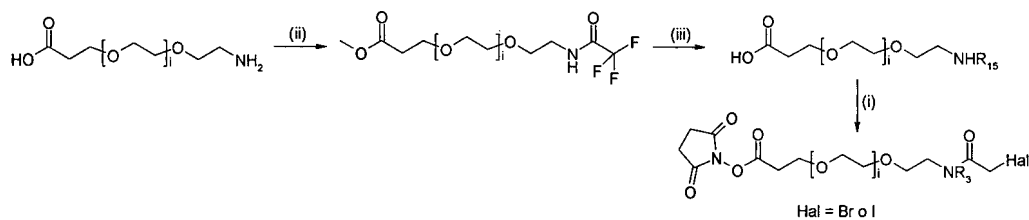
Caso en que $R_3 = H$



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.

25

30 caso en el que $R_3 \neq H$



Etapas (ii): protección del ácido carboxílico en forma de éster metílico y de la amina en forma de

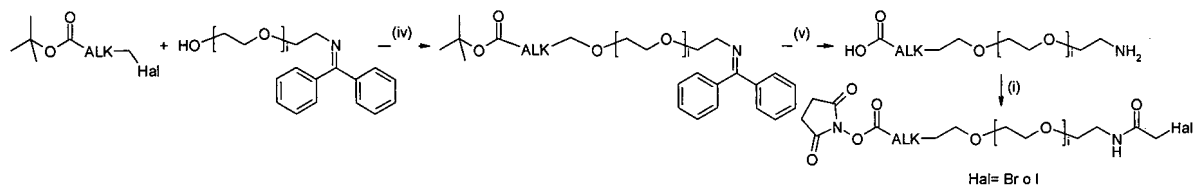
trifluoroacetamida; la reacción se lleva a cabo en dos etapas sucesivas en un disolvente polar aprótico como el DCM: protección del ácido por tratamiento con trimetilsilildiazometano en presencia de metanol y después protección de la amina por adición de anhídrido trifluoroacético y de una base como la TEA.

- 5 Etapa (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;

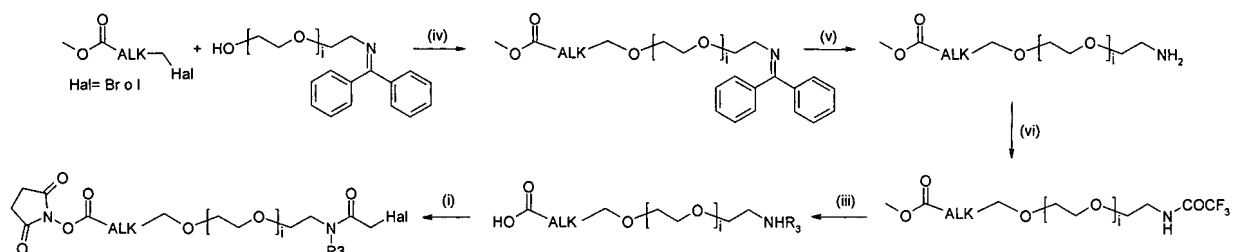
Etapa (i): a continuación de la etapa (iii), se repiten las reacciones de la etapa (i) para el caso $R_{12} = H$.

Caso en que $ALK \neq CH_2CH_2$

Caso en que $R_3 = H$



caso en el que $R_3 \neq H$

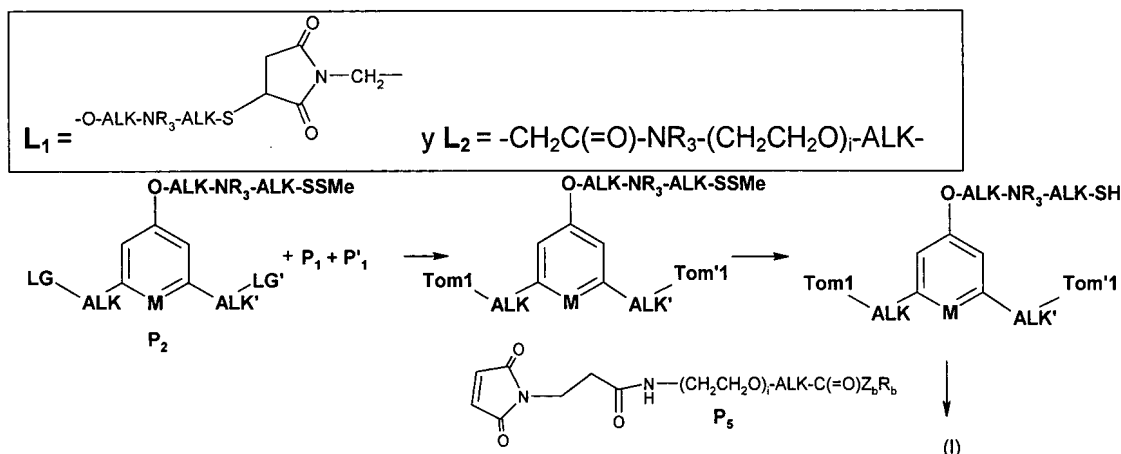


Etapa (iv): elongación de la cadena de PEG; la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF o la DMF por tratamiento de un éster halogenado con el alcoholato de un benzofenona-imina-PEG-alcohol generado por la acción de NaH o de naftalenuro de potasio como se describe en el documento **WO 2007/127440**;

Etapa (v): escisión selectiva de la imina por hidrogenación en presencia de paladio sobre carbón véase Wessjohann, L. *et al.*, *Synthesis* **1989**, 5, 359-63;

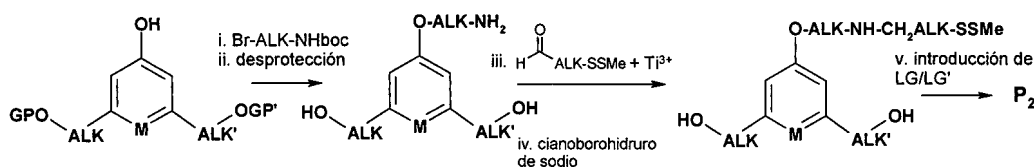
Etapa (vi): protección de la amina por adición de anhídrido trifluoroacético y de una base como la TEA.

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 .



Esquema 3

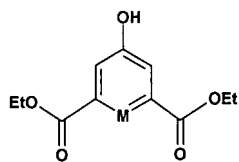
Preparación de P₂



Esquema 3'

i. reacción nucleófila entre una de las funciones –OH (estando las otras dos protegidas por GP y GP' que designan grupos protectores) y una bromo-amina protegida con Boc de fórmula Br-ALK-NHBoc en presencia de una base, tal como por ejemplo el K₂CO₃, en un disolvente polar, tal como la DMF, el THF o el MeCN (véase, por ejemplo, las condiciones en la página 63 del documento **WO 07085930**).

Según una variante, se puede realizar la sustitución nucleofílica de la bromo-amina con el



hidroxi-diéster de fórmula: $\text{EtO-C(=O)-C}_6\text{H}_3\text{(OH)-C(=O)-OEt}$ y después reducir a continuación la función éster en función –CH₂OH, por ejemplo con borohidruro de sodio; para ello se pueden aplicar las condiciones de la sustitución nucleófila y de la reducción mostradas en las páginas 62-63 del documento **WO 2007/085930**;

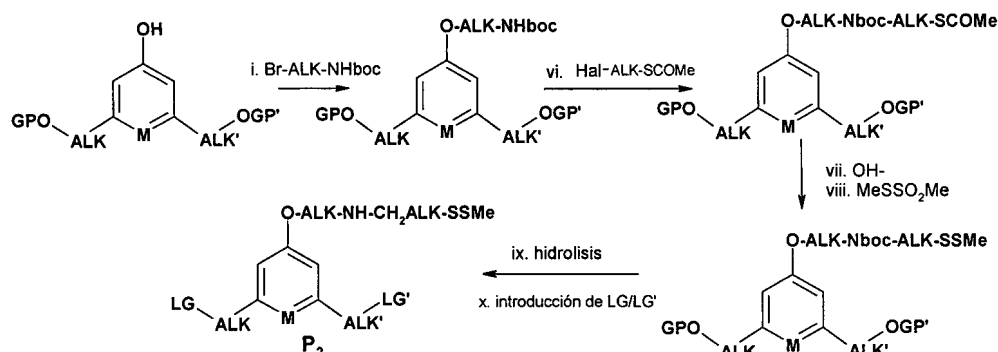
ii. desprotección de los grupos protectores;

iii. aminación reductora con el aldehído de fórmula HC(=O)-ALK-SSMe en presencia de isopropóxido de titanio; la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar aprótico anhidro como el THF;

iv. se forma un complejo intermedio que se reduce *in situ* con un agente reductor como por ejemplo el cianoborohidruro de sodio;

vi. introducción de LG y LG'. En el caso de un grupo mesilato, se usa el cloruro de metanosulfonilo en presencia de una base, tal como una amina terciaria (por ejemplo, TEA); véase el ejemplo 1.4.

- 5 Una variante representada en el **Esquema 3''** consiste en introducir el grupo -ALK-SSMe sobre el grupo NHboc, inspirándose en particular en el método descrito por Kitagawa T. *et al.*; *JACS*, **2006**, 128 (45), 14448-14449 usado para introducir cadenas de acetiltioalquilo en una amina secundaria:



Esquema 3''

Según esta variante se realiza la alquilación mediante un intermedio Hal-ALK-SCOMe (Hal = I, por ejemplo) y a continuación se libera el tiol mediante un tratamiento en medio básico:

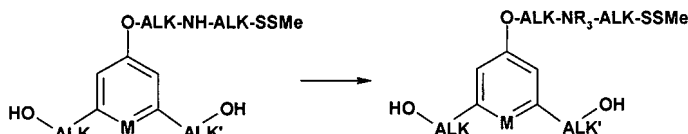
vi. alquilación con un halogenuro de alquilo portador de un grupo tioacetilo en presencia de carbonato de cesio en un disolvente aprótico polar como la DMF;

vii. escisión selectiva del grupo acetilo en medio básico débil;

viii. formación del grupo -SSMe por reacción del tiol intermedio con MeSSO₂Me;

ix. escisión de los grupos protectores GP y GP';

x. transformación de los grupos hidroxilos en grupos nucleófugos LG/LG', preferentemente grupos mesilatos.



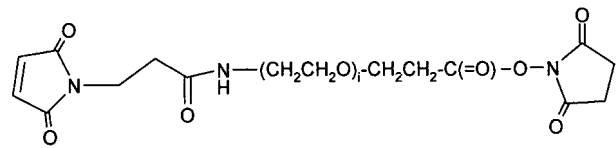
Esquema 3'''

La introducción de un grupo R₃ = alquilo (C₁-C₄) en un grupo NH es posible en diferentes etapas de la síntesis (un ejemplo se muestra en el **Esquema 3'''**). Se realiza por ejemplo empleando la reacción de Wallach que usa un aldehído (véase el ejemplo 1.5 en el que la alquilación NH ⇨ NMe utiliza el formaldehído).

A propósito de P₅

Las sociedades Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL. 61105, Estados Unidos, Jenkem Technology USA Inc., 2033, W. Mc Dermott Dr., Allen Tx 75013-4675, Estados Unidos y Quanta

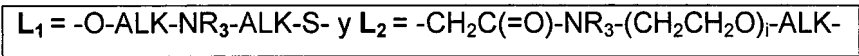
BioDesign, Ltd.195, West Olentangy Street, Suite O, Powell, Ohio 43065-8720, Estados Unidos, comercializan compuestos de fórmula general



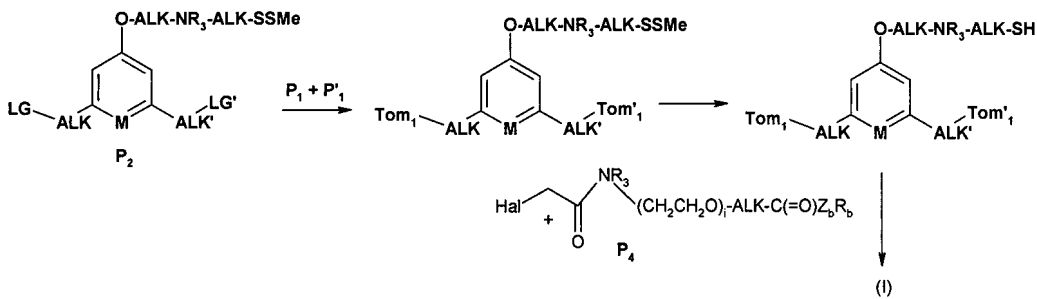
denominados NHS-PEG-maleimida. Se puede tratar, más particularmente, del compuesto de N° CAS 756525-99-2.

5

La adición del tiol sobre el resto maleimida se describe en la página 721 de "*Bioconjugate Techniques*", Greg T. Hermanson, 2ª Ed, Elsevier Inc. (ISBN-13: 978-0-12-370501-3; ISBN-10: 0-12-370501-0).



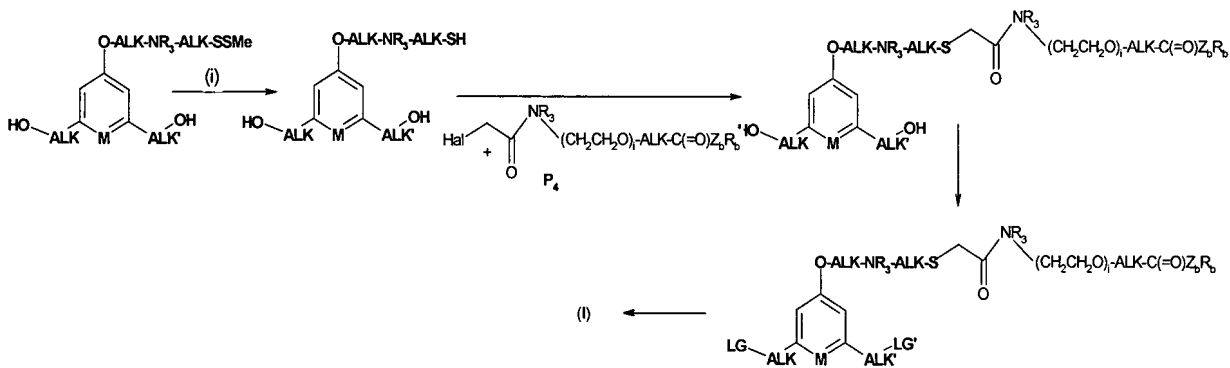
10



Esquema 4

La preparación es similar a la descrita en el **Esquema 3** reemplazando **P₅** por **P₄**.
Una variante descrita en el **Esquema 4'** corresponde a una preparación parecida a la descrita en los **Esquemas 2 y 2'**:

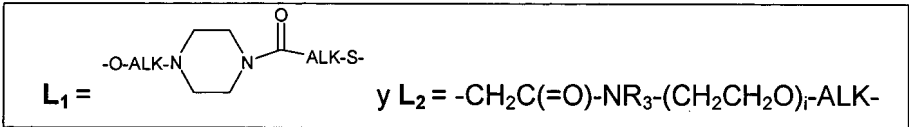
15

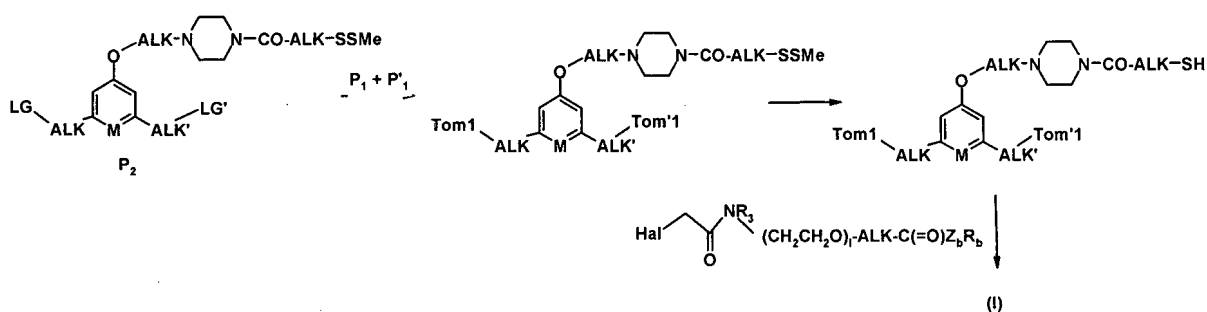


Esquema 4'

i. desprotección por reducción del disulfuro.

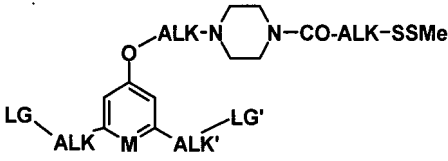
20

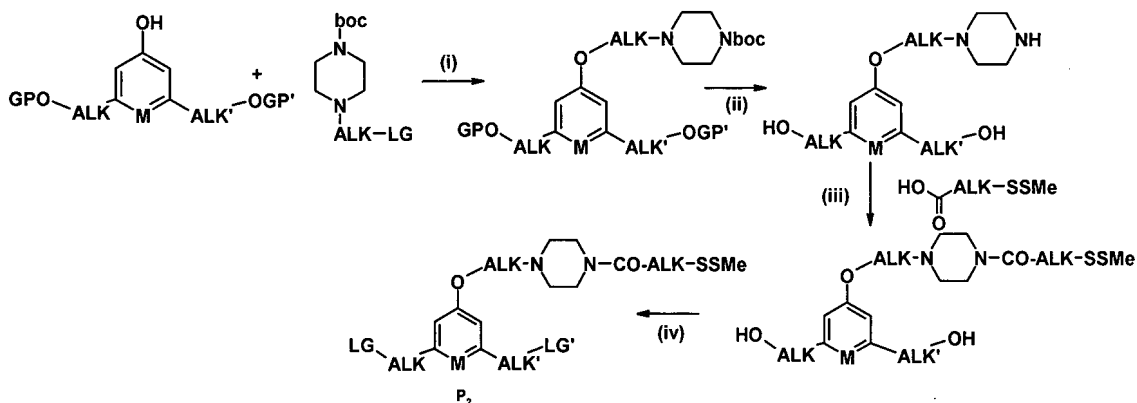




Esquema 5

Preparación de P₂

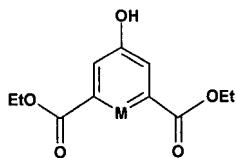
- 5 Se usa el compuesto P₂ de fórmula:  que se obtiene según el Esquema 5' siguiente:

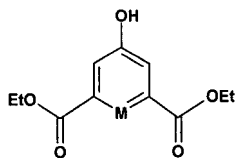


Esquema 5'

- i. alquilación del hidróxido del ciclo aromático con una piperazina mono-protégida en posición 1- y portadora en 4- de una cadena de alquilo funcionalizada en posición terminal con el grupo LG nucleófilo. Preferentemente, el grupo nucleófilo es un grupo mesilato y se realiza la reacción de Williamson en presencia de un hidruro en un disolvente polar aprótico anhidro, como el THF o la DMF;
- 10
- ii. desprotección de los grupos Boc, GP y GP', preferentemente en medio ácido, por ejemplo en presencia de ácido clorhídrico o de TFA cuando los grupos GP y GP' son TBDMS.
- 15

Según una variante de las etapas i y ii, se puede realizar la sustitución nucleofílica de la bromo-



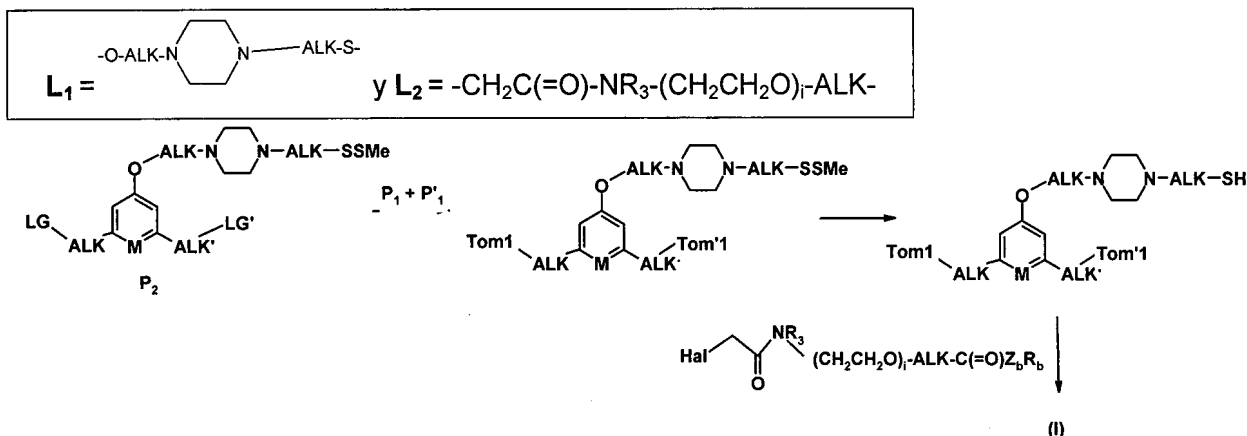
amina con el hidrox-diéster de fórmula:  y después reducir a continuación la función éster a función -CH₂OH, por ejemplo con borohidruro de sodio; para ello se pueden

aplicar las condiciones de la sustitución nucleófila y de la reducción mostradas en las páginas 62-63 del documento **WO 2007/085930**;

iii. acoplamiento realizado después de la activación inicial del ácido en éster de NHS;

iv. introducción de los grupos salientes **LG** y **LG'**. En el caso de un grupo mesilato, se usa el

5 cloruro de metanosulfonilo en presencia de una base, tal como una amina terciaria (por ejemplo, TEA);

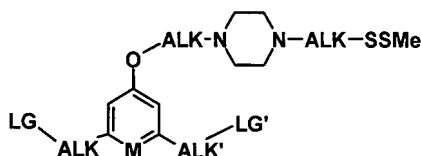


Esquema 6

10

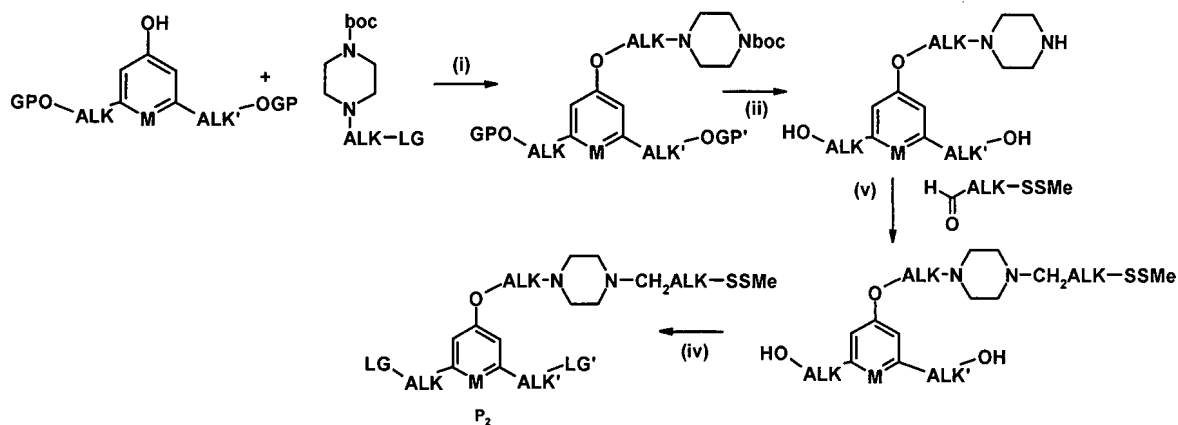
Preparación de P_2

Se usa el compuesto P_2 de fórmula:



que se obtiene por

aminación reductora según el **Esquema 6'** siguiente.



Esquema 6'

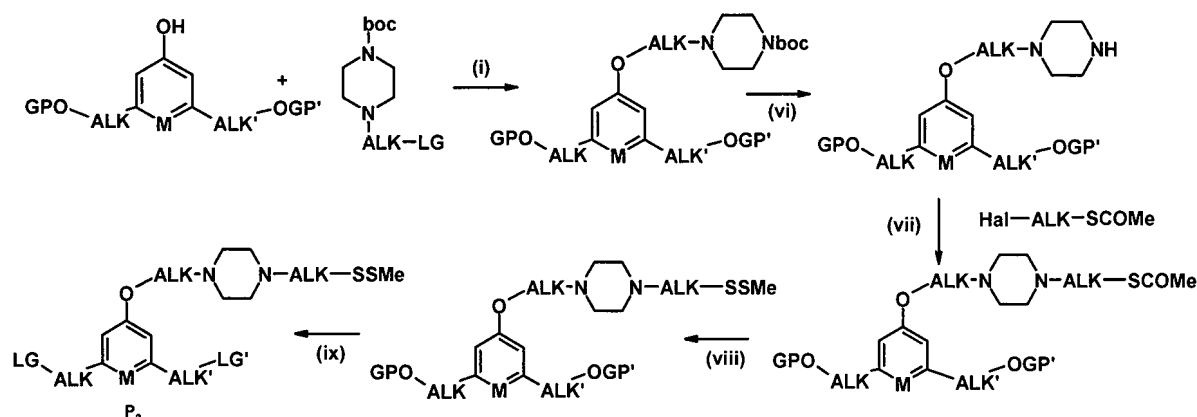
15

v. introducción del grupo -ALK-SSMe por aminación reductora realizada por ejemplo en presencia de cianoborohidruro de isopropóxido de titanio;

Una variante similar a la representada en el **Esquema 3''** y que usa el método de alquilación descrito por Kitagawa T. *et al.*, *JACS*, **2006**, 128 (45), 14448-14449 se muestra en el **Esquema**

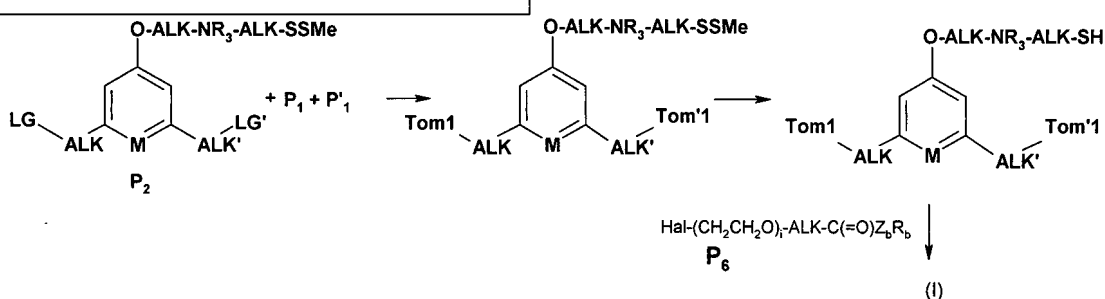
20

6'':



Esquema 6''

- i. alquilación con piperazina mono-protegida (véase la etapa i. del **Esquema 5'**);
- 5 vi. desprotección selectiva del grupo Boc en medio ácido;
- vii. alquilación con un halogenuro de alquilo portador de un grupo tioacetilo en presencia de carbonato de cesio en un disolvente aprótico polar como la DMF;
- viii. escisión selectiva del grupo acetilo en medio básico débil y formación del grupo -SSMe por reacción del tiol intermedio con MeSSO₂Me en presencia de una base tal como la TEA;
- 10 ix. escisión de los grupos protectores GP y GP' y transformación de los grupos hidroxilo preferentemente en mesilatos con cloruro de metanosulfonilo.



Esquema 7

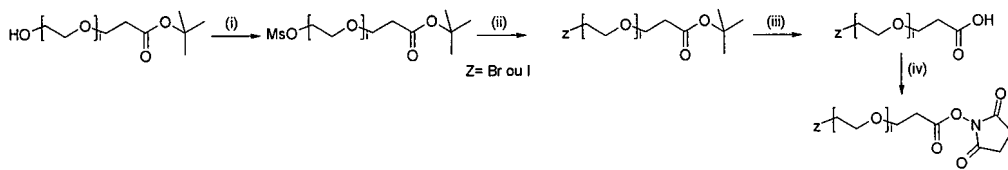
- 15 Este esquema se inspira en el **Esquema 3** anterior. El compuesto **P₆** puede ser por ejemplo el compuesto de N° CAS 564476-32-0 que se prepara según el documento **WO 03068144** (véase el compuesto 10a de la figura 7) o bien el compuesto de N° CAS 309916-91-4. Se pueden preparar compuestos análogos con longitudes de cadena i diferentes según el mismo principio de la figura 7 del documento **WO 03068144** a partir del compuesto PEG correspondiente.

20

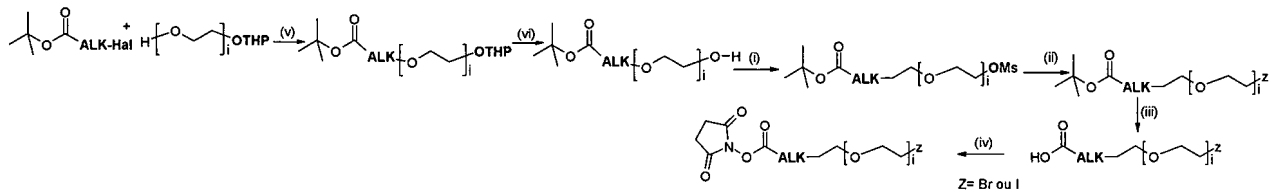
A propósito de **P₆**

$RbZb-CO-ALK-(OCH_2CH_2)_i-Br$ ou I se puede preparar según los esquemas siguientes:

Caso en que $ALK = CH_2CH_2$



Caso en que $ALK \neq CH_2CH_2$



Etapa (i): activación del alcohol en 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.

Etapa (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.

Etapa (iii): desprotección por medio de una disolución de ácido clorhídrico (por ejemplo, disolución en dioxano) o de ácido trifluoroacético.

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

Etapa (v): 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 en 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.

Etapa (vi): desprotección por medio de una disolución de ácido clorhídrico 0,1N (por ejemplo, solución en dioxano) o de etanol.

Los expertos en la técnica podrán inspirarse en las condiciones de operación descritas a continuación.

Procedimiento de preparación del conjugado

El conjugado se obtiene por el procedimiento que consiste en:

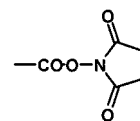
(i) poner en contacto y dejar reaccionar una disolución acuosa del agente de selección opcionalmente tamponada y una disolución de un compuesto de la fórmula (I);

(ii) después separar opcionalmente el conjugado formado en la etapa (i) del compuesto de fórmula (I) y/o del agente de selección que no haya reaccionado y/o de los agregados que se hayan formado.

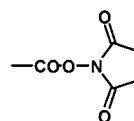
Según una variante, se separa en la etapa (ii) el conjugado que se ha formado en la etapa (i) del agente de selección que no haya reaccionado y de los agregados eventualmente presentes en la disolución. Según otra variante, no se separa en la etapa (ii) el conjugado de la etapa (i) del compuesto de fórmula (I) que no haya reaccionado ni de los agregados que se hayan formado y se deja en la disolución el agente de selección que eventualmente no haya reaccionado.

El compuesto de fórmula (I) comprende preferentemente una función activada, $-C(=O)Z_bR_b$, reactiva frente a los grupos GCR2, principalmente frente a los grupos amino presentes en los anticuerpos. Un grupo químico poco reactivo o insuficientemente reactivo se puede transformar

por los expertos en la técnica; por ejemplo, $-COOH + N$ -hidroxisuccinimida $\rightarrow$



o bien



$-COO$ -alquilo (C_1-C_6) $\rightarrow -COOH \rightarrow -COOH + N$ -hidroxisuccinimida $\rightarrow$

Un ejemplo del procedimiento aplicable en el caso de un anticuerpo y de un compuesto de fórmula (I) es el que se da en el ejemplo 1.

La disolución acuosa del agente de selección puede estar tamponada mediante, por ejemplo, tampones tales como por ejemplo el fosfato de potasio o el ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (tampón HEPES). El tampón depende de la naturaleza del agente de selección. El compuesto de fórmula (I) 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 horas. La reacción entre el agente de selección y el compuesto de fórmula (I) puede ser seguida por SEC con un detector refractométrico y/o ultravioleta con el fin de determinar el avance. Si la tasa de sustitución es insuficiente, se puede dejar reaccionar durante un tiempo más largo y/o añadir más compuesto de fórmula (I). Se puede referir al método general dado en la parte de los ejemplos para más detalles sobre las condiciones particulares que se pueden usar para la conjugación.

Los expertos en la técnica disponen de diferentes métodos cromatográficos para la separación de la etapa (ii): el conjugado se puede purificar 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.

Se entienden por "agregados" las asociaciones que se pueden formar entre dos agentes de selección o más, habiendo sido o no modificados los agentes de selección 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 en la disolución, 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 por medio de técnicas conocidas tales como la SEC (véase a este propósito, *Analytical Biochemistry* **1993**, 212 (2), 469-480).

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

Anticuerpos

El anticuerpo (véase a este propósito, Janeway et al., "Immunobiology", 5ª edición, 2001, Garland Publishing, Nueva York) se podrá elegir entre los descritos especialmente en los documentos **WO 04043344**, **WO 08010101**, **WO 08047242** o **WO 05009369** (anti CA6). 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 híbrido.

Conjugado

Un conjugado comprende generalmente del orden de 1 a 10 dímero(s) de pirrolo[1,4]benzodiazepina unido(s) al agente de selección (se trata de tasas de inserción o DAR por sus iniciales en inglés: drug-to-antibody ratio). Este número varía en función de la naturaleza del agente de selección y del dímero, así como de las condiciones de operación utilizadas para la conjugación (por ejemplo, el número de equivalentes de dímero con respecto al agente de selección, el tiempo de reacción y la naturaleza del disolvente y del eventual codisolvente). La puesta en contacto del agente de selección y del dímero lleva a una mezcla que comprende: varios conjugados que se distinguen individualmente unos de otros por diferentes DAR; eventualmente, el agente de selección que no haya reaccionado (en el caso de una reacción incompleta); eventualmente los agregados. La DAR que se determina en la disolución final por

ejemplo por espectroscopía UV corresponde por lo tanto a una DAR media.

En el caso en que el agente de selección 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.

- 5 Dimitrov (ed), LLC, 2009, "*Therapeutic Antibodies and Protocols*", vol. 525, 445, Springer Science. Consiste en medir la absorbancia de una disolución de conjugado después de la etapa de separación (ii) a dos longitudes de onda denominadas LO1 y LO2. Se utilizan los coeficientes de extinción molares siguientes del anticuerpo desnudo y del dímero de pirrolo[1,4]benzodiazepina medidos previamente a la conjugación.

10

Las absorbancias de la disolución de conjugado a LO1 y LO2, (A_{LO1}) y (A_{LO2}) se miden sobre el pico correspondiente del espectro SEC (lo que permite calcular una "DAR(SEC)") o utilizando un espectrofotómetro UV clásico (lo que permite calcular una "DAR(UV)"). Las absorbancias se pueden expresar con la forma:

15
$$A_{LO1} = (c_D \times e_{D LO1}) + (c_A \times e_{A LO1})$$

$$A_{LO2} = (c_D \times e_{D LO2}) + (c_A \times e_{A LO2})$$

ecuaciones para las que:

- c_D y c_A indican respectivamente las concentraciones en la disolución de la parte del conjugado relativa al derivado de la pirrolo[1,4]benzodiazepina y de la parte del conjugado relativa al anticuerpo;
- $e_{D LO1}$ y $e_{D LO2}$ indican respectivamente los coeficientes de absorción molares del dímero de la pirrolo[1,4]benzodiazepina antes de la conjugación a las longitudes de onda LO1 y LO2 ;
- $e_{A LO1}$ y $e_{A LO2}$ indican respectivamente los coeficientes de absorción molares del anticuerpo desnudo a las dos longitudes de onda LO1 y LO2.

25

Se entiende por anticuerpo desnudo, el anticuerpo al que no está unido ningún dímero de pirrolo[1,4]benzodiazepina, es decir el anticuerpo antes de la etapa de conjugación.

30 La resolución de estas dos ecuaciones lleva a:

$$c_D = [(e_{A LO1} \times A_{LO2}) - (e_{A LO2} \times A_{LO1})] / [(e_{D LO2} \times e_{A LO1}) - (e_{A LO2} \times e_{D LO1})]$$

$$c_A = [A_{LO1} - (c_D \times e_{D LO1})] / e_{A LO1}$$

La DAR media corresponde entonces a c_D/c_A . En el caso de dímeros de la pirrolo[1,4]benzodiazepina, se consideran las dos longitudes de onda: LO1= 280 nm y LO2= 320 nm. La DAR media, medida en el espectro de SEC, está comprendida preferentemente entre 1 y 10, preferentemente 1,5 y 7.

35

El conjugado se puede utilizar como compuesto anticanceroso. Por la presencia del agente de selección, el conjugado se vuelve muy selectivo frente a las células tumorales en vez de las células sanas. Esto permite dirigir el compuesto de fórmula (I) que tiene una actividad anticancerosa 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.

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

[Ejemplos]

Los desplazamientos químicos (δ en ppm) se expresan en ppm.

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

Los espectros se han obtenido con un dispositivo Waters UPLC-SQD en modo de electropulverización positiva y/o negativa (ES+/-). Condiciones cromatográficas: columna: ACQUITY BEH C18 1,7 μ m, 2,1 x 50 mm; disolventes: A: H₂O (ácido fórmico al 0,1%). B: CH₃CN (ácido fórmico al 0,1%) temperatura de la columna: 50°C ; caudal: 1 mL/min; Gradiente (2 min): de 5% a 50% de B en 0,8 min; 1,2 min: 100% de B; 1,85 min: 100% de B; 1,95: 5% de B.

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

Los espectros se han obtenido con un dispositivo Waters ZQ en modo de electropulverización positiva y/o negativa (ES+/-). Condiciones cromatográficas: columna: XBridge C18 2,5 μ m 3 x 50 mm; disolventes: A: H₂O (ácido fórmico al 0,1%). B: CH₃CN (ácido fórmico al 0,1%; temperatura de la columna: 70°C; caudal: 0,9 mL/min ; gradiente (7 min): de 5% a 100 % de B en 5,3 min; 5,5 min: 100% de B; 6,3 min: 5% de B.

Método C: Espectrometría de masas (MS)

Los espectros han sido realizados por ionización química (gas reactivo: amoníaco) en un aparato WATERS GCTof (introducción directa sin LC).

Método D: Cromatografía de líquidos de alta presión – Espectrometría de masas (LCMS)

Los espectros se han obtenido con un dispositivo Waters UPLC-SQD en modo de electropulverización positiva y/o negativa (ES+/-). Condiciones cromatográficas: columna:

ACQUITY BEH C18 1,7 μm , 2,1 x 50 mm; disolventes: A: H_2O (ácido fórmico al 0,1%). B: CH_3CN (ácido fórmico al 0,1%) temperatura de la columna: 70°C; caudal: 1 mL/min; Gradiente (2 min): de 5% a 50% de B en 1 min; 1,3 min: 100% de B; 1,45 min: 100% de B; 1,75: 5% de B.

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

Los espectros se han obtenido con un dispositivo Waters UPLC-SQD en modo de ionización: electropulverización en modo positivo y/o negativo (ES+/-) Condiciones cromatográficas: columna: ACQUITY BEH C18 1,7 μm , 2,1 x 50 mm; disolventes: A: H_2O (ácido fórmico al 0,1%). B: CH_3CN (ácido fórmico al 0,1%) temperatura de la columna: 70°C; caudal: 1 mL/min; gradiente (4 min): de 5% a 100% de B en 3,15 min; 3,75: 5% de B.

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

Los espectros se han obtenido con un dispositivo Waters UPLC-SQD en modo de de ionización por electropulverización positiva y/o negativa (ES+/-). Condiciones cromatográficas: columna: ACQUITY BEH C18 1,7 μm , 2,1 x 50 mm; disolventes: A: H_2O (ácido fórmico al 0,1%). B: CH_3CN (ácido fórmico al 0,1%) temperatura de la columna: 45°C; caudal: 0,6 mL/min; Gradiente (2 min): 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.

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

20 La desglicosilación es una técnica de digestión enzimática por medio de glicosidasa. Se hace a partir de 500 μL de conjugado + 100 μL de tampón Tris HCl 50mM + 10 μL de enzima glicanasa-F (100 unidades de enzima liofilizada/100 μL de agua). La mezcla se pasa por un agitador rotatorio y se mantiene durante una noche a 37°C. La muestra desglicosilada está lista para ser analizada por HRMS. Según el caso, el análisis por HRMS de la muestra también se puede

25 realizar sin desglicosilación previa. En los dos casos, los espectros de masas han sido obtenidos con un aparato Waters Q-Tof-2 en modo de electropulverización positiva (ES+). Condiciones cromatográficas : columna: 4 μm BioSuite 250 URH SEC 4,6 x 300 mm (Waters); disolventes: A: formiato de amonio 25mM +1% de ácido fórmico: B: CH_3CN ; temperatura de la columna: 30°C; caudal 0,4 mL/min; isocrático 70% de A + 30% de B (15 min).

30

Todos los compuestos intermedios descritos en esta solicitud se reivindican para su utilización en la preparación de un compuesto de fórmula (I). Más particularmente para cada ejemplo, todos los compuestos intermedios descritos se reivindican para su utilización en la preparación del

35 compuesto de fórmula (I) respectivo.

Ejemplo 1

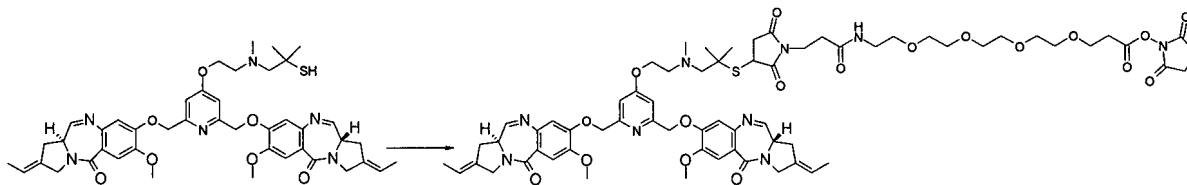
1.1. Preparación del conjugado

Se prepara un conjugado haciendo reaccionar el hu2H11 (denominado también hu53 2H11 en la
5 página 15 del documento **WO 2008010101**; se trata de un anticuerpo que comprende una Vh
que va de la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 24)) y el 3-(2-{2-[2-(2-{3-[3-(2-{[2-(2,6-bis-
[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-
iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-2,5-dioxo-pirrolidin-1-il]-
propanoilamino}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo.

10 A 8,19 mg de hu2H11 en 2,16 mL de un tampón acuoso de concentración 0,05M en ácido N-(2-
hidroxietil)-piperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 0,05M en NaCl y 2mM en ácido etilen-diamin-
tetra-acético (EDTA) de pH = 8, se le añaden 516 µg de 3-(2-{2-[2-(2-{3-[3-(2-{[2-(2,6-bis-[(S)-2-
et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-
15 piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-2,5-dioxo-pirrolidin-1-il]-propanoilamino}-
etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo en disolución en 540 µL de DMA.
Después de 3 horas de agitación a TA, la mezcla se filtra sobre Millex^R-SV 0,45µm (PVDF
Durapore Millipore) y se purifica sobre una columna de SuperdexTM 200 de grado preparativo
(Columna HiloadTM 26/60 GE) previamente equilibrada en una disolución tampón de fosfato
20 salino llevada a pH = 6,5 por adición de HCl. Las fracciones de interés se reúnen y se
concentran sobre Amicon Ultra-15 (Ultracel 50k Millipore) y a continuación se filtran sobre
Sephadex G-25 (Columnas NAP-5 y NAP-10 GE) previamente equilibrada en una disolución
tampón acuosa de concentración 10mM en histidina que contenía 10% de sacarosa y 5% de
NMP.

25 El conjugado obtenido (2,5 mL) se dosifica por espectrometría usando los coeficientes de
extinción de la 4-{2-[metil-(2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-
dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina ($\epsilon_{319 \text{ nm}} =$
8848 M⁻¹·cm⁻¹ y $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 8634 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y del hu2H11 ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 208380 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$): se ha
30 determinado una media de 3,8 dímeros de tomamicina por molécula de anticuerpo a la
concentración de 1,52 mg/mL.

1.2. 3-(2-{2-[2-(2-{3-[3-(2-{2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-2,5-dioxo-pirrolidin-1-il]-propanoilamino}-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo

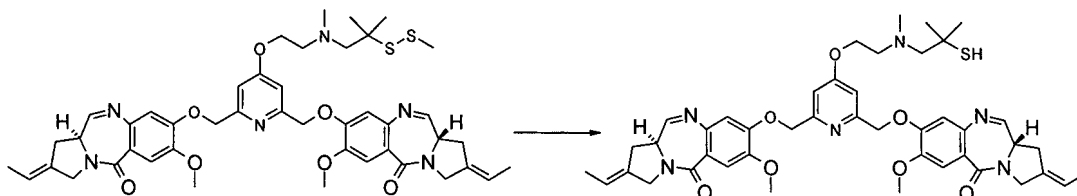


5

A 3,3 mg de diisopropiletilamina sobre soporte de resina (3,72 mmol/g), se le añade una disolución de 9,82 mg de 4-{2-[metil-(2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridina en 50 µL de DMA así como una disolución de 6,8 mg de 3-{2-[2-(2-{2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propanoilamino]-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo en 50 µL de DMA. La mezcla obtenida se agita durante 24 horas a TA y después se filtra sobre sílice (Interchrom Puriflash Silice 15/35U 2G) usando un gradiente de 0 a 10% de metanol en DCM. Las fracciones que contienen el producto buscado se reúnen, se concentran a PR y a continuación se purifican por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (Interchrom Puriflash Silice 15/35U 2G) usando un gradiente de 0 a 10% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto se reúnen y se concentran a PR. Se obtienen así 1,16 mg de 3-(2-{2-[2-(2-{3-[3-(2-{2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-2,5-dioxo-pirrolidin-1-il]-propanoilamino}-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo. LC/MS (E): tr = 1,38 min; [M+H]⁺: m/z 1322.

20

1.3. 4-{2-[metil-(2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridina



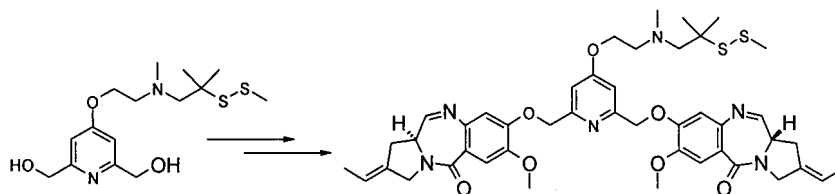
A 40 mg de 4-{2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridina en disolución en 2,1 mL de metanol y 930 µL de DMF, se le añade una disolución de 40 mg de hidrocloreuro de tris(2-carboxietil)fosfina y de 36,6 mg de NaHCO₃ en 680 µL de agua. La mezcla se agita durante 45 minutos a TA y a continuación se concentra a PR y se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (Merck SuperVarioFlash 15 g columna, Si60 15-40 µm), usando un gradiente de 0 a 10% de MeOH en una mezcla de DCM/acetonitrilo 9:1. Las fracciones que contienen el producto se reúnen y se concentran a PR. Se obtienen así 21 mg de

25

30

4-{2-[metil-(2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina. LC/MS (E): tr = 1,28 min; [M+H]⁺: m/z 809; [M - H₂O + H]⁺: m/z 827.

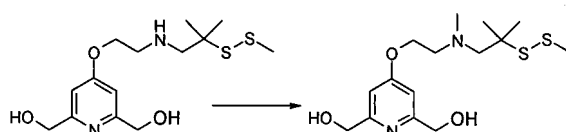
5 **1.4. 4-{2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina**



A una disolución de 22 mg de 4-{2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina y de 53 µL de TEA en 0,5 mL de DCM enfriada a -25°C, se le añaden 19,6 µL de cloruro de metanosulfonilo. Después de 30 minutos de agitación, la mezcla se hidroliza y la fase orgánica se lava con agua y después se seca sobre MgSO₄ y se concentra a PR. El residuo así obtenido (22 mg) se añade a una disolución de 20 mg de tomamicina en 0,7 mL de DMF, así como 30 mg de K₂CO₃ y 12 mg de KI. Se agita la mezcla de reacción durante 2 horas a 30°C y después se hidroliza con 4 mL de agua. El precipitado resultante se lava con agua, se seca a vacío y a continuación se disuelve en DCM, se concentra a PR y se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (Merck SuperVarioFlash 15 g columna, Si60 15-40 µm), usando un gradiente de 0 a 5% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto se reúnen y se concentran a PR. Se obtienen así 8 mg de 4-{2-[metil-(2-metil-2-metilsulfanil-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina. RMN ¹H (500 MHz, CLOROFORMO-d): 1,28 (s, 6 H); 1,76 (d, J = 6,4 Hz, 6 H); 2,39 (s, 3 H); 2,43 (s, 3 H); 2,60 (s, 2 H); 2,91 (s, 2 H); 2,97 (s, 4 H); 3,91 (d, J = 4,2 Hz, 2 H); 4,00 (s, 6 H); 4,09 (s, 2 H); 4,27 (s, 4 H); 5,27 (s, 4 H); 5,61 (q, J = 6,4 Hz, 2 H); 6,85 (s, 2 H); 7,00 (s, 2 H); 7,56 (s, 2 H); 7,65 (d, J = 4,2 Hz, 2 H). LC/MS (A): tr = 0,74 min; [M+H]⁺: m/z 855; [M-H]⁻: m/z 853.

25

1.5. 4-{2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina

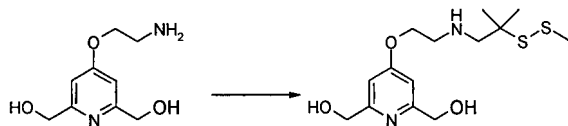


A una suspensión de 322 mg de 4-[2-(2-metil-2-metildisulfanil-propilamino)-etoxi]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina en 262 µL de formaldehído enfriado a 0°C, se le añaden 365 µL de ácido fórmico. Se calienta la mezcla durante 1 hora y cuarto a 100°C. Después de volver a temperatura ambiente, la mezcla se hidroliza y a continuación se le añade una disolución acuosa de sosa 5N hasta la obtención de un pH = 12. La fase acuosa se extrae 3 veces con AcOEt y las fases orgánicas se reúnen y se secan sobre MgSO₄ y se concentran a PR. Se obtienen así 310 mg de

4-{2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): 1,26 (s, 6 H); 2,39 (s, 3 H); 2,40 (s, 3 H); 2,60 (s, 2H) ; 2,88 (t, J = 5,7 Hz, 2 H); 4,13 (t, J = 5,7 Hz, 2 H); 4,45 (d, J = 6,0 Hz, 4 H); 5,31 (t, J = 6,0 Hz, 2 H); 6,85 (s, 2 H). LC/MS (A): tr = 0,22 min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 333; $[\text{M}+\text{HCO}_2\text{H}-\text{H}]^-$: m/z 377.

5

1.6. 4-[2-(2-metil-2-metildisulfanil-propilamino)-etoxi]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



A una suspensión de 390 mg de 4-[2-amino-etoxi]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (preparado después de la desprotección del grupo Boc de la 4-(2-ter-butoxicarbonilamino-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina descrita en la página 101 del documento **WO 07085930**) en 2 mL de THF, se le añaden 270 μL de 2-(metilditio)-isobutiraldehído y 730 μL de isopropóxido de titanio. Después de 20 minutos, se añaden 270 μL de 2-(metilditio)-isobutiraldehído y 730 μL de isopropóxido de titanio suplementarios y la mezcla se agita a TA durante 2 horas. A continuación se le añaden a la mezcla 6 mL de etanol, se agita durante 20 minutos a TA y después se le añaden 124 mg de cianoborohidruro de sodio. Después de 45 minutos de agitación, se añaden 124 mg de cianoborohidruro de sodio suplementarios y después de 1 hora de agitación, la mezcla se concentra a PR y se diluye en AcOEt y agua. El precipitado resultante se filtra y se disuelve en una disolución acuosa de HCl 1M. La fase acuosa obtenida se lleva a pH básico con una disolución acuosa de sosa 5M, se extrae tres veces con DCM y las fases orgánicas juntas se concentran a PR. Se obtienen así 322 mg de 4-[2-(2-metil-2-metildisulfanil-propilamino)-etoxi]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,26 (s, 6 H); 1,81 (m ancho, 1 H); 2,39 (s, 3 H); 2,67 (s ancho, 2 H) 2,94 (t ancho, J = 5,7 Hz, 2 H); 4,11 (t, J = 5,7 Hz, 2 H); 4,45 (d, J = 5,5 Hz, 4 H); 5,32 (t, J = 5,5 Hz, 2 H); 6,85 (s, 2 H). LC/MS (A): tr = 0,24 min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 347.

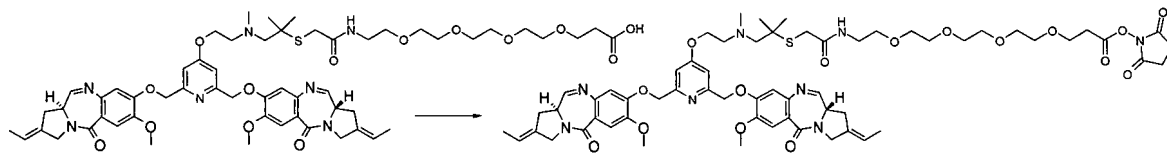
25

Ejemplo 2

2.1. Preparación del conjugado

Se prepara un conjugado como para el ejemplo 1 haciendo reaccionar el hu2H11 y el 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-ilo-ximetil]-piridin-4-ilo-xi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetiletilsulfanil)-acetilamino)-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo. El conjugado obtenido se dosifica por espectrometría usando los coeficientes de extinción de la 4-{2-[metil-(2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-ilo-ximetil]-piridina ($\epsilon_{319 \text{ nm}} = 8848 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 8634 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y del hu2H11 ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 208380 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): se ha determinado una media de 5,6 dímeros de tomamicina por molécula de anticuerpo.

2.1. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo

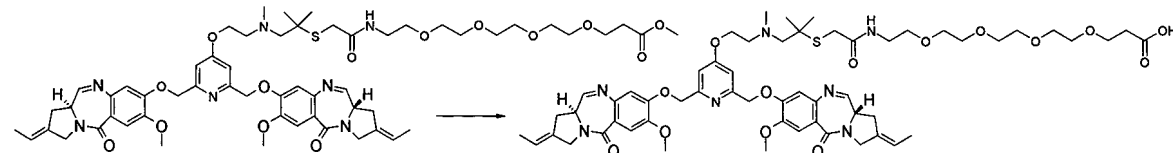


5

A 12 mg de ácido 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propanoico en disolución en 1 mL de THF y 1 mL de DMC se le añaden 5,5 mg de carbonato de N,N-disuccinimidilo y 15 µL de DIPEA. Después de 3 horas a TA, se añaden 4 mL de DCM y la fase orgánica resultante se lava dos veces con agua, se seca sobre MgSO₄, se concentra a PR y se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (Interchrom Puriflash Silice 15/35U 2G), usando un gradiente de 3 a 8% de metanol en DCM. Se obtienen así 8 mg de 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo. LC/MS (E): tr = 1,36 min; [M+2 H₂O+Na]⁺: m/z 1270; [M+H₂O+Na]⁺: m/z 1252; [M - H₂O + H]⁺: m/z 1229; [M+H]⁺: m/z 1211.

15

2.2. Ácido 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propanoico



20

A 18 mg de ácido 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propanoato de metilo en disolución en 270 µL de THF se le añaden 17,5 µL de una disolución acuosa de litina y 100 µL de agua. Después de 2 horas, la mezcla se diluye en DMC y se le añade una disolución tampón de fosfato a pH = 3. La fase acuosa resultante se extrae 3 veces con DCM y las fases orgánicas se reúnen y se secan sobre MgSO₄, se concentran a PR y se purifican por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (Interchrom Puriflash Silice 15/35U 2G), usando un gradiente de 3 a 15% de metanol en DCM. Se obtienen así 11,5 mg de ácido 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propanoico

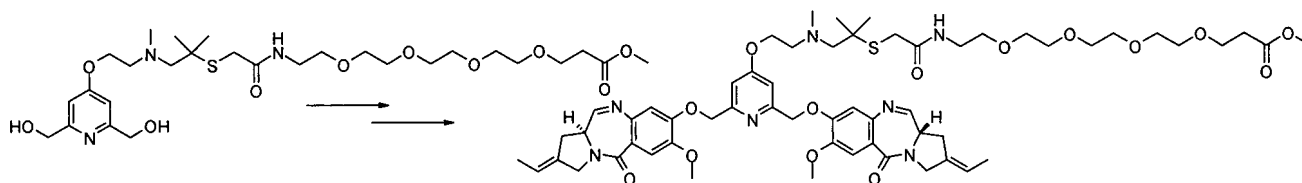
25

30

LC/MS (D): tr = 0,88 min; $[M+H_2O+Na]^+$: m/z 1154; $[M - H_2O + H]^+$: m/z 1133; $[M+H]^+$: m/z 1115;

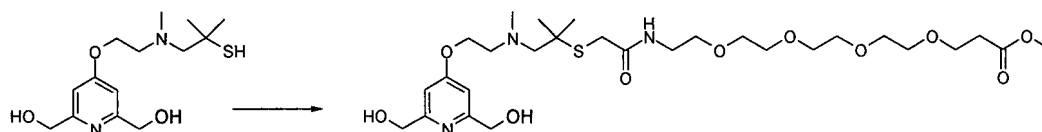
2.3. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de metilo

Se prepara según el ejemplo 1 a partir del 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de metilo:



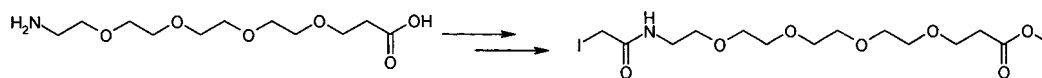
LC/MS (D): tr = 0,93 min; $[M - H_2O + H]^+$: m/z 1146 ; $[M+H]^+$: m/z 1128

2.4. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de metilo



A 45 mg de 4-{2-[(2-mercapto-2-metil-propil)-metil-amino]-etoxi}-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina en disolución en 1 mL de DMF, se le añaden 73,7 mg de 3-{2-(2-{2-[2-(2-yodo-acetilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-propanoato de metilo en disolución en 1 mL de DMF y 39 μ L de DIPEA. Después de 24 horas a TA, la mezcla se concentra a PR y se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF25-8g), usando un gradiente de 0 a 10% de metanol en DCM. Se obtienen así 53 mg de 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de metilo. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,21 (s, 6 H); 2,40 (s, 3 H); 2,50 (t, J = 5,8 Hz, 2 H); 2,87 a 2,56 (m, 4 H); 3,15 a 3,23 (m, 4 H); 3,40 (t, J = 5,8 Hz, 2 H); 3,47 a 3,52 (m, 12 H); 3,59 (s, 3 H); 3,62 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 4,13 (t, J = 5,8 Hz, 2 H); 4,45 (d, J = 5,8 Hz, 4 H); 5,31 (t, J = 5,8 Hz, 2 H); 6,85 (s, 2 H); 7,98 (t, J = 5,8 Hz, 1 H). LC/MS (A): tr = 0,35 min; $[M+H]^+$: m/z 620; $[M+2H]^+$: m/z 310,5 (pico base); $[M-H+HCO_2H]^-$: m/z 664.

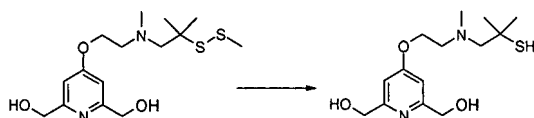
2.5. 3-2-[2-(2-{2-[2-(2-yodo-acetilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propanoato de metilo



A 100 mg de ácido 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propanoico se le añaden 117,4 mg de yodoacetato de N-hidroxisuccinimidilo en disolución en 3 mL de DCM. Después de 2

horas a TA, se añaden 330 µL de MeOH y la mezcla se enfría a 0°C. Se añaden 360 µL de una disolución 2M de trimetilsilildiazometano en hexano. Después de 1 hora, la mezcla se neutraliza por adición de 50 µL de ácido acético y a continuación se le añade una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ hasta la obtención de pH = 8. La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ y se concentra a PR y se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (Interchrom Puriflash Silice 15/35U 10G), usando un gradiente de 0 a 10% de metanol en DCM. Se obtienen así 132 mg de 3-[2-(2-{2-[2-(2-yodo-acetilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-propanoato de metilo. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 2,54 (t, J = 6,4 Hz, 2 H); 3,20 (q, J = 5,8 Hz, 2 H); 3,41 (t, J = 5,8 Hz, 2 H); 3,48 a 3,53 (m, 12 H); 3,60 (s, 3 H); 3,63 (t, J = 6,4 Hz, 2 H); 3,65 (s, 2 H); 8,27 (t ancho, J = 5,8 Hz, 1 H). LC/MS (A): tr = 0,54 min; [M+H]⁺: m/z 448; [M+HCO₂H-H]⁻: m/z 492.

2.6. 4-{2-[(2-mercapto-2-metil-propil)-metil-amino]-etoxi}-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



A 80 mg de 4-{2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina en disolución en 1,95 mL de metanol, se le añade una disolución de 198 mg de hidrocloreuro de tris(2-carboxietil)fosfina en 730 µL de agua. Después de 2 horas a TA, la mezcla se concentra a PR y se recoge en 10 mL de agua. La fase acuosa se lleva a pH = 8 por adición de una disolución acuosa de sosa y a continuación se extrae 2 veces con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl y se concentra a PR. Se obtienen 68 mg de 4-{2-[(2-mercapto-2-metil-propil)-metil-amino]-etoxi}-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,28 (s, 6 H); 2,43 (s, 3 H); 2,54 (s, 2 H); 2,62 (s, 1H); 2,91 (t, J = 5,7 Hz, 2 H); 4,15 (t, J = 5,7 Hz, 2 H); 4,45 (d, J = 5,8 Hz, 4 H); 5,30 (t, J = 5,8 Hz, 2 H); 6,85 (s, 2 H). LC/MS (A): tr = 0,11 min; [M+H]⁺: m/z 301.

Ejemplo 3

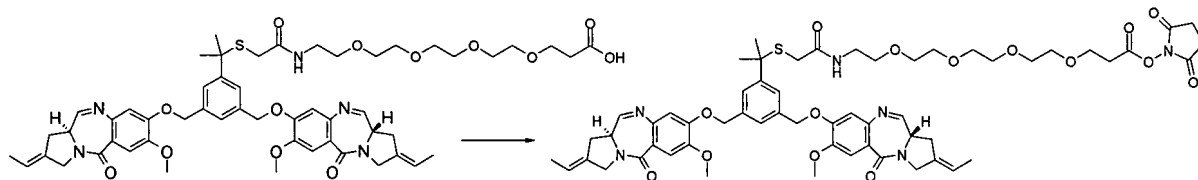
3.1. preparación del conjugado

Se prepara un conjugado como para el ejemplo 1 haciendo reaccionar el hu2H11 y el 3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-ilo-ximetil]-1-metil-etilsulfanil]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo.

El conjugado obtenido se dosifica por espectrometría usando los coeficientes de extinción de la 1-(1-metil-1-metildisulfanil-etil)-3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-ilo-ximetil]-benceno ($\epsilon_{319 \text{ nm}} = 8460 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 10531 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y del hu2H11 ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 208380 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$): se ha determinado una media de 4,2 derivados de tomamicina por molécula de anticuerpo.

3.2. 3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-1-metil-etilsulfanil]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo

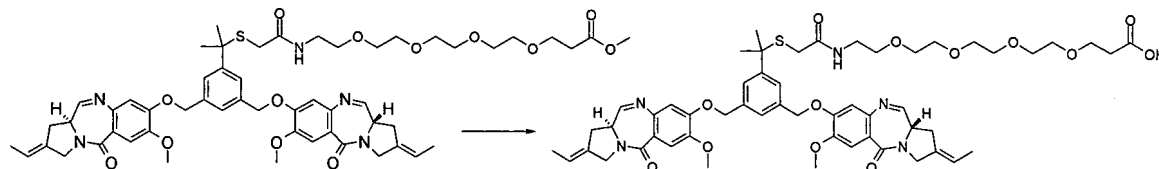
Preparado como para el ejemplo 2, a partir del ácido 3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-1-metil-etilsulfanil]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoico:



LC/MS (F): tr = 1,27 min; [M+H]⁺: m/z 1123

3.3. Ácido 3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-1-metil-etilsulfanil]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoico

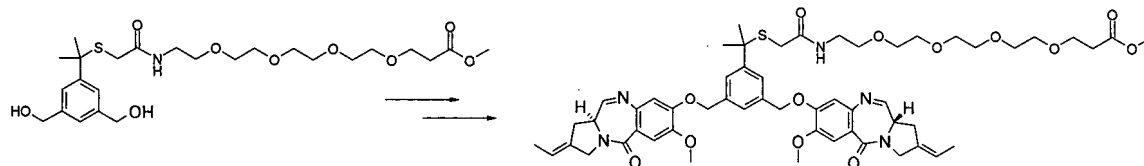
Preparado como para el ejemplo 2, a partir del 3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-1-metil-etilsulfanil]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoato de metilo:



LC/MS (F): tr = 1,19 min; [M+H]⁺: m/z 1026.

3.4. 3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-1-metil-etilsulfanil]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoato de metilo

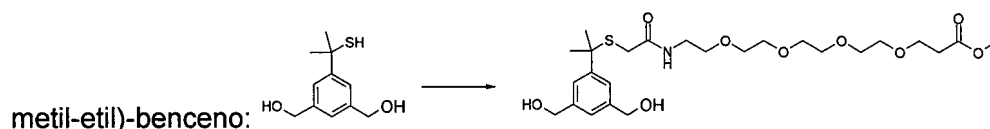
Preparado como para el ejemplo 2 a partir del 3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-bis-hidroximetil-fenil)-1-metil-etilsulfanil]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoato de metilo:



LC/MS (F): tr = 1,28 min; [M+H]⁺: m/z 1040

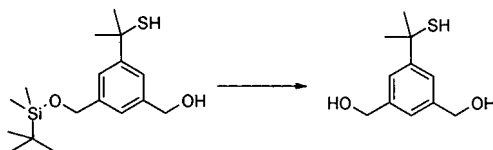
3.5. 3-(2-{2-[2-(2-{2-[1-(3,5-bis-hidroximetil-fenil)-1-metil-etilsulfanil]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-propanoato de metilo

Preparado como se describe para el ejemplo 2, a partir de 3,5-bis-hidroximetil-1-(1-mercapto-1-



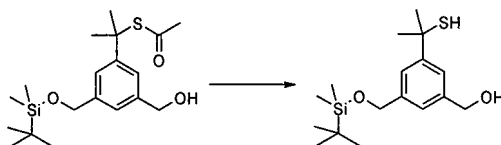
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,64 (s, 6 H); 2,53 (t, $J = 6,2$ Hz, 2 H); 2,93 (s, 2 H); 3,15 (q, $J = 6,0$ Hz, 2 H); 3,37 (t, $J = 6,0$ Hz, 2 H); 3,49 (m, 12 H); 3,59 (s, 3 H); 3,62 (t, $J = 6,2$ Hz, 2 H); 4,49 (d, $J = 5,6$ Hz, 4 H); 5,13 (t, $J = 5,6$ Hz, 2 H); 7,14 (s, 1 H); 7,32 (s, 2 H); 7,84 (t, $J = 6,0$ Hz, 1 H). LC/MS (B): tr = 2,98 min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 532; pico de base m/z 354; $[\text{M}-\text{H}+\text{HCO}_2\text{H}]^-$: m/z 576.

3.8. 3,5-bis-hidroximetil-1-(1-mercapto-1-metil-etil)-benzeno



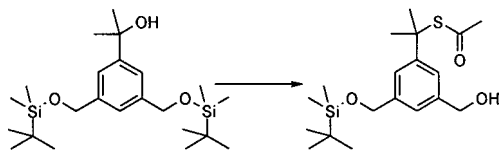
- 10 Una disolución de 43 mg de 5-hidroximetil-1-(1-mercapto-1-metil-etil)-3-(ter-butil-dimetil-silaniloxi metil)-benceno en 1 mL de una mezcla de ácido acético/THF/agua (3/1/1) se agita a TA durante 4,5 horas, se concentra a PR y a continuación se recoge en 3 mL de agua. El pH de la fase acuosa se lleva a 7 por adición de una disolución acuosa al 10% de Na_2CO_3 y a continuación la fase acuosa se extrae con AcOEt. La fase orgánica se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se concentra a PR. Se obtienen así 18 mg de 3,5-bis-hidroximetil-1-(1-mercapto-1-metil-etil)-benceno. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,76 (s, 6 H); 3,19 (s, 1 H); 4,48 (d, $J = 5,9$ Hz, 4 H); 5,14 (t, $J = 5,9$ Hz, 2 H); 7,13 (s, 1 H); 7,36 (s, 2 H). MS (C): Cl: $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: m/z 230.

3.9. 5-hidroximetil-1-(1-mercapto-1-metil-etil)-3-(ter-butil-dimetil-silaniloxi metil)-benceno



- 20 A 336 mg de tioacetato de 1-[3-(ter-butil-dimetil-silaniloximetil)-5-hidroximetil-fenil]-1-metil-etilo en disolución en 3,7 mL de acetonitrilo se le añaden 114 μL de hidrato de hidrazina. Después de 3 horas a TA, la mezcla se concentra a PR y se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (Biotage 25+M), usando un gradiente de 0 a 55% de AcOEt en heptano. Se obtienen así 230 mg de 5-hidroximetil-1-(1-mercapto-1-metil-etil)-3-(ter-butil-dimetil-silaniloximetil)-benceno. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 0,08 (s, 6 H); 0,92 (s, 9 H); 1,76 (s, 6 H); 3,19 (s, 1H); 4,48 (d, $J = 5,7$ Hz, 2 H); 4,71 (s, 2 H); 5,14 (t, $J = 5,7$ Hz, 1 H); 7,10 (s, 1 H); 7,33 a 7,42 (m, 2 H). MS (C): Cl: $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: m/z 344.

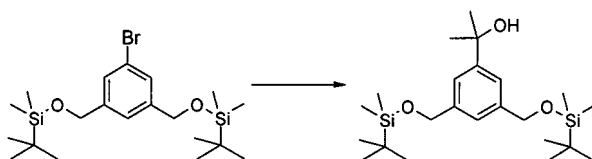
3.10. Tioacetato de 1-[3-(ter-butil-dimetil-silaniloximetil)-5-hidroximetil-fenil]-1-metil-etilo



A 1 g de 1-(1-hidroxi-1-metil-etil)-3,5-bis-(ter-butil-dimetil-silaniloximetil)-benceno en disolución en 4,7 mL de 1,2-dicloroetano se le añaden 404 μ L de ácido tioacético y 376 mg de yoduro de zinc.

- 5 Se calienta la mezcla a 50°C durante 40 minutos. Después de volver a TA, las sales se eliminan por filtración y la fase orgánica se concentra a PR y se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (Biotage 40+M), usando un gradiente de 0 a 30% de AcOEt en heptano. Se obtienen así 248 mg de tioacetato de 1-[3-(ter-butil-dimetil-silaniloximetil)-5-hidroximetil-fenil]-1-metil-etilo. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 0,08 (s, 6 H); 0,91 (s, 9 H); 1,79 (s, 6 H); 2,17 (s, 3H); 4,48 (d, J = 5,6 Hz, 2 H); 4,70 (s, 2 H); 5,16 (t, J = 5,6 Hz, 1 H); 7,11 (s, 1 H); 7,33 (s, 1 H); 7,35 (s, 1H).
- 10 LC/MS (A): tr = 1,23 min; $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 391.

3.11. 1-(1-hidroxi-1-metil-etil)-3,5-bis-(ter-butil-dimetil-silaniloximetil)-benceno



- 15 A 4,32 g de 1-bromo-3,5-bis-(ter-butil-dimetil-silaniloximetil)-benceno (G. T. Crisp, P. D. Turner *Tetrahedron* **2000**, 56 (42), 8335) en disolución en 150 mL de THF enfriado a -71°C se le añaden gota a gota 10,5 mL de n-BuLi en disolución 1,6M en hexano. Después de 1 hora y 30 minutos, se añaden gota a gota 4,27 mL de acetona. Se deja que la temperatura de la mezcla suba a TA y a continuación se hidroliza con una disolución acuosa saturada de NH_4Cl . La fase acuosa se
- 20 extrae con 100 mL de AcOEt y las fases orgánicas reunidas se secan sobre MgSO_4 , se concentran a PR y se purifican por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (Biotage 65+M), usando un gradiente de 0 a 20% de AcOEt en heptano. Se obtienen así 2,48 mg de 1-(1-hidroximetil-1-metil-etil)-3,5-bis-(ter-butil-dimetil-silaniloximetil)-benceno. RMN ^1H (400 MHz, CLOROFORMO- d): 0,11 (s, 12 H); 0,96 (s, 18 H); 1,59 (s, 6H); 1,69 (s, 1 H); 4,76 (s, 4 H); 7,21
- 25 (s, 1 H); 7,33 (s, 2 H). LC/MS (B): tr = 6,43 min; $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 447; pico de base m/z 407.

Ejemplo 4

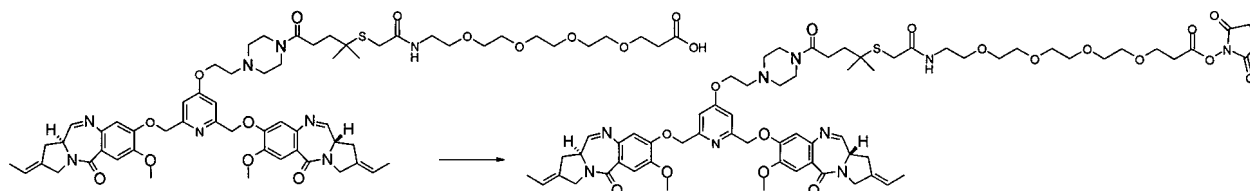
4.1. Preparación del conjugado

- Se prepara un conjugado como para el ejemplo 1 haciendo reaccionar el hu2H11 y el 3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-piperazin-1-il}-1,1-dimetil-4-oxo-butilsulfanil)-acetilamino]-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo. El conjugado obtenido se dosifica por espectrofotometría usando los coeficientes de extinción $\epsilon_{320\text{nm}}$
- 30

= $7876 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y $\varepsilon_{280\text{nm}} = 4334 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para el dímero de tomamicina y $\varepsilon_{280\text{nm}} = 208,380 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para el hu2H11: se ha determinado una media de 3,13 dímeros de tomamicina por molécula de anticuerpo.

5 **4.2. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-piperazin-1-il}-1,1-dimetil-4-oxo-butilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo:**

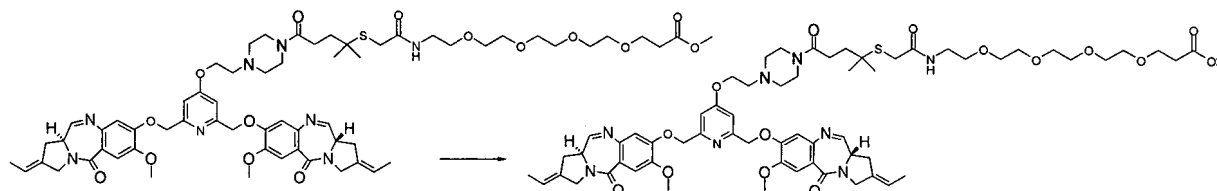
Preparado según el ejemplo 2 a partir del ácido 3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-piperazin-1-il}-1,1-dimetil-4-oxo-butilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoico.



15 LC/MS (B): $\text{tr} = 3,27 \text{ min}$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 1309 ; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$: m/z 655.

4.3. Ácido 3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-piperazin-1-il}-1,1-dimetil-4-oxo-butilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoico

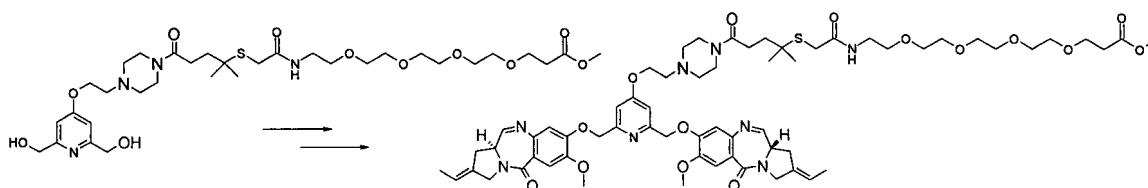
20 Preparado según el ejemplo 2 a partir del 3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-piperazin-1-il}-1,1-dimetil-4-oxo-butilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de metilo.



25 LC/MS (B): $\text{tr} = 3,16 \text{ min}$; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 1212 ; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$: m/z 606.

4.4. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-piperazin-1-il}-1,1-dimetil-4-oxo-butilsulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de metilo

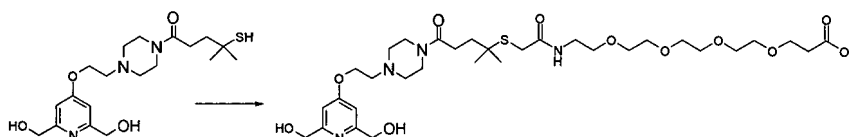
30 Preparado según el ejemplo 2, a partir del 3-{2-[2-(2-{2-[2-(4-{4-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-piperazin-1-il}-1,1-dimetil-4-oxo-butyl sulfanil)-acetilamino]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de metilo



RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): 1,22 (s, 6 H); 1,69 (m, 8 H); 2,37 (m, 2 H); 2,40 (m, 2 H); 2,48 (m, 2 H); 2,53 (t, $J = 6,1$ Hz, 2 H); 2,72 (m, 2 H); 2,92 (m, 2 H); 3,04 (m, 2 H); 3,11 (s, 2 H); 3,19 (q, $J = 5,4$ Hz, 2 H); 3,39 (t, $J = 5,4$ Hz, 2 H); 3,42 (m, 4 H); 3,49 (m, 12 H); 3,59 (s, 3 H); 3,62 (t, $J = 6,1$ Hz, 2 H); 3,86 (s, 6 H); 3,88 (m, 2 H); 4,10 (m, 4 H); 4,22 (m, 2 H); 5,17 (d, $J = 13,0$ Hz, 2 H); 5,22 (d, $J = 13,0$ Hz, 2 H); 5,55 (m, 2 H); 6,94 (s, 2 H); 7,09 (s, 2 H); 7,38 (s, 2 H); 7,77 (d, $J = 3,9$ Hz, 2 H); 8,01 (t, $J = 5,4$ Hz, 1 H). LC/MS (B): tr = 3,30 min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 1225; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$: m/z 613 (pico base):

4.5. 3-{2-[2-(2-[2-(2-[4-{2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-piperazin-1-il}-1,1-dimetil-4-oxo-butilsulfanil)-acetilamino]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi}-propanoato de metilo

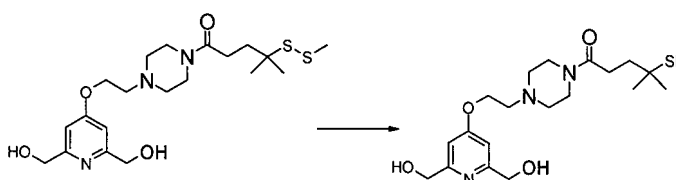
Preparado según el ejemplo 2 a partir de la 4-(2-[4-(4-mercapto-4-metil)-pentanoil]-piperazin-1-il]-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina.



RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): todas las señales del espectro son anchas con 1,22 (s, 6H); 1,71 (m, 2 H); 2,20 a 2,58 (m parcialmente enmascarado, 8 H); 2,75 (m, 2 H); 3,12 (m, 2 H); 3,19 (m, 2 H); 3,47 a 3,53 (m, 18 H); 3,60 (m, 5 H); 4,18 (m, 2 H); 4,46 (m, 4 H); 5,31 (m, 2 H); 6,86 (s, 2 H); 8,00 (m, 1 H); LC/MS (B): tr = 2,20 min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 717; $[\text{M}-\text{H}+\text{CO}_2\text{H}]^-$: m/z 761.

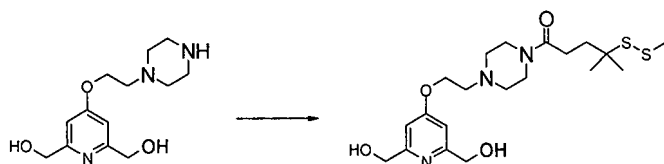
4.6. 4-(2-[4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanoil]-piperazin-1-il]-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina

Preparado según el ejemplo 2 a partir de la 4-(2-[4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanoil]-piperazin-1-il]-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina.



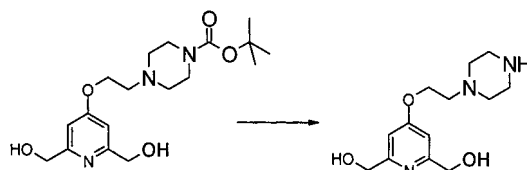
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,32 (s, 6 H); 1,76 (m, 2 H); 2,36 a 2,53 (m parcialmente enmascarado, 6 H); 2,66 (s, 1 H); 2,75 (t, $J = 5,5$ Hz, 2 H); 3,40 a 3,52 (m, 4 H); 4,18 (t, $J = 5,5$ Hz, 2 H); 4,46 (s, 4 H); 5,30 (m muy extendido, 2 H); 6,86 (s, 2 H). LC/MS (B): tr = 0,76 min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 398; $[\text{M}-\text{H}]^-$: m/z 396.

4.7. 4-(2-[4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanoil]-piperazin-1-il]-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



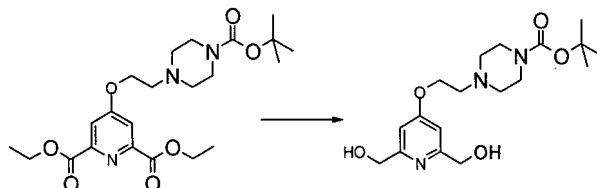
A 600 mg de 4-(2-piperazin-1-il-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina en disolución en 12 mL de DMF se le añaden 344 μ L de TEA y después de 10 minutos de agitación, 748 mg de ácido 4-metil-4-metildisulfanil-pentanoico, 417 μ L de diisopropilcarbodiimida y 69 mg de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol. Después de 15 horas a TA, la mezcla se concentra a PR, se le añaden 15 mL de agua y se extrae 2 veces con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre MgSO_4 , se concentran a PR y se purifican por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (Analogix Super Flash SiO_2 SF25-80 g) usando un gradiente de 2 a 10% de MeOH en DCM. Se obtienen así 390 mg de 4-(2-[4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanoil]-piperazin-1-il]-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil) – piridina. RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): 1,26 (s, 6 H); 1,79 (m, 2 H); 2,36 (m, 2 H); 2,39 (s, 3 H); 2,40 a 253 (m parcialmente enmascarado, 4 H); 2,75 (t, $J = 5,6$ Hz, 2 H); 3,45 (m, 4 H); 4,18 (t, $J = 5,6$ Hz, 2 H); 4,46 (d, $J = 5,9$ Hz, 4 H); 5,30 (t, $J = 5,9$ Hz, 2 H); 6,86 (s, 2 H). LC/MS (A): tr = 0,42 min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 444; $[\text{M}-\text{H}+\text{CO}_2\text{H}]^-$: m/z 488.

4.8. 4-(2-piperazin-1-il-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



A 2,3 mg de 4-(2-(4-ter-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina en disolución en 33 mL de dioxano se le añaden 19 mL de una disolución de HCl 4M en dioxano. Después de 12 horas a TA, el precipitado resultante se recupera por filtración sobre una frita de vidrio, se recoge en MeOH y a continuación se concentra a PR y se diluye en 40 mL de una mezcla de MeOH/agua 1/1. La disolución resultante se deposita sobre Mega BE-SCX, 25GM 150ML (Varian). Después de lavado de la fase con MeOH, el producto de interés se eluye con una disolución de amoníaco 2N en metanol. La fase de MeOH/ NH_3 se concentra a PR. Se obtienen así 1,6 g de 4-(2-piperazin-1-il-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina. RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): 2,40 (m, 4 H); 2,68 (m, 6 H); 4,15 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H) ; 4,44 (m, 4 H); 5,29 (m, 2 H); 6,85 (s, 2 H). LC/MS (A): tr = 0,10 min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 268; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$: m/z 134,5; pico de base m/z 113.

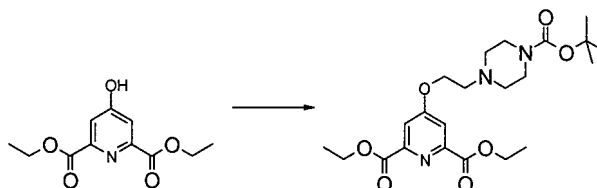
4.9. 4-[2-(4-ter-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-etoxi]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



A 3,1 g de 4-[2-(4-ter-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-etoxi]-piridina-2,6-dicarboxilato de dietilo en disolución en 105 mL de EtOH, se le añaden 779 mg de borohidruro de sodio y 2,29 g de CaCl_2 .

- 5 Después de 3 horas a TA, la mezcla se hidroliza y se concentra a PR. Al residuo obtenido se le añade agua y la fase acuosa resultante se extrae 4 veces con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl y a continuación se concentra a PR. Se obtienen así 2,4 g de 4-[2-(4-ter-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-etoxi]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,39 (s, 9 H); 2,43 (m, 4 H); 2,73 (t, J = 5,6 Hz, 2 H);
- 10 3,30 (m parcialmente enmascarado, 4H); 4,17 (t, J = 5,6 Hz, 2 H); 4,45 (d, J = 5,9 Hz, 4 H); 5,30 (t, J = 5,9 Hz, 2H) ; 6,86 (s, 2 H). LC/MS (A): tr = 0,24 min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 368.

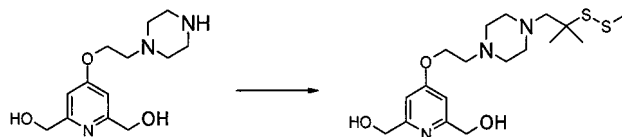
4.10. 4-[2-(4-ter-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-etoxi]-piridina-2,6-dicarboxilato de dietilo



- 15 A una disolución de 5 g de 1-ter-butoxicarbonil-4-(2-hidroxietil)-piperazina en 102 mL de DCM enfriado a 0°C se le añaden 4,5 mL de TEA y a continuación 2 mL de cloruro de metanosulfonilo. Después de 1 hora, la mezcla se lleva a TA. Después de 1 hora de agitación suplementaria, la mezcla se hidroliza y la fase orgánica se lava 2 veces con agua y después se seca sobre MgSO_4 y se concentra a PR. Al residuo así obtenido (6,7 g) se le añaden 140 mL de DMF y se lleva a
- 20 60°C. Entonces se añaden 190 mg de diéster de etilo del ácido quelidámico (Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U.; Vendrame, T., *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5988) y 549 mg de K_2CO_3 y la mezcla se calienta a 80°C durante 20 horas. Después de concentración a PR, la mezcla se hidroliza, se extrae 3 veces con AcOEt y las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución saturada de NaCl, se concentran a PR y se purifican por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (Analogix
- 25 Super Flash SiO_2 SF25-150 g) usando un gradiente de 60 a 85% de AcOEt en heptano. Se obtienen así 3,1 g de 4-[2-(4-ter-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-etoxi]-piridina-2,6-dicarboxilato de dietilo. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,34 (t, J = 7,2 Hz, 6 H); 1,39 (s, 9 H); 2,44 (m, 4 H); 2,76 (t, J = 5,7 Hz, 2 H); 3,30 (m parcialmente enmascarado, 4H); 4,34 (t, J = 5,7 Hz, 2 H); 4,38 (q, J = 7,1 Hz, 4 H); 7,74 (s, 2 H). LC/MS (B): tr = 2,81 min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 452 ; $[\text{MH}+\text{HCO}_2\text{H}]^+$: m/z 496.

Ejemplo 5**5.1. 4-{2-[4-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-piperazin-1-il]-etoxi}-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina**

Se prepara según el ejemplo 1, a partir de la 4-(2-piperazin-1-il-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina.



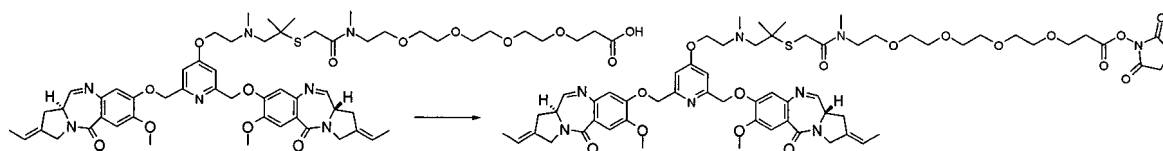
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,25 (s, 6 H); 2,39 (s, 3 H); 2,40 (s, 2 H); 2,44 a 2,57 (m parcialmente enmascarado, 8 H); 2,69 (t, J = 5,7 Hz, 2 H); 4,14 (t, J = 5,7 Hz, 2 H); 4,45 (d, J = 5,7 Hz, 4 H); 5,29 (t, J = 5,7 Hz, 2 H); 6,85 (s, 2 H). LC/MS (B): tr = 0,51 min; [M+H] $^+$: m/z 402.

Ejemplo 6**6.1. Preparación del conjugado**

Se prepara un conjugado como para el ejemplo 1 haciendo reaccionar el hu2H11 y el 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetiletilsulfanil)-acetilmetilamino]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo. El conjugado obtenido se dosifica por espectrofotometría usando los coeficientes de extinción $\epsilon_{319\text{nm}} = 7789 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{nm}} = 4362 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para el dímero de tomamicina y $\epsilon_{280\text{nm}} = 208380 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para el hu2H11: se ha determinado una media de 2,90 dímeros de tomamicina por molécula de anticuerpo.

6.2. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetiletilsulfanil)-acetil-metilamino]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo

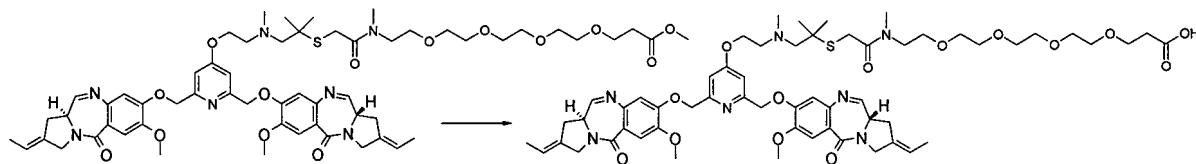
Preparado según el ejemplo 2 a partir del ácido 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetiletilsulfanil)-acetil-metilamino]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-propanoico:



LC/MS (F): tr = 1,02 min; [M+H] $^+$: m/z 1225 ; [M - H $_2$ O + H] $^+$: m/z 1243

6.3. Ácido 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetil-metilamino]-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propanoico

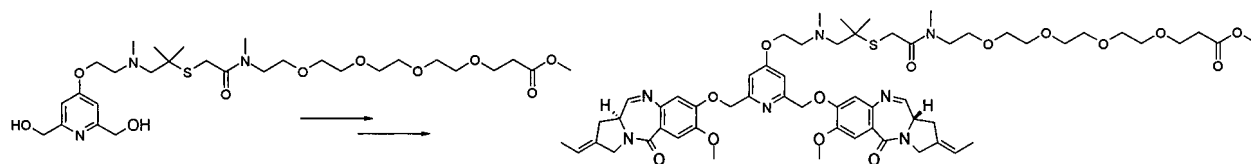
Preparado según el ejemplo 2 a partir del 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetil-metilamino]-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propanoato de metilo:



LC/MS (F): tr = 0,97 min; [M+H]⁺: m/z 1129

6.4. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetra hidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetil-metilamino]-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propanoato de metilo

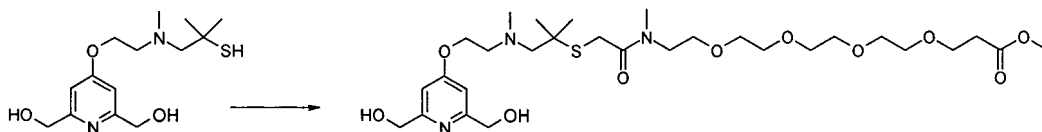
Se prepara según el ejemplo 2 a partir del 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetil-metilamino]-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propanoato de metilo:



RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): todas las señales del espectro son anchas con 1,20 (s, 6H); 1,58 a 1,73 (m, 6 H); 2,38 (s, 3 H); 2,52 a 3,07 (m, 13 H); 3,36 a 3,63 (m, 23 H); 3,67 a 3,91 (m, 8 H); 4,06 a 4,26 (m, 6 H); 5,02 a 5,26 (m, 4 H); 5,33 a 5,60 (m, 2 H); 6,39 a 7,42 (m, 6 H); 7,76 (m, 2 H). LC/MS (A): tr = 0,77 min; [M+H]⁺: m/z 1142; [M+2H]²⁺: m/z 571,5 (pico base).

6.5. 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-metil-amino}-1,1-dimetil-etilsulfanil)-acetil-metilamino]-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propanoato de metilo

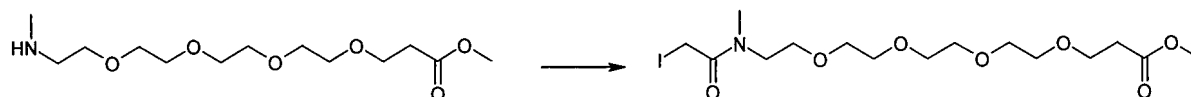
Preparado según el ejemplo 2 a partir del 3-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2-yodo-acetil)-metilamino]-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propanoato de metilo.



RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): desdoblamiento 50-50 de rotámeros con: 1,22 (s, 3H); 1,24 (s, 3 H); 2,41 (s, 3 H); 2,53 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 2,56 (m, 2 H); 2,80 (s, 1 H); 2,88 (t, J = 5,9 Hz, 2 H); 3,05 (s, 2 H); 3,35 a 3,58 (m, 18 H); 3,59 (s, 3 H); 3,62 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 4,13 (t, J = 5,9 Hz, 2

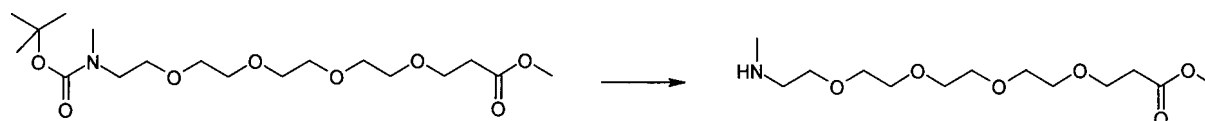
H); 4,45 (d, J = 5,9 Hz, 4 H); 5,29 (t, J = 5,9 Hz, 2 H); 6,85 (s, 2 H). LC/MS (B): tr = 2,18 min; [M+H]⁺: m/z 634; [M-H+CO₂H]⁻: m/z 678.

6.6. 3-[2-[2-[2-[2-(2-yodo-acetil)-metil-amino]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-propanoato de metilo



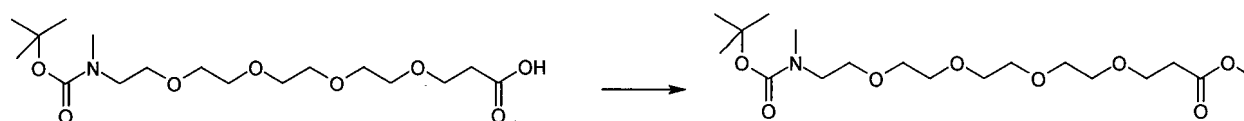
A 215 mg de 3-(2-[2-[2-(2-metilamino-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-propanoato de metilo se le añaden 117,4 mg de yodoacetato de N-hidroxisuccinimido en disolución en 6,5 mL de DCM. Después de 2 horas a TA, la mezcla se concentra a PR y se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF25-24 g), usando un gradiente de 0 a 6% de MeOH en DCM. Se obtienen así 210 mg de 3-[2-(2-[2-[2-(2-yodo-acetil)-metilamino]-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propanoato de metilo. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): desdoblamiento 55-45 de rotámeros con 2,54 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 2,83 (s, 1,35 H); 3,02 (s, 1,65 H); 3,36 a 3,55 (m, 16 H); 3,60 (s, 3 H); 3,63 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 3,83 (s, 1,1 H); 3,88 (s, 0,9 H). LC/MS (A): tr = 0,62 min; [M+H]⁺: m/z 462.

6.7. 3-(2-[2-[2-(2-metilamino-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-propanoato de metilo :



A 390 mg de 3-[2-(2-[2-[2-(ter-butoxicarbonil-metil-amino)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi]-propanoato de metilo en disolución en 5,3 mL de dioxano se le añaden 3 mL de una disolución de HCl 4M en dioxano. Después de 12 horas a TA, la mezcla se concentra a PR, se pone en disolución en un mínimo de metanol y se deposita sobre Mega BE-SCX, 10GM 60ML (Varian). Después de lavado de la fase con MeOH, el producto de interés se eluye con una disolución de amoníaco 2N en metanol. La fase de metanol/NH₃ se concentra a PR. Se obtienen así 270 mg de 3-(2-[2-[2-(2-metilamino-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-propanoato de metilo. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 2,28 (s, 3 H); 2,54 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 2,59 (t, J = 5,9 Hz, 2 H); 3,44 (t, J = 5,9 Hz, 2 H); 3,47 a 3,54 (m, 12 H); 3,60 (s, 3 H); 3,63 (t, J = 6,2 Hz, 2 H). LC/MS (A): tr = 0,30 min; [M+H]⁺: m/z 294.

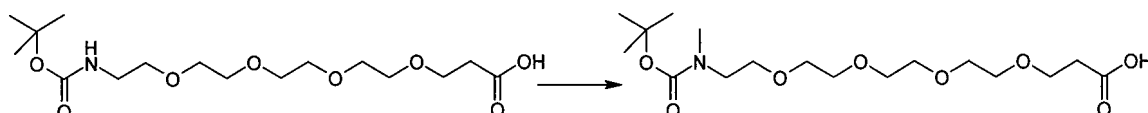
6.8. 3-[2-[2-[2-[2-(ter-butoxicarbonil-metil-amino)-etoxi]-etoxi]-etoxi]-etoxi]-propanoato de metilo



A una disolución de 500 mg de ácido 3-[2-(2-[2-[2-(ter-butoxicarbonil-metil-amino)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi]-propanoico en 4,8 mL de MeOH enfriado a 0°C, se le añaden 2 mL de una

disolución 2M de trimetilsilildiazometano en hexano. Después de 2 horas, la mezcla se neutraliza por adición de 120 μ L de ácido acético y a continuación se concentra a PR y se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF25-40 g), usando un gradiente de 0 a 5% de metanol en DCM. Se obtienen así 400 mg de 3-[2-(2-[2-(ter-butoxicarbonil-metil-amino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-propanoato de metilo. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,38 (s, 9 H); 2,54 (t, J = 6,2 Hz, 2 H); 2,80 (s ancho, 3 H); 3,29 (t parcialmente enmascarado, J = 5,9 Hz, 2 H); 3,45 a 3,55 (m, 14 H); 3,59 (s, 3 H); 3,63 (t, J = 6,2 Hz, 2 H). LC/MS (A): tr = 0,84 min; [M+Na]⁺: m/z 416 (pico base) ; LC/MS (A): tr = 0,84 min; [M+Na]⁺: m/z 416 (pico base).

6.9. Ácido 3-[2-(2-[2-[2-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propanoico



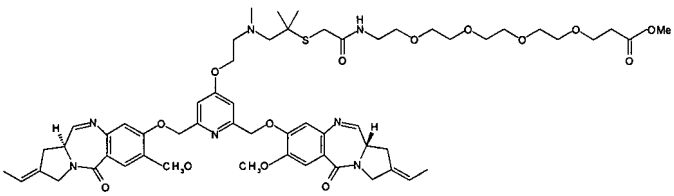
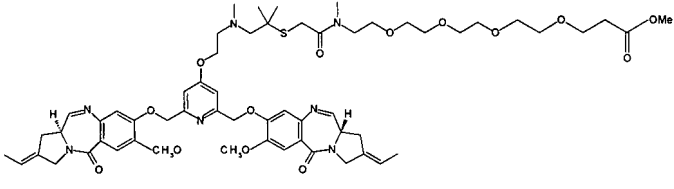
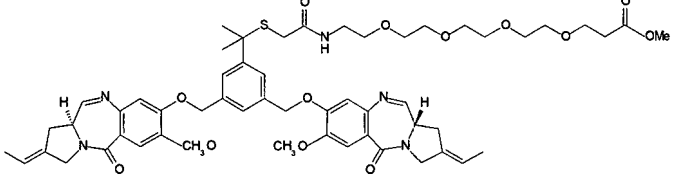
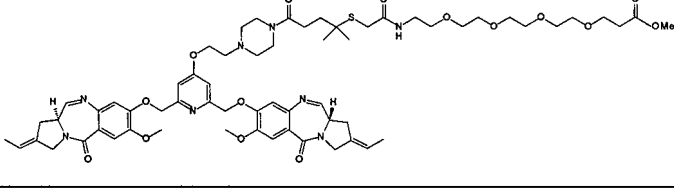
A una disolución de 520 mg de ácido 3-[2-(2-[2-[2-(ter-butoxicarbonil-amino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propanoico en 14 mL de THF enfriado a 0°C, se le añaden en porciones 85,4 mg de NaH. Después de 5 minutos de agitación, se le añaden 150 μ L de yodometano. La mezcla se agita entonces durante 2 horas a TA y a continuación se le añaden 150 μ L de yodometano suplementarios. Después de 12 horas a TA, la mezcla se hidroliza y a continuación se lleva a pH ácido por adición de ácido acético acuoso a 0°C. La fase acuosa se extrae 3 veces con AcOEt, las fases orgánicas se reúnen y se secan sobre MgSO₄, se concentran a PR y el producto bruto obtenido se vuelve a hacer reaccionar según el mismo protocolo con 85 mg de NaH y 176 μ L de yodometano durante 2 horas suplementarias. Se obtienen así 500 mg de ácido 3-[2-(2-[2-[2-(ter-butoxicarbonil-metil-amino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propanoico. LC/MS (F): tr = 1,01 min; [M+H]⁺: m/z 380.

Evaluación de la inhibición de la proliferación de las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-A1 y HCT116 por los compuestos de fórmula (IA) con Z_bR_b= -OMe y Y=Y'= -OMe

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 mM 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 pozos Cytostar (GE Healthcare Europe, #RPNQ0163) en el medio de cultivo completo que contiene suero a una densidad de 5000 células/pozo (MDA-MB-231, MDA-A1, HCT116). Después de 4 horas de incubación, se añaden diluciones sucesivas de los dímeros de tomamicina en los pozos por triplicado para cada concentración. Se cultivan las células durante 3 días a 37°C en una

atmósfera de CO₂ al 5% en presencia de citotóxicos. El cuarto día, se añaden a cada pozo 10 µL de una solución de timidina ¹⁴C (0,1 µCi/pozo, 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 citotóxico y el obtenido con las células de los pozos de control (tratados con el medio de cultivo solo).

Tabla II

Inhibición de la proliferación (pulso de ¹⁴ C timidina a las 96 horas)	IC50 [nM]		
Estructura del compuesto de fórmula (IA)	HCT116	MDA-A1	MDA-MB231
	0,030	1,991	0,009
	0,120	2,260	0,070
	0,127	>10	0,084
	1,250	>10	0,450

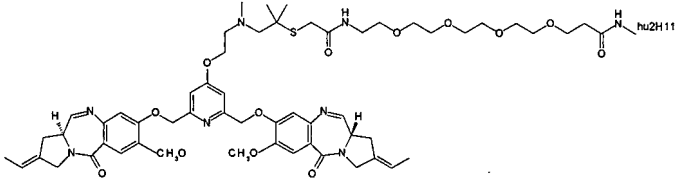
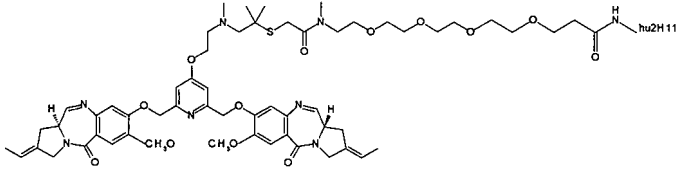
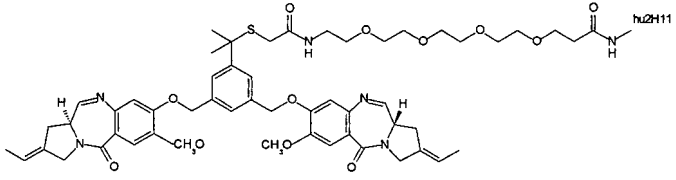
Se constata que los compuestos ensayados para los que Z_bR_b = -OMe tienen una actividad anticancerosa potente; esto hace pensar que los compuestos similares caracterizados por otro grupo Z_bR_b son susceptibles de presentar una actividad idéntica.

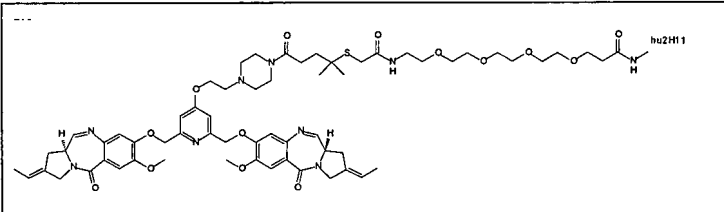
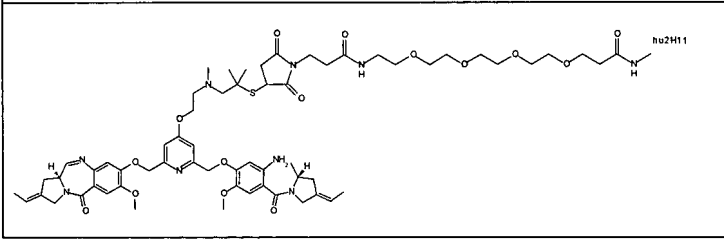
Evaluación de la inhibición de la proliferación de las líneas celulares MDA-MB-231 por los conjugados de hu2H11-citotóxico

Las células MDA-MB-231, MDA-A1 o HCT116 en su fase de crecimiento exponencial se tripsinan

y se ponen en suspensión en su medio de cultivo (DMEM/F12 Gibco #21331, SVF al 10 % Gibco #10500-056, Glutamina 2nM Gibco #25030). La suspensión celular se siembra en placas de cultivo de 96 pozos Cytostar (GE Healthcare Europe, #RPNQ0163) en el medio de cultivo completo que contiene suero con una densidad de 5000 células/pozo. Después de 4 horas de incubación, se añaden a los pozos diluciones sucesivas de los inmunoconjugados anticuerpo-citotóxico con 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 inmunoconjugados anticuerpo-citotóxico durante 3 días. El cuarto día, se añaden a cada pozo 10 µL de una solución de timidina ¹⁴C (0,1 µCi/pozo, 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 inmunoconjugado y el obtenido con las células de los pozos de control (tratados con el medio de cultivo solo). En algunos experimentos, se ha añadido el anticuerpo desnudo a los pozos con una concentración de 1µM al principio del experimento y la inhibición de la proliferación ha sido medida como se ha descrito precedentemente.

Tabla III

Inhibición de la proliferación (pulso de ¹⁴ C timidina a las 96 horas)	IC50 [pM]		
Estructura	IC50 media	IC50 media (+hu2H11 desnudo*)	relación entre las IC50
 conjugado C2	31	540	17
	910	5095	6
	54	3981	74

	1255	9125	7
	68,5	1119	16

Estabilidad monomérica de los conjugados de los dímeros de tomaimicina no escindibles

Los conjugados de hu2H11 no escindibles preparados con dímeros de la tomaimicina descritos en los ejemplos 3 y 5 de la solicitud internacional **WO 09016516** tienden a que su pureza monomérica disminuya con el tiempo después de varios meses de almacenamiento a 3-5°C. En efecto, estos conjugados, formulados en una disolución tampón acuosa a pH 6,5 de concentración 10mM en histidina que contiene 10% de sacarosa y 5% de NMP, presentan una media de 3 a 3,5 dímeros de tomaimicina por molécula de anticuerpo, de pureza monomérica inicial del orden de 97,5%, pueden perder de 6 a 15% de pureza monomérica en 6 a 8 meses. Este fenómeno no ha sido observado con el conjugado del ejemplo 2 que, con una media de 3,5 dímeros de tomaimicina por molécula de anticuerpo, conserva una pureza monomérica superior a 99% tras 4 meses en las mismas condiciones de almacenamiento, sugiriendo así una mejor estabilidad de este conjugado particular. Se trata de un objetivo general buscado en el campo de los conjugados el de poder disponer de un conjugado que conserve una pureza monomérica a lo largo del tiempo.

Evaluación de la actividad antitumoral de los conjugados de hu2H11-citotóxico en ratones SCID hembra portadores de un adenocarcinoma humano avanzado de mama, MDA-MB-231

Se han evaluado dos conjugados del mismo anticuerpo hu2H11, denominados C1 (preparado con el dímero de tomaimicina descrito en el ejemplo 5 de la solicitud internacional **WO 09016516**) y C2 (conjugado del ejemplo 2), a 4 niveles de dosis sobre tumores de mama medibles MDA-MB-231 implantados s. c. en ratones SCID hembra. Los grupos de control no han sido tratados. Las dosis de los dos conjugados se dan en µg de dímero de tomaimicina/kg. Han sido administradas a 80, 40, 20 y 10 µg/kg por inyección del tipo bolo intravenoso (IV) en el día 13 para C1 y en el día 24 para C2.

En lo que se refiere a la evaluación de la actividad antitumoral de los conjugados, los animales se han pesado diariamente y se han medido los tumores 2 veces por semana por medio de un

calibre. La evaluación de la actividad antitumoral se ha realizado a la Dosis Máxima Tolerada (DMT). Una dosis que induce una pérdida de peso del 20% a la concentración más baja o 10% (o más) de mortalidad relacionada con el conjugado se considera como tóxica. El peso corporal de los animales incluye el peso de los tumores. El peso de los tumores se calcula según la fórmula: masa (mg) = [longitud (mm) × anchura (mm)²]/2. Los parámetros de eficacia son el $\Delta T/\Delta C$, el porcentaje medio de regresión, las regresiones parciales y completas (RP y RC) y el número de ratones sin tumor al final del estudio (RST).

La evolución del volumen de los tumores para cada ratón tratado (T) y control (C) se calcula para cada tumor por sustracción del volumen del tumor el día del inicio del estudio al volumen del tumor el día de la observación específica. La media ΔT se calcula para el grupo tratado y la media ΔC se calcula para el grupo de control. A continuación se calcula la relación $\Delta T/\Delta C$ y se expresa en porcentaje: $\Delta T/\Delta C = (\text{delta } T/\text{delta } C) \times 100$

Se considera que una dosis es terapéuticamente activa para un valor de $\Delta T/\Delta C$ inferior a 40% y muy activa para un valor de $\Delta T/\Delta C$ inferior a 10%. Cuando el valor de $\Delta T/\Delta C$ es inferior a 0, la dosis se considera altamente activa y entonces se calcula el porcentaje de regresión (según Plowman J, Dykes DJ, Hollingshead M, Simpson-Herren L y Alley MC. *Human tumor xenograft models in NCI drug development: Feibig HH BA, editor. Basel: Karger.; 1999 p 101-125*):

El **porcentaje de regresión tumoral** se define como el porcentaje de disminución del volumen tumoral en el grupo tratado el día de la observación específica en comparación con su volumen el primer día de tratamiento. A un tiempo t específico y para cada animal, se calcula el porcentaje de regresión tumoral. Entonces se calcula el porcentaje de regresión medio para el grupo.

$$\text{Porcentaje de regresión (al tiempo } t) = \frac{\text{volumen}_{t_0} - \text{volumen}_t}{\text{volumen}_{t_0}} \times 100$$

Regresión parcial (RP): Las regresiones se definen como parciales cuando la disminución del volumen tumoral alcanza el 50% del volumen del tumor al principio del tratamiento.

Regresión completa (RC): La regresión completa se obtiene cuando el volumen del tumor = 0 mm³ (se considera que se está en presencia de una RC cuando el volumen del tumor no se puede medir).

RST: Los ratones sin tumor se definen como los ratones que no presentan tumor detectable al final del estudio (más allá de 100 días de tratamiento).

Tabla IV – Evaluación de la actividad antitumoral de los conjugados C1 y C2 en ratones SCID hembra portadores de un adenocarcinoma humano avanzado de mama, MDA-MB-231.

Conjugado	Via de administración/Dosis en mL/kg por inyección	Dosis en µg/kg de dímero de tomimicina (mg prot/kg)	Día de administración	Mortalidad	Pérdida de peso media en % a la concentración mínima (día)	ΔT/ΔC media en % (día)	Porcentaje de regresión media (día)	Regresiones		RST: (día 120)	Interpretación biológica
								Parcial	Completa		
C1	IV	80 (3,76)	13	5/5	-	-	-	-	-	-	Tóxico
DAR 2,9	10 mL/kg	40 (1,88)		0/5	-9,6 (20)	7 (28)	-	3/5	0/5	0/5	DMT, muy activo
		20 (0,94)		0/5	-3,5 (30)	13 (28)	-	0/5	0/5	0/5	Activo
		10 (0,47)		0/5	-1,1 (27)	23 (28)	-	0/5	0/5	0/5	Activo
C2	IV	80 (2,98)	24	4/6	-	-	-	-	-	-	Tóxico
DAR 3,5	10 mL/kg	40 (1,49)		0/6	5,0 (31)	<0 (46)	96,2 (46)	6/6	1/6	1/6	DMT, altamente activo
		20 (0,75)		0/6	4,4 (31)	<0 (46)	66,4 (46)	4/6	0/6	0/6	Altamente activo
		10 (0,37)		0/6	4,0 (31)	14 (46)	-	0/6	0/6	0/6	Activo

Abreviaciones: DMT = Dosis Máxima Tolerada, RST = Ratón sin tumor al final del estudio

Según un esquema de administración de dosis única, se ha demostrado que la dosis mayor ensayada para estos dos conjugados en este estudio (80 µg/kg) es tóxica, induciendo pérdida de peso y mortalidad.

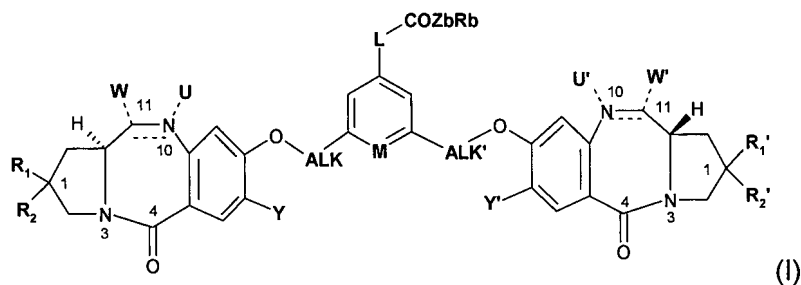
- 5 A la DMT (40 µg/kg), C1 es muy activo e induce una pérdida de peso de 9,6% con la concentración más baja, un $\Delta T/\Delta C$ de 7% y 3 RP para 5 ratones SCID. También se ha observado actividad antitumoral a dosis más pequeñas de 20 y 10 µg/kg sin inducir RP.

- 10 A la DMT (40 µg/kg), C2 es altamente activo e induce una pérdida de peso de 5% con la concentración más baja, una regresión tumoral de 96,2% con 6 RP para 6 ratones, de los que 1 fue RST. Igualmente es muy activo a la dosis inferior de 20 µg/kg con una regresión tumoral de 66,4% y 4 RP para 6 ratones. También se ha observado una actividad antitumoral para la dosis más baja de 10 µg/kg sin inducir, sin embargo, regresión o RP.

- 15 En conclusión, se constata que C2 presenta una actividad anticancerosa grande y ha demostrado una mejor actividad que C1 con una regresión tumoral, RP y RST a la DMT, no observados con C1 a las mismas dosis.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



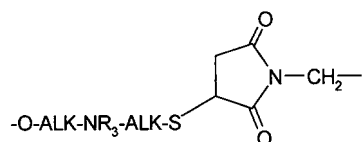
en la que:

- --- representa un enlace sencillo o un enlace doble con la condición de que si --- representa un enlace sencillo, entonces:
 - ❖ --- representa un enlace sencillo;
 - ❖ **U** y/o **U'**, idénticos o diferentes, representan independientemente el uno del otro, H;
 - ❖ **W** y/o **W'**, idénticos o diferentes, representan independientemente el uno del otro, OH, -OR, -OCOR, -COOR, -OCOOR, -OCONRR', un carbamato cíclico tal que N10 y C11 estén incluidos en un ciclo, -NRCONRR', -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 estén incluidos en un ciclo, -SH, -SR, -SOR, -SOOR, -SO₃⁻, -NRSOOR', -NRR', una amina cíclica tal que N10 y C11 estén incluidos en un ciclo, -NROR', -NRCOR', -N₃, -CN, Hal, un grupo triarilfosfonio o triarilfosfonio;
- **R₁**, **R₂**, **R₁'**, **R₂'**, idénticos o diferentes, representan independientemente uno del otro: H, Hal o un grupo alquilo (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes elegidos entre: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo, S(O)_qR siendo q = 0, 1 ó 2;

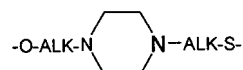
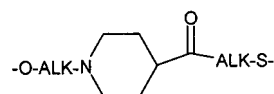
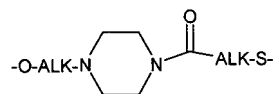
o bien:

- **R₁** y **R₂** y/o **R₁'** y **R₂'** forman juntos respectivamente un enlace doble =CH₂ o =CH-CH₃;
- **Y** e **Y'**, idénticos o diferentes, representan independientemente uno del otro H u OR;
- **M** representa CH o N;
- **ALK** y **ALK'**, idénticos o diferentes, representan independientemente uno del otro un grupo alquileo (C₁-C₆);
- **R** y **R'** representan, independientemente uno del otro, H o un grupo alquilo (C₁-C₆) o arilo opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes elegidos entre: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo;
- **L** representa:
 - ❖ el grupo -L₁-L₂- en el que L₁ está unido al ciclo aromático que comprende **M** por el grupo ALK u OALK y representa uno de los grupos siguientes:

-ALK-S-



-O-ALK-NR₃-ALK-S-

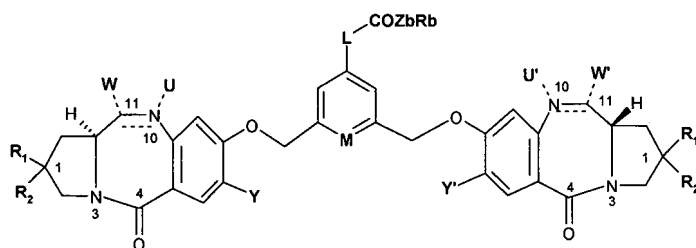


y **L₂** representa el grupo -CH₂C(=O)-NR₃-(CH₂CH₂O)_i-ALK- unido a **L₁** por -CH₂C(=O)- o bien:

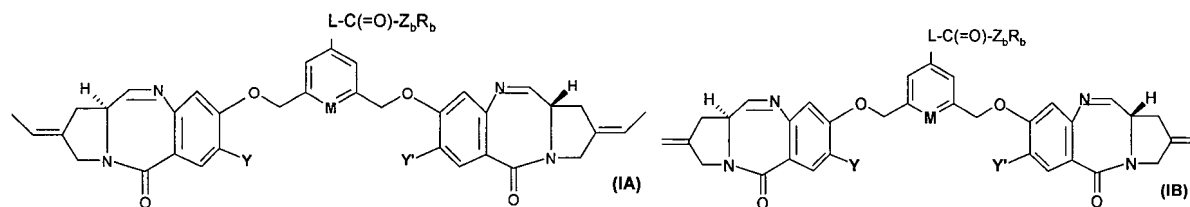
❖ el grupo -O-ALK-NR₃-ALK-S-(CH₂CH₂O)_i-ALK- unido al ciclo aromático que comprende **M** por el grupo OALK;

- **R₃** representa H o un grupo alquilo (C₁-C₆);
- **i** representa un número entero que va de 1 a 40, mejor de 1 a 20, preferentemente de 1 a 10;
- **Z_b** representa un enlace sencillo, -O- o -NH-, representando **R_b** H o un grupo alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₇), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo (C₃-C₇) o bien **Z_b** representa un enlace sencillo y **R_b** representa Hal.

2. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:

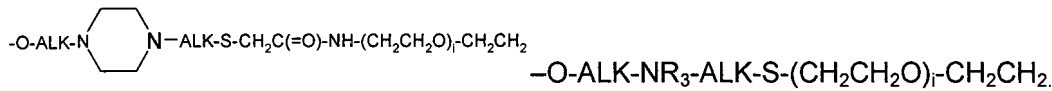
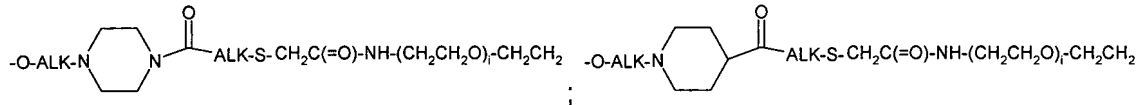
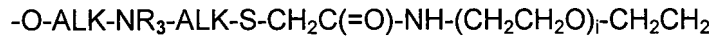
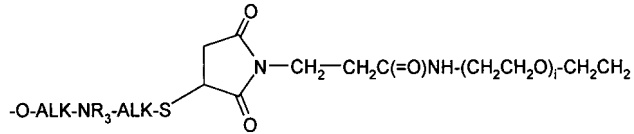
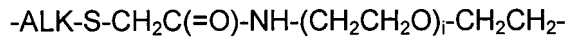


3. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula (IA) o (IB):

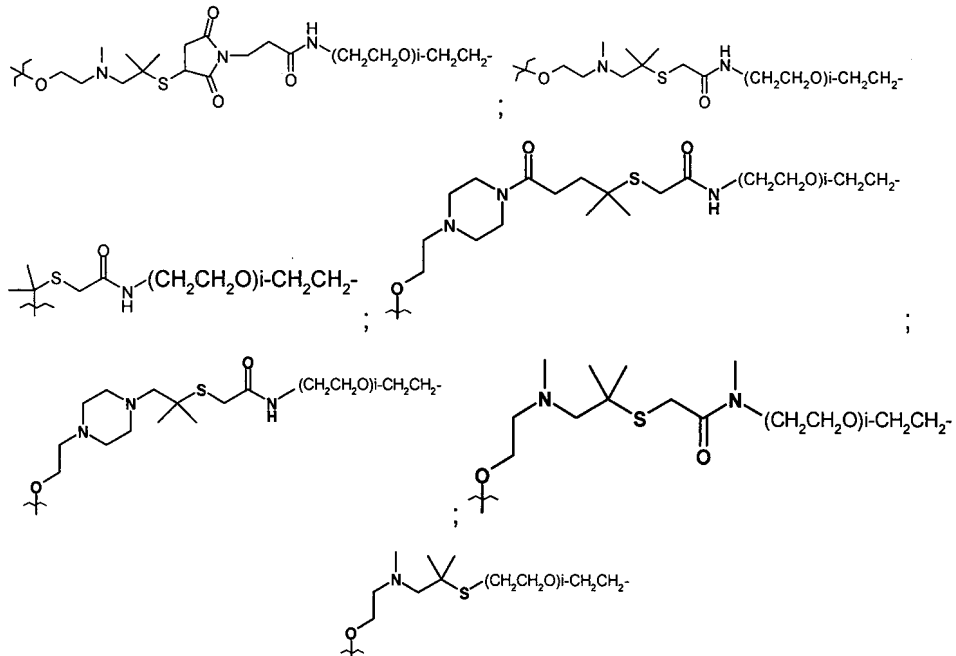


4. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 3 en el que Y e Y' representan un grupo alcoxi (C₁-C₄), más particularmente metoxi.

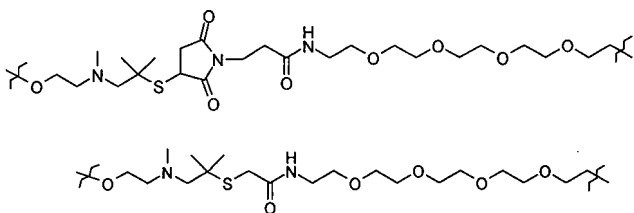
5. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 4 en el que L se elige entre:

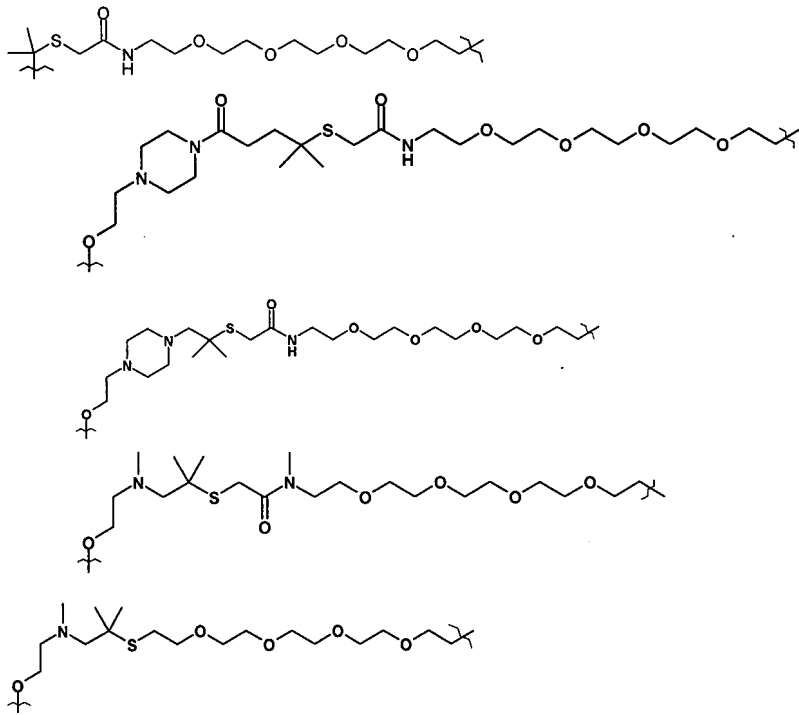


6. Compuesto según la reivindicación 1 ó 5 en el que L se elige entre:

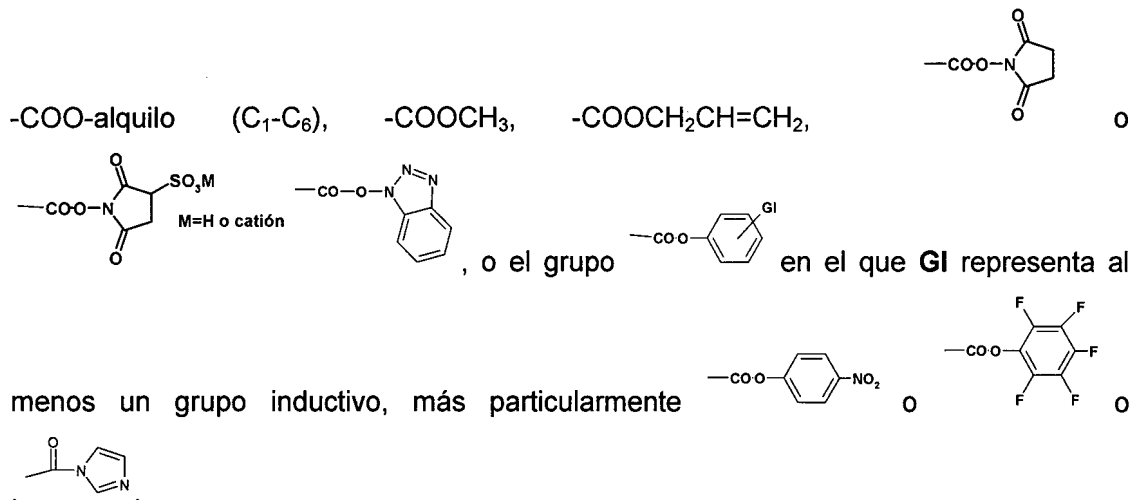


7. Compuesto según la reivindicación 1 ó 5 en el que L se elige entre:

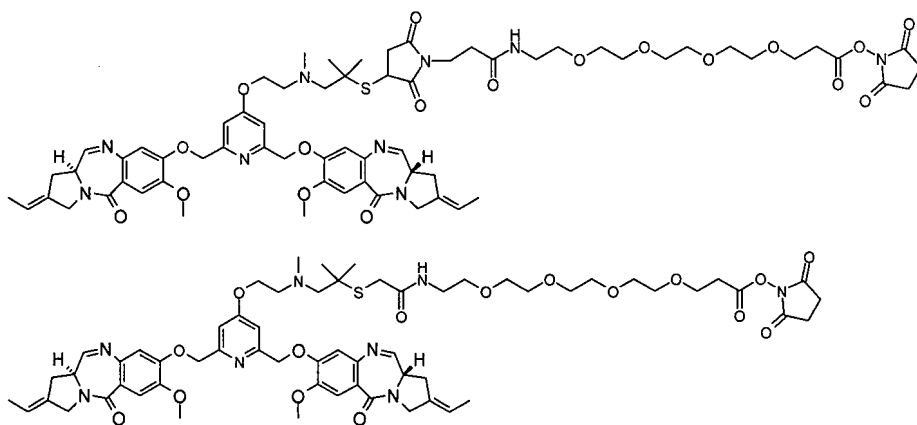


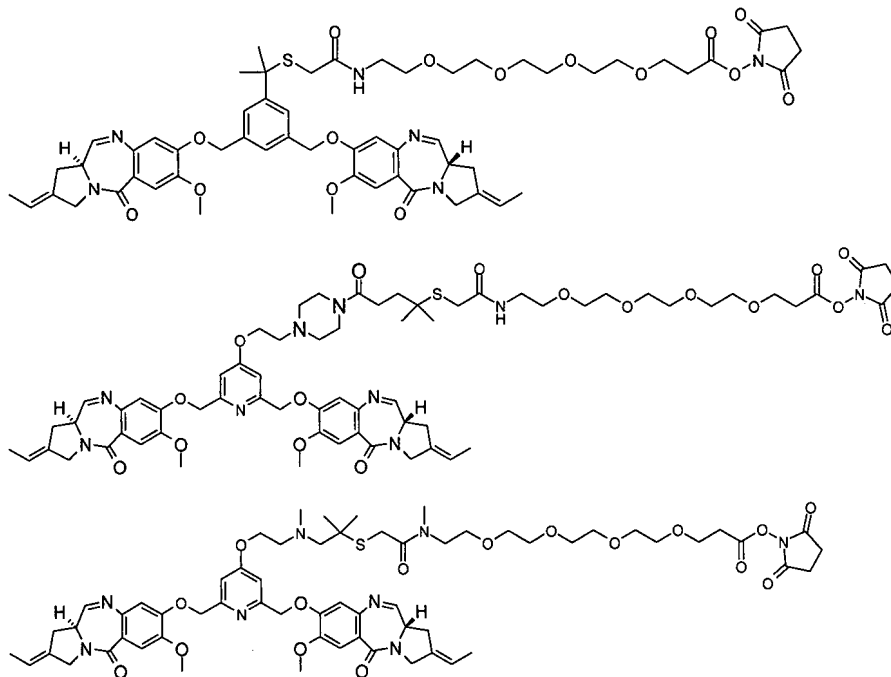


8. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 7 en el que $-\text{COZ}_b\text{R}_b$ representa $-\text{COOH}$,



9. Compuesto según la reivindicación 1 elegido entre uno de los siguientes:



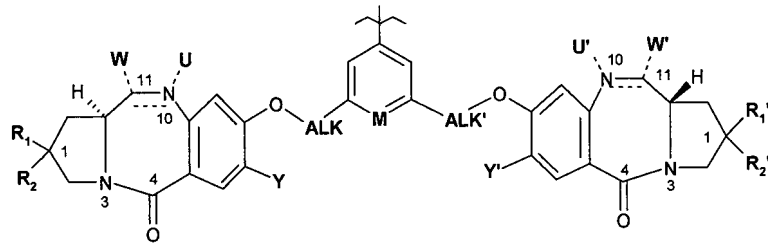


10. Procedimiento de preparación de un conjugado, que consiste en:
- (i) poner en contacto y dejar reaccionar una disolución acuosa de un agente de selección, eventualmente tamponada, y una disolución de un compuesto tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 9;
 - (ii) después separar opcionalmente el conjugado formado en la etapa (i) del compuesto de fórmula (I) y/o del agente de selección que no haya reaccionado y/o de los agregados que se hayan formado.
11. Procedimiento según la reivindicación 10 en el que el grupo $-C(=O)Z_bR_b$ es reactivo frente a los grupos químicos presentes en el agente de selección, principalmente frente a los grupos amino presentes en un anticuerpo, de forma que se asegura la unión del compuesto de fórmula (I) con el agente de selección por formación de un enlace covalente.
12. Procedimiento según las reivindicaciones 10 a 11 en la que la etapa (ii) consiste en:
- separar el conjugado que se forma en la etapa (i) del agente de selección que no ha reaccionado y de los agregados opcionalmente presentes en la disolución;
 - o bien:
 - no separar el conjugado de la etapa (i) más que del compuesto de fórmula (I) que no haya reaccionado y de los agregados que se hayan formado y dejar en la disolución el agente de selección que eventualmente no haya reaccionado.

13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el agente de selección es un ligando, una proteína, un anticuerpo, más particularmente monoclonal, un fragmento de proteína o de anticuerpo, un péptido, un oligonucleótido o un oligosacárido.
14. Procedimiento según las reivindicaciones 10 a 13 en el que la reacción tiene lugar a una temperatura comprendida entre 20 y 40°C y/o la duración de la reacción varía entre 1 y 24 h.
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 14 en el que después de la etapa (i) o (ii), la disolución del conjugado experimenta una etapa (iii) de ultrafiltración y/o de diafiltración.
16. Un conjugado susceptible de ser obtenido por el procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 15.
17. Conjugado según la reivindicación 16, en el que el agente de selección es un anticuerpo, preferentemente monoclonal, caracterizado por una DAR media comprendida entre 1 y 10, preferentemente entre 1,5 y 7.
 calculándose el DAR por la ecuación $DAR = c_D/c_A$
 donde :

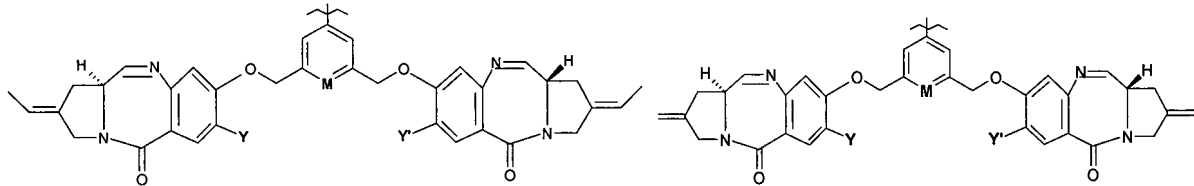
$$c_D = [(e_{A\ LO1} \times A_{LO2}) - (e_{A\ LO2} \times A_{LO1})] / [(e_{D\ LO2} \times e_{A\ LO1}) - (e_{A\ LO2} \times e_{D\ LO1})]$$

$$c_A = [A_{LO1} - (c_D \times e_{D\ LO1})] / e_{A\ LO1}$$
 donde A_{LO1} y A_{LO2} indican las absorbancias de una disolución acuosa del conjugado a las longitudes de onda LO1 y LO2, medidos en el pico correspondiente del espectro de SEC.
 $e_{D\ LO1}$ y $e_{D\ LO2}$ indican respectivamente los coeficientes de absorción molares del dímero de la pirrolo[1,4]benzodiazepina antes de la conjugación a las longitudes de onda LO1 y LO2 ;
 $e_{A\ LO1}$ y $e_{A\ LO2}$ indican respectivamente los coeficientes de absorción molares del anticuerpo desnudo a las dos longitudes de onda LO1 y LO2,
 LO1= 280 nm y LO2= 320 nm.
18. Utilización de un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 9 para la preparación de un agente de selección al que esté unido de forma covalente, en la posición para- de M, el dímero de fórmula:



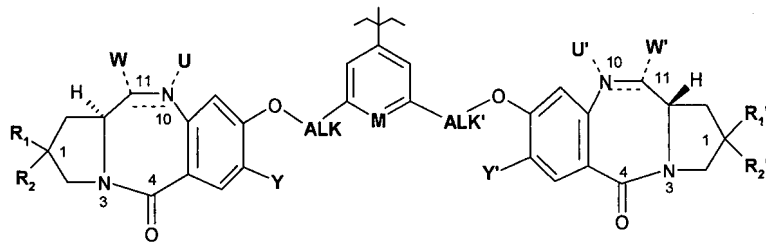
19. Utilización según la reivindicación 18 en la que el agente de selección es un anticuerpo, preferentemente monoclonal.

20. Utilización según la reivindicación 18 ó 19 en la que el dímero tiene por fórmula:



21. Utilización según las reivindicaciones 18 a 20 en el que Y e Y' representan un grupo alcoxi (C₁-C₄), más particularmente metoxi.

22. Agente de selección al que se ha unido de forma covalente en la posición para- de M el dímero de fórmula:



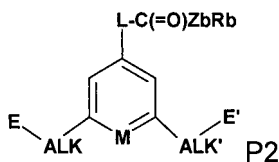
después de la reacción de un compuesto tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 9 con el agente de selección.

23. Agente de selección según la reivindicación 22 en la que el dímero es tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 20 ó 21.

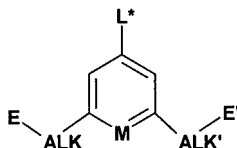
24. Agente de selección según la reivindicación 23 que presenta afinidad por un antígeno o grupo de antígenos localizado en células cancerosas o células estromales asociadas a un tumor.

25. Agente de selección según las reivindicaciones 22 a 24 que es un anticuerpo, preferentemente monoclonal.

26. Disolución de conjugado susceptible de ser obtenido por el procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 15.
27. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 9 para usarlo como compuesto anticanceroso.
28. Conjugado según la reivindicación 16 ó 17 para usarlo como compuesto anticanceroso.
29. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o bien un conjugado según la reivindicación 16 ó 17 así como al menos un excipiente.
30. Utilización de un compuesto de fórmula P₂:



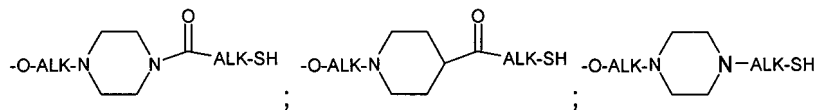
o bien un compuesto de fórmula:



en la que L* se elige entre:

-ALK-SH;

-O-ALK-NR₃-ALK-SH;



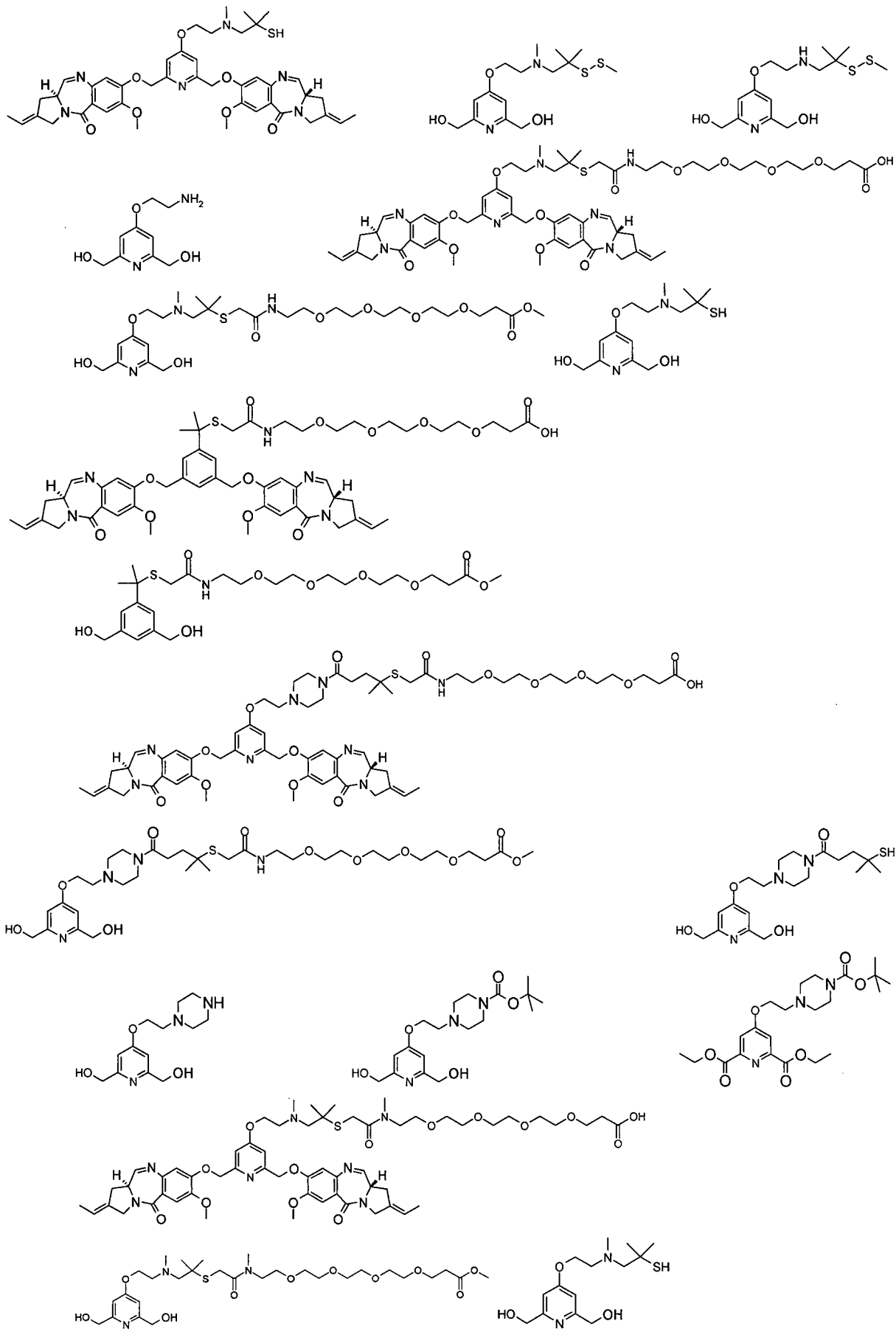
fórmulas en las que :

- L, M, ALK, ALK', R₃, Z_b y R_b son tales como se han definido en una de las reivindicaciones 1 a 9;
- E y E' representan, independientemente uno del otro, un grupo -OH o un grupo saliente.

como intermedio para la preparación de un compuesto de fórmula (I) tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 9.

31. Utilización según la reivindicación 20 en la que el grupo saliente se elige entre un átomo de halógeno, un grupo mesilato, tosilato, nosiltao o -OPPh₃⁺.

32. Utilización de un compuesto elegido entre uno de los siguientes:



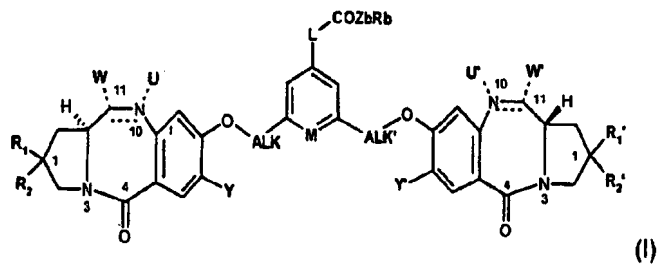
entendiéndose que la función terminal $-\text{COOH}$ puede ser remplazada por una función terminal $-\text{COO-alkilo}$ ($\text{C}_1\text{-C}_6$), principalmente $-\text{COOMe}$, y que la función terminal $-\text{SH}$ puede ser remplazada por una función disulfuro, principalmente $-\text{SSMe}$,

como intermedio para la preparación de un compuesto de fórmula (I) tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 9.

33. Utilización de un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 9 para la fabricación de un medicamento anticanceroso.
34. Utilización de un conjugado según las reivindicaciones 16 ó 17, para la preparación de un medicamento anticanceroso.

Resumen:

La invención se refiere a nuevos conjugados de dímeros de la pirrolo[1,4]benzodiazepina que pueden ser utilizados como compuestos anticancerosos.



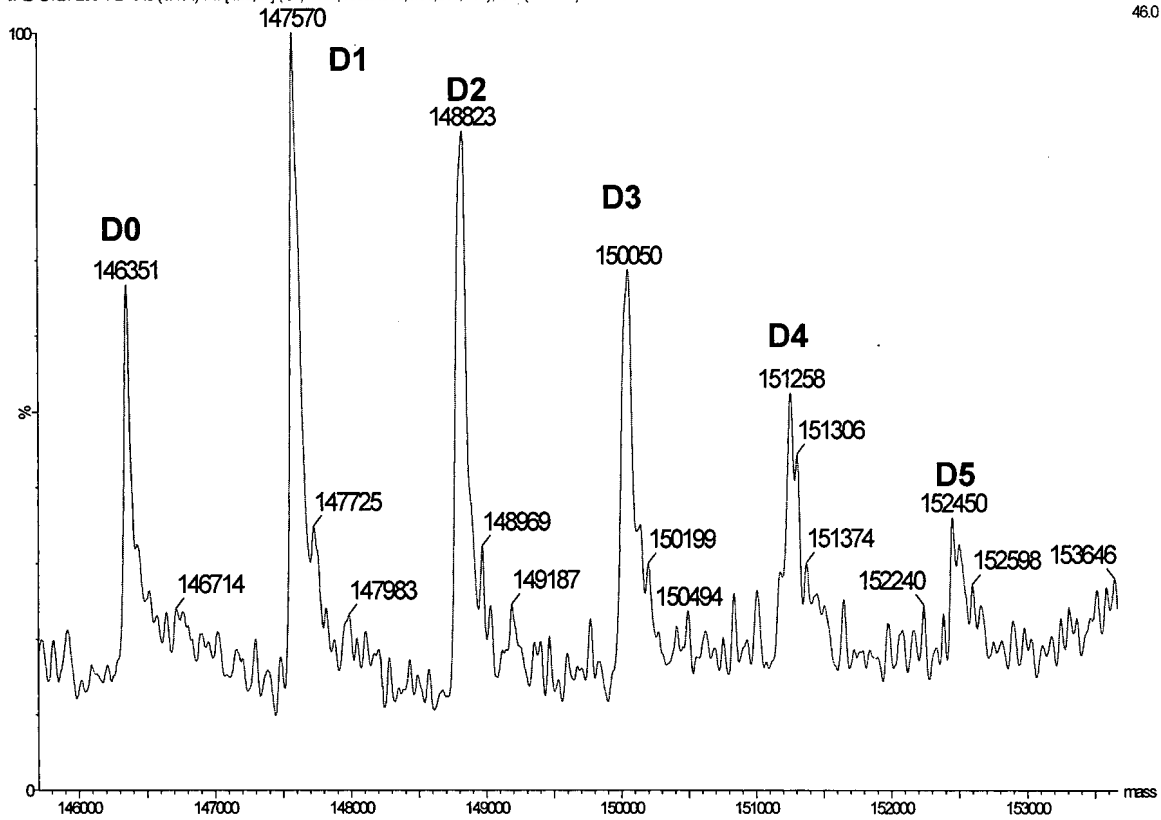


Fig. 2: Espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado del ejemplo 2 después de desglicosilación.

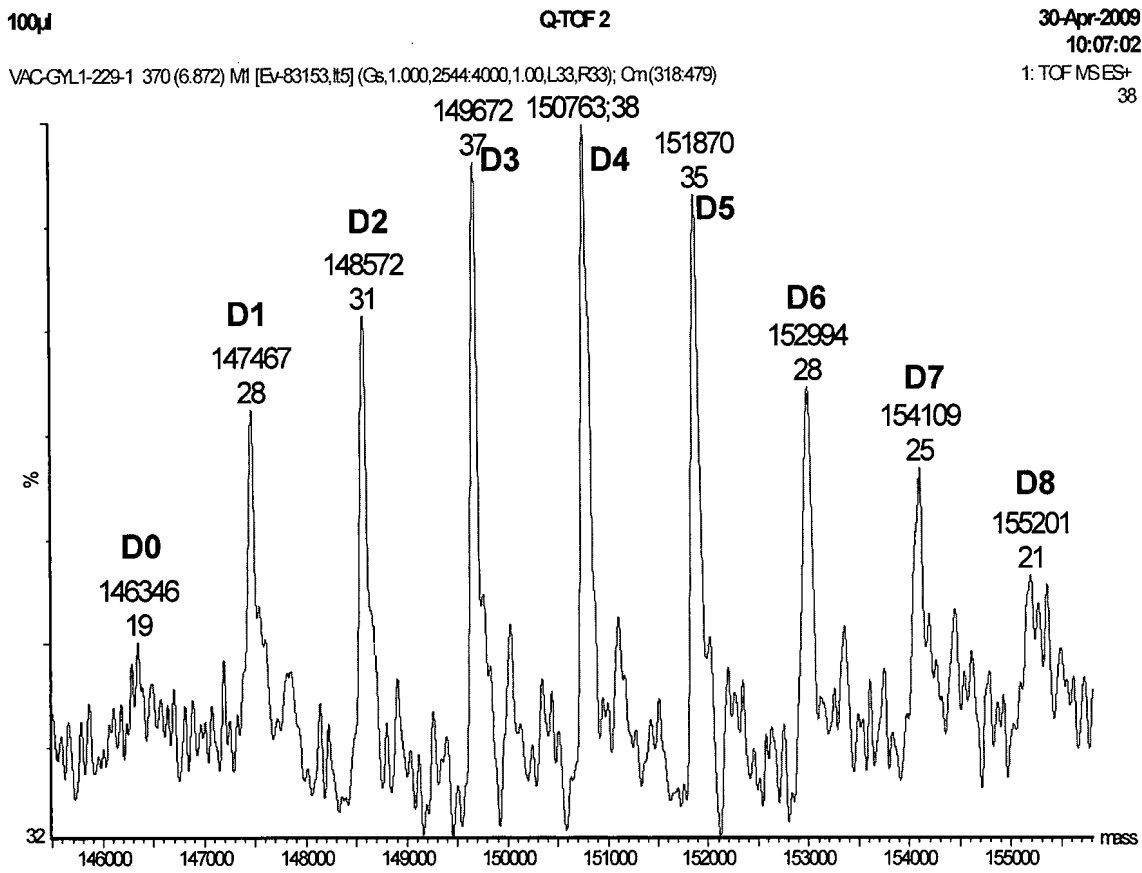


Fig. 3: Espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado del ejemplo 3 después de desglicosilación.

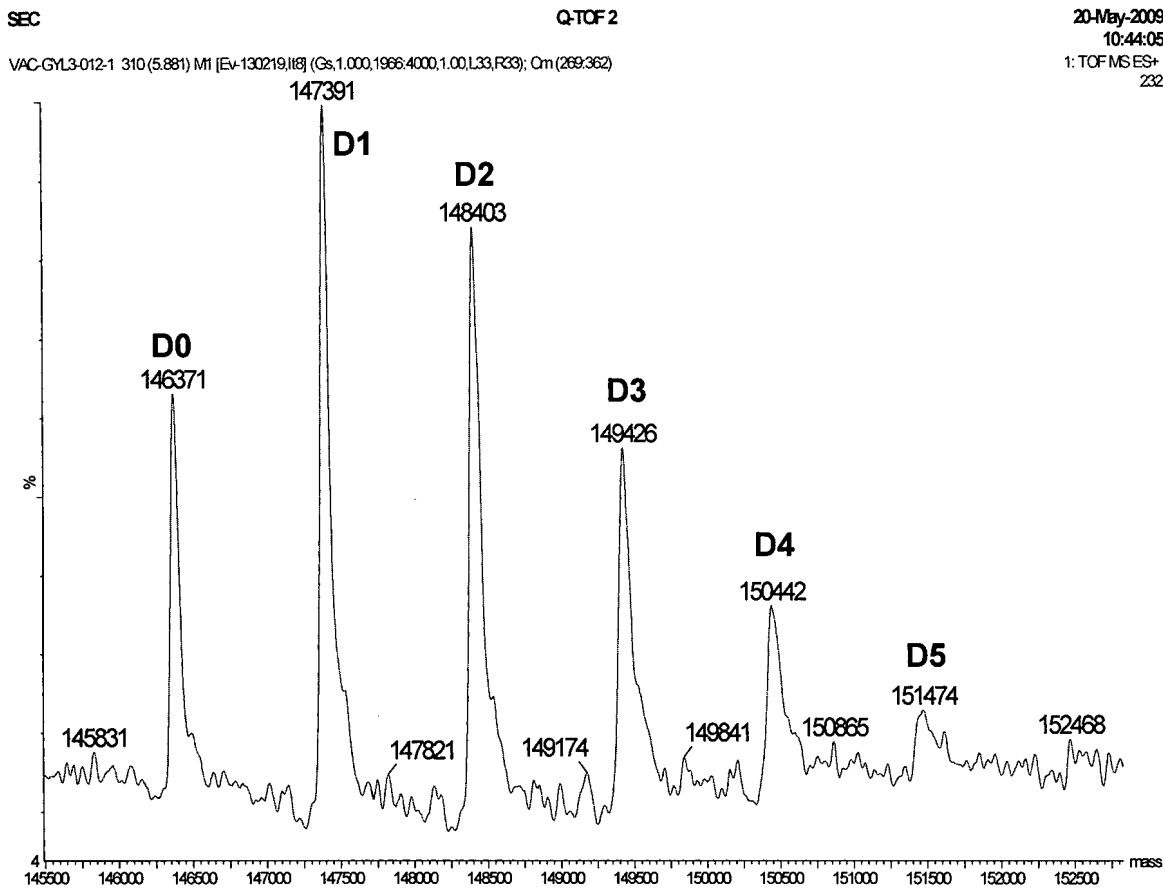


Fig. 4: Espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado del ejemplo 4 después de desglicosilación.

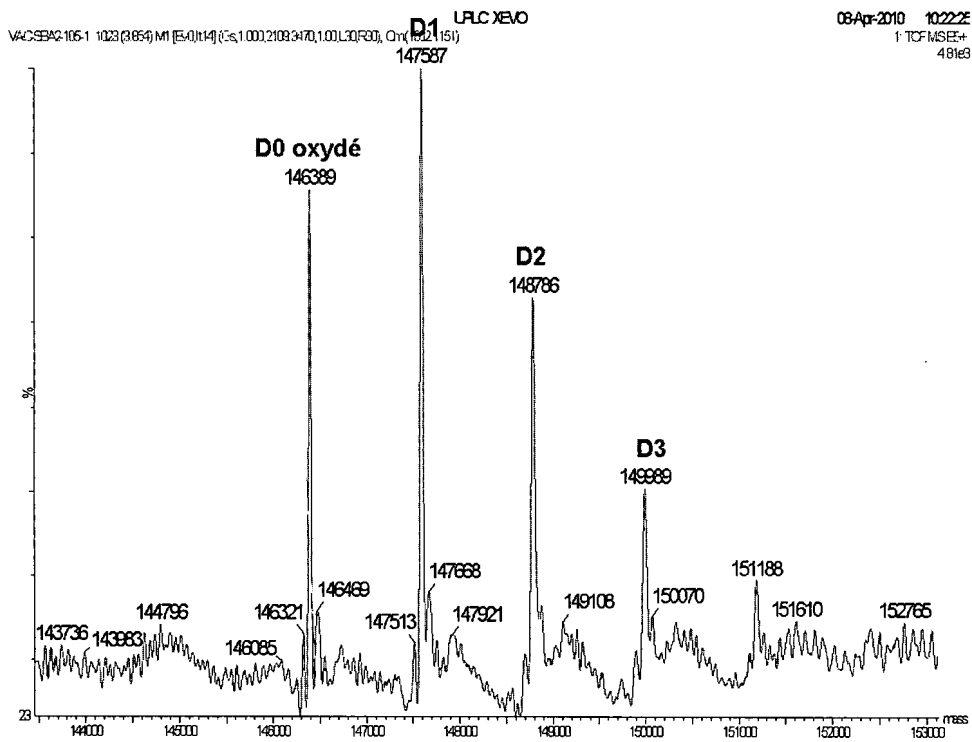
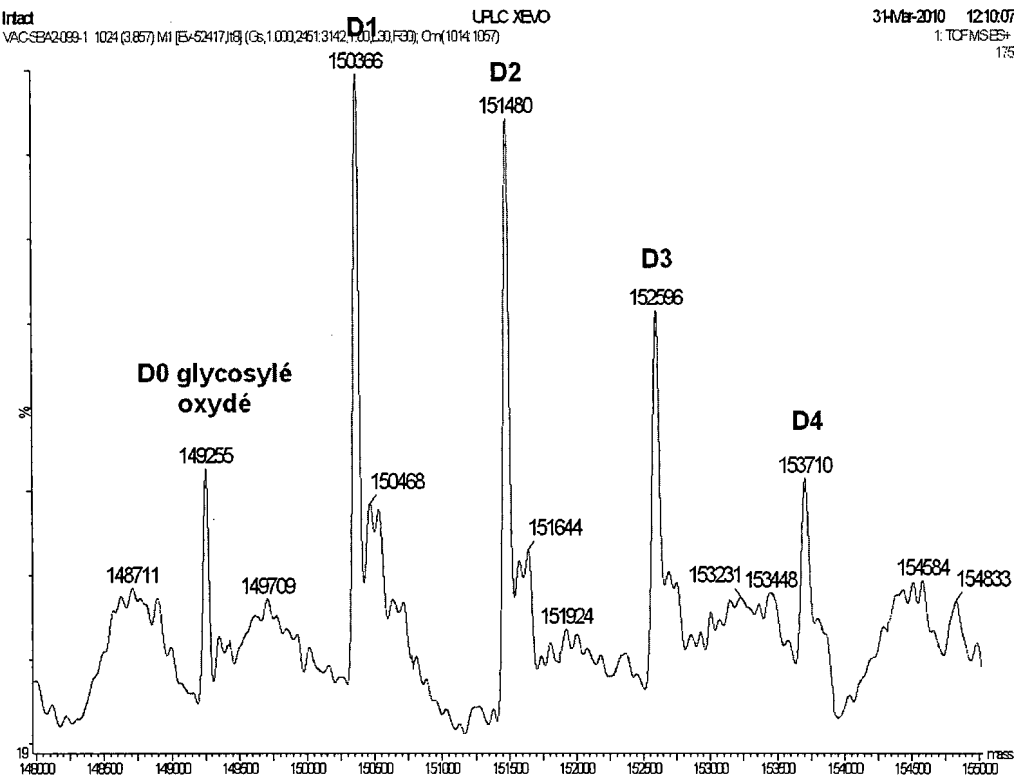


Fig. 5: Espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado no desglicosilado del ejemplo 6.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2010/051709

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D519/00 A61K31/551
ADD. A61P35/00

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 A61P

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, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/016516 A2 (SANOFI AVENTIS [FR]; BOUCHARD HERVE [FR]; CHARI RAVI V J [US]; COMMERC) 5 February 2009 (2009-02-05) cited in the application claim 1; compound (I)	1-34
A	WO 2007/085930 A1 (SANOFI AVENTIS [FR]; GAUZY LAURENCE [FR]; ZHAO ROBERT [US]; DENG YONGH) 2 August 2007 (2007-08-02) cited in the application claim 1; compound (I)	1-34

☐ 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

5 January 2011

Date of mailing of the international search report

12/01/2011

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

Fritz, Martin

86

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2010/051709

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009016516 A2	05-02-2009	AR 067575 A1	14-10-2009
		AU 2008281439 A1	05-02-2009
		CA 2693551 A1	05-02-2009
		CN 101784550 A	21-07-2010
		CR 11225 A	23-06-2010
		EA 201070163 A1	30-08-2010
		EC SP109875 A	26-02-2010
		EP 2019104 A1	28-01-2009
		EP 2170890 A2	07-04-2010
		JP 2010533703 T	28-10-2010
		KR 20100063021 A	10-06-2010
		PA 8790201 A1	09-02-2009
		PE 08892009 A1	06-08-2009
		US 2010316656 A1	16-12-2010
WO 2007085930 A1	02-08-2007	AR 059201 A1	19-03-2008
		AU 2007209072 A1	02-08-2007
		CA 2635482 A1	02-08-2007
		CN 101374846 A	25-02-2009
		DO P20070016 A	15-09-2007
		EA 200870193 A1	27-02-2009
		EC SP088632 A	29-08-2008
		EP 1813614 A1	01-08-2007
		EP 1981889 A1	22-10-2008
		JP 2009524636 T	02-07-2009
		KR 20080097435 A	05-11-2008
		PE 11102007 A1	21-12-2007
		US 2009036431 A1	05-02-2009
		ZA 200805649 A	25-11-2009

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2010/051709

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07D519/00 A61K31/551 ADD. A61P35/00		
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 A61P		
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, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 2009/016516 A2 (SANOFI AVENTIS [FR]; BOUCHARD HERVE [FR]; CHARI RAVI V J [US]; COMMERC) 5 février 2009 (2009-02-05) cité dans la demande revendication 1; composé (I)	1-34
A	WO 2007/085930 A1 (SANOFI AVENTIS [FR]; GAUZY LAURENCE [FR]; ZHAO ROBERT [US]; DENG YONGH) 2 août 2007 (2007-08-02) cité dans la demande revendication 1; composé (I)	1-34
☐ 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 "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 5 janvier 2011		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 12/01/2011
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 Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Fritz, Martin

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2010/051709

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2009016516 A2	05-02-2009	AR 067575 A1	14-10-2009
		AU 2008281439 A1	05-02-2009
		CA 2693551 A1	05-02-2009
		CN 101784550 A	21-07-2010
		CR 11225 A	23-06-2010
		EA 201070163 A1	30-08-2010
		EC SP109875 A	26-02-2010
		EP 2019104 A1	28-01-2009
		EP 2170890 A2	07-04-2010
		JP 2010533703 T	28-10-2010
		KR 20100063021 A	10-06-2010
		PA 8790201 A1	09-02-2009
		PE 08892009 A1	06-08-2009
		US 2010316656 A1	16-12-2010
WO 2007085930 A1	02-08-2007	AR 059201 A1	19-03-2008
		AU 2007209072 A1	02-08-2007
		CA 2635482 A1	02-08-2007
		CN 101374846 A	25-02-2009
		DO P20070016 A	15-09-2007
		EA 200870193 A1	27-02-2009
		EC SP088632 A	29-08-2008
		EP 1813614 A1	01-08-2007
		EP 1981889 A1	22-10-2008
		JP 2009524636 T	02-07-2009
		KR 20080097435 A	05-11-2008
		PE 11102007 A1	21-12-2007
		US 2009036431 A1	05-02-2009
		ZA 200805649 A	25-11-2009

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS PCT/FR2010/051709

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) 05 janvier 2012 (05.01.2012)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire FR2009/092	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale n° PCT/FR2010/051709	Date du dépôt international (jour/mois/année) 12 août 2010 (12.08.2010)

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

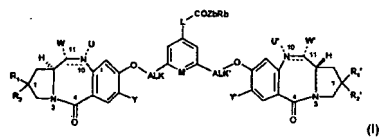
☒ à l'office récepteur	☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale	☒ aux offices désignés concernés
☐ [à l'] [aux] administration(s) indiquée(s) pour la recherche supplémentaire	☐ aux offices élus concernés
	☐ autre destinataire :

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Perez Reina Luis
n° de télécopieur +41 22 338 71 30	e-mail pt09.pct@wipo.int n° de téléphone +41 22 338 74 09

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:		(51) Int Cl: C07D 519/000	
22) Fecha de solicitud:		(71)Solicitante(s) SANOFI	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 0904043 0904368	(32) Fecha 25/08/2009 11/09/2009	(33) País FR FR
		(72) Inventor(es) ALAIN COMMERÇON LAURENCE GAUZY-LAZO	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 25/03/2012		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 03/03/2011	
Fecha de presentación de la solicitud: 12/08/2010		N° publicación: WO 2011/023883 A1	
No. de solicitud PCT/FR2010/051709			
(54) Título: CONJUGADOS DE DíMEROS DE PIRROLO[1,4]BENZODIAZEPINA COMO AGENTES ANTICANCEROSOS			

Resumen:

La invención se refiere a nuevos conjugados de dímeros de la pirrolo[1,4]benzodiazepina que pueden ser utilizados como compuestos anticancerosos.



SOBRE CON ARTE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0015902	
				Bogotá D.C., Febrero 16 de 2012 - 12:25:39	
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	157716543	16/02/2012	11.390.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO			Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN			590.000.00	590.000.00 ✓
					\$590.000.00
=====					
SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-029986- -00000-0000 Fecha: 2012-02-21 11:35:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 93					
Colo:00757-841-040-7.					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240 Febrero 16 de 2012 - 12:25:41					

93

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0011425	
				Bogotá D.C., Febrero 03 de 2012 - 17:08:17	
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	157716996	03/02/2012	40.200.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1613 TASA ANUAL A#OS 13 a 16 PARA MANTENIMINETO DE PATENTE D	720.000.00	720.000.00 ✓	
				\$720.000.00	
			=====		
SON: **SETECIENTOS VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: 					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-029986- -00000-0000 Fecha: 2012-02-21 11:35:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 93					
Colo: 00957-841-040-7 Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240 Febrero 3 de 2012 - 17:08:25					



No. 12-029986- -00000-0000

Fecha: 2012-02-21 11:35:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 93

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE I

- ☐ 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 ☐