



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-013434-00000-0000

Fecha: 2013-01-24 16:49:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378, FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 99

Indus

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____
DERIVADOS ANTICANCEROSOS, SU PREPARACION Y SU
APLICACION TERAPEUTICA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE SANOFI

DOMICILIO PARIS, FRANCIA

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-013434- -00000-0000

Fecha: 2013-01-24 16:49:34

Tra: 11 PATENTEIYII

Act: 411 PRESENTACION

Dep: 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 99

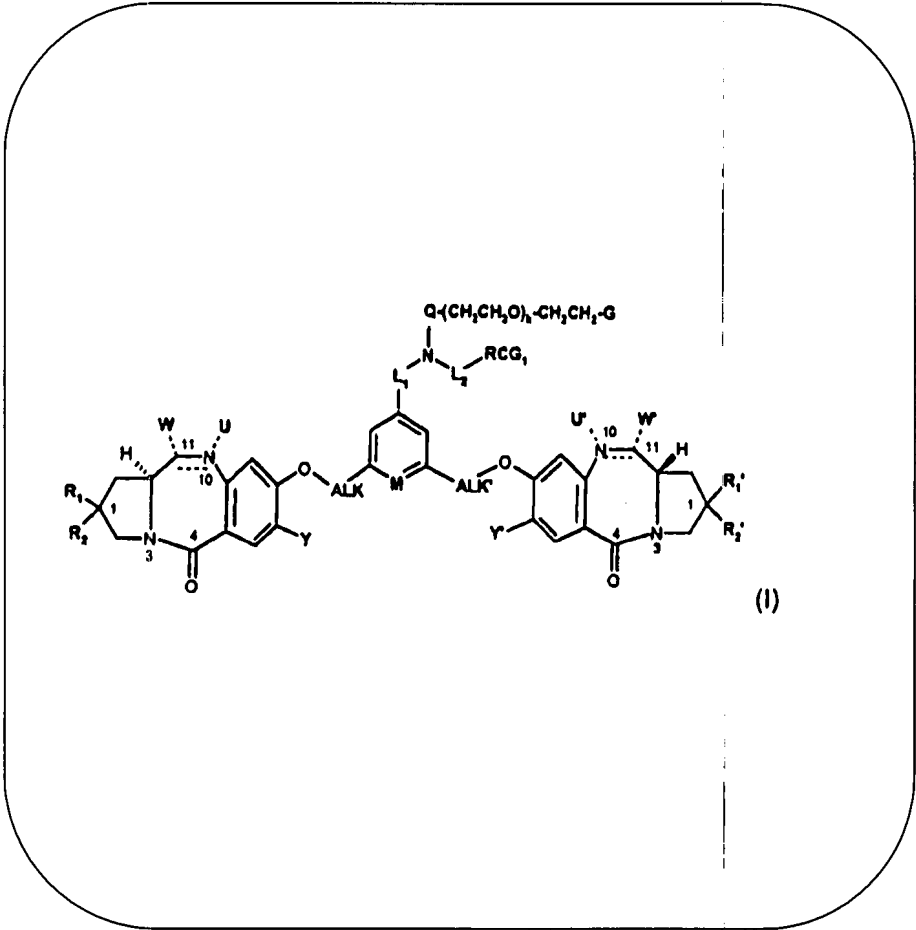
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/IB2011/053310	Fecha 2011/07/25
Publicación Internacional No.		WO 2012/014147 A1	Fecha 2012/02/02
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
DERIVADOS ANTICANCEROSOS, SU PREPARACIÓN Y SU APLICACIÓN TERAPÉUTICA			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A61P 035/000, C07D 487/004			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
SANOFI			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		54 rue La Boétie,	No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD		Paris 75008	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
DEPARTAMENTO/ESTADO			NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Francia	Francia
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. COMMERÇON		Alain	Francés
2. GAUZY-LAZO		Laurence	Francés
3. HUBERT		Philippe	Francés
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Francia		Paris F-75013	c/o Sanofi Patent Departmemt, 174 avenue de France,
2. Francia		Paris F-75013	c/o Sanofi Patent Departmemt, 174 avenue de France,
3. Francia		Paris F-75013	c/o Sanofi Patent Departmemt, 174 avenue de France,
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
De Páez		Luz Clemencia	C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35	No. TELÉFONO	3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA	CORREO ELECTRÓNICO	cavelier@cavelier.com
PAÍS	COLOMBIA	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
FRANCIA		FR	1056103	2010/07/26
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐				
Universidades públicas o privadas ☐				
Entidades sin ánimo de lucro ☐				
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. 13-004205 No. 13-006545	Fecha: 2013/01/16 Fecha: 2013/01/22	
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>				
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma <i>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</i> <i>TP #23555-055</i>		
C.C 35.456.344 de Usaquen		Tarjeta Profesional 23.555		

17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: <u>67</u> 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: <u>29</u> 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: <u>5</u> 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☒ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poder de SANOFI 10. ☒ Documento que legalmente prueba la cesión de los inventores al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por 500.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 19 reivindicaciones adicionales a 10 por \$570.000.

FIGURA CARACTERISTICA



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 February 2012 (02.02.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/014147 A1

(51) International Patent Classification:
C07D 487/04 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2011/053310

(22) International Filing Date:
25 July 2011 (25.07.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
1056103 26 July 2010 (26.07.2010) FR

(71) Applicant (for all designated States except US):
SANOFI [FR/FR]; 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **COMMERÇON**,
Alain [FR/FR]; c/o Sanofi Patent Department, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR). **GAUZY-LAZO**,
Laurence [FR/FR]; c/o Sanofi Patent Department, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR). **HUBERT**,
Philippe [FR/FR]; c/o Sanofi Patent Department, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(74) Agents: GASLONDE, Aude et al.; Sanofi, Patent Department, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): 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) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

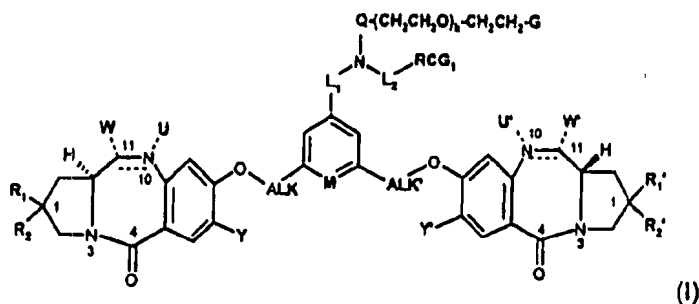
Declarations under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: ANTICANCER DERIVATIVES, PREPARATION THEREOF AND THERAPEUTIC USE THEREOF



(57) Abstract: The present invention relates to conjugates of pyrrolo[1,4]benzodiazepine (PBD) dimers, to compositions containing them and to their therapeutic use, especially as anticancer agents. The invention also relates to the process for preparing the conjugates and to their use as anticancer agents, and also to the dimers themselves. Formula (I) in which : represents a single bond or a double bond.

DERIVADOS ANTICANCEROSOS, SU PREPARACIÓN Y SU APLICACIÓN TERAPÉUTICA

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

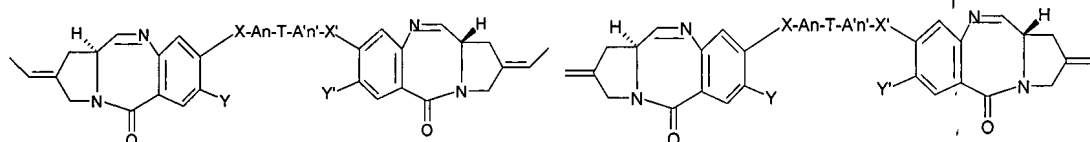
La química de los conjugados es conocida desde hace muchos años y ha sido aplicada a varias familias de citotóxicos como por ejemplo los maitansinoides (**WO 04103272**), los taxanos (**WO 06061258**), las leptomicinas (**WO 07144709**), el **CC-1065** y sus análogos (**WO 2007102069**); véase también 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 utilizados tienen por fórmulas:

25



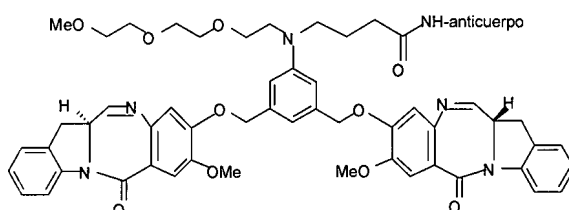
en las que T puede representar un grupo arilo o heteroarilo sustituido con $-G-D-(Z)_p-SZ_a$ o $-G-D-(Z)_p-C(=O)Z_bR_b$. G representa un enlace sencillo o doble o bien $-O-$, $-S-$ o $-NR-$. D representa un enlace sencillo o bien uno de los grupos siguientes: $-E-$, $-E-NR-$, $-E-NR-F-$, $-E-O-$, $-E-O-F-$,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

30

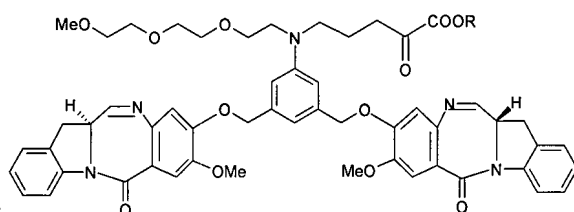
35

-alquil-(OCH₂CH₂)_i-, -alquil-(OCH₂CH₂)_icicloalquil(OCH₂CH₂)_j-,
 -alquil(OCH₂CH₂)_iheterociclil(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
 5 números enteros que van de 0 a 2.000. Z representa un grupo alquilo y p es un número entero
 que vale 0 ó 1. En estos compuestos, el R del grupo NR no comprende la cadena PEG.

Immunogen ha descrito en noviembre de 2009 en el congreso de EORTC (Abstract B-126) el
 conjugado siguiente:



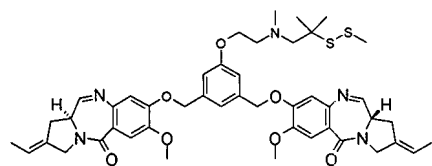
que se distingue por la naturaleza del conector y del compuesto citotóxico. Este compuesto se
 ha vuelto a describir en el congreso Sixth Annual PEGS en Boston que ha tenido lugar del 17 al
 21 mayo 2010 así como los compuestos precursores



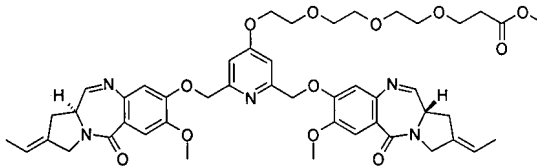
siguientes:

con R= N-succinimidilo o metilo.

Los dímeros siguientes se describen principalmente respectivamente en **WO 07085930** y **WO 2009/016516** :



(ej.28)



(ej.5)

Estas tres solicitudes no describen ni sugieren los nuevos conectores de la invención que
 comprenden una o dos cadenas pegiladas.

[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.

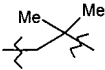
5 [Definiciones]

Se entiende por:

- conjugado: un agente de selección de la diana celular al que está unido de forma covalente al menos una molécula de un compuesto citotóxico;
- agente de selección de la diana celular (o "cell binding agent" en inglés): una molécula que
10 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 de la diana 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
15 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;
- conector: un conjunto de átomos que permiten unir de forma covalente un compuesto
20 citotóxico al agente de selección de la diana;
- grupo alquilo : un grupo hidrocarbonado alifático saturado obtenido quitando un átomo de hidrógeno de un alcano. El grupo alquilo puede ser lineal o ramificado. A título de ejemplos, se pueden citar los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo, 2,2-dimetilpropilo, hexilo;
- grupo cicloalquilo: un grupo alquilo cíclico que comprende entre 3 y 8 átomos de carbono
25 implicados en la estructura cíclica. A título de ejemplos, se pueden citar los grupos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 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)
30 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 formando el ciclo. Se trata más
35 particularmente de grupos piperazino, N-metilpiperazino, morfolino, piperidino o pirrolidino ;
- grupo alcoxi: un grupo -O-alquilo, en el que el grupo alquilo es tal como se ha definido anteriormente;

- grupo alcanilo: un grupo $-\text{O}-\text{CO}-\text{alquilo}$, en el que el grupo alquilo es tal como se ha definido anteriormente;

- grupo alquileo: un grupo divalente saturado de fórmula general $-\text{C}_m\text{H}_{2m}-$, obtenido quitando dos átomos de hidrógeno de un alcano. A título de ejemplos, se pueden citar los grupos metileno $(-\text{CH}_2-)$, etileno $(-\text{CH}_2\text{CH}_2-)$, propileno $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$, butileno

$(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$, isobutileno (), hexileno $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-)$. El grupo alquileo puede ser más particularmente de fórmula $-(\text{CH}_2)_m-$, representando m un número entero;

- en los intervalos de valores se incluyen los extremos, (por ejemplo, un intervalo de tipo « i que va de 1 a 6 » incluye los extremos 1 y 6. Además, el intervalo también describe todos los puntos del intervalo; así, « i que va de 1 a 6 » describe los valores 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Abreviaturas utilizadas

AcOEt: acetato de etilo; ALK: grupo alquileo; $\text{ALK}(\text{C}_x-\text{C}_y)$: grupo alquileo(C_x-C_y); CCF: cromatografía en capa fina (TLC por sus iniciales en inglés); CMS : cloruro de metanosulfonilo ; 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: sulfóxido de dimetilo; $\epsilon_{\text{LO nm}}$: coeficiente de extinción molar a la longitud de onda LO ; EEDQ: 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina; EDCI: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida; EDTA: ácido etilen-diamino-tetraacético; Fmoc: fluorenilmetoxicarbonilo; Hal: átomo de halógeno; HOBt: 1-hidroxibenzotriazol; HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico; LO : longitud de onda; Me : metilo ; NHS: N-hidroxisuccinimida; NMP: N-metilpirrolidinona; PR: presión reducida; R_f : factor de retención ; SEC : cromatografía de exclusión estérica; TA: temperatura ambiente; TBDMS: *tert*-butildimetilsililo; TEA: trietilamina; TFA: ácido trifluoroacético; TIPS: triisopropilsililo; THF: tetrahidrofurano; t_R : tiempo de retención.

[Figuras]

Figura 1: modificación de un agente de selección de la diana por SPDP ;

Figura 2: modificación de un agente de selección de la diana por un iminotiolano;

Figura 3: espectro de masas de alta resolución deconvolucionado del conjugado del ej. 8 después de desglicosilación;

Figura 4 : Espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado del ej. 9 no desglicosilado;

Figura 5: Espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado del ej. 10 no desglicosilado;

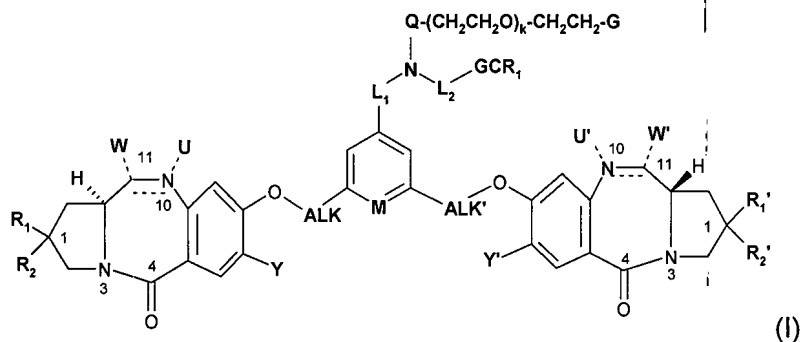
Figura 6: Espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado del ej. 11 no desglicosilado.

Estas figuras muestran para cada conjugado, la distribución de las especies que llevan de 0 a 8 dímeros de tomaimicinas (D_0 : ningún dímero; D_x : x dímeros).

5

[Descripción breve de la invención]

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



en la que:

10

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

si --- representa un enlace sencillo entonces:

15

- ❖ U y/o U' , idéntico o diferente, representa(n) independientemente el uno del otro, H;
- ❖ W y/o W' , idéntico o diferente, representa(n) 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 trialquilfosfonio o triarilfosfonio;

20

si --- representa un enlace doble entonces:

- ❖ U y U' están ausentes;
- ❖ W y/o W' , idéntico o diferente, representa(n) independientemente el uno del otro H;
- R_1 , R_2 , R_1' , R_2' , idénticos o diferentes, representan independientemente el uno del otro: H, Hal o un grupo alquilo(C_1 - C_6) sustituido opcionalmente con uno o varios sustituyentes elegidos entre: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo, S(O)_qR con q = 0, 1 ó 2;

25

o bien

R_1 y R_2 y/o R_1' y R_2' forman juntos respectivamente un enlace doble =CH₂ o =CH-CH₃;

30

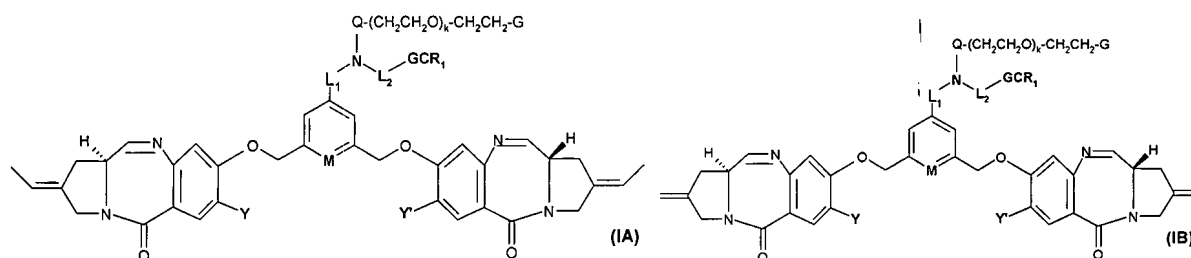
- Y e Y' , idénticos o diferentes, representan independientemente el uno del otro H u -OR;
- M representa CH o N;
- ALK y ALK' designan un grupo alquilenos(C_1 - C_6);

- **R y R'** representan, independientemente el uno del otro, H o un grupo alquilo(C₁-C₆) o arilo sustituido opcionalmente con uno o varios sustituyentes elegidos entre: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo;
- **L₁** representa:
 - un enlace sencillo;
 - el grupo -(OCH₂CH₂)_i-, unido al ciclo fenilo o piridinilo por el átomo de oxígeno, representando i un número entero que va de 2 a 40, preferentemente de 2 a 10, preferentemente igual a 3 ;
 - el grupo -D-ALK(C₁-C₆)- unido al ciclo fenilo o piridinilo por D, en el que D representa -O-, -NH- o -Nalquilo(C₁-C₄)-;
- **L₂** representa:
 - un grupo -ALK(C₁-C₆)- ;
 - el grupo -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂-, representando j un número entero que va de 1 a 40, preferentemente de 1 a 10, preferentemente igual a 2 ó 3 ;
 - un grupo -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂NR''-ALK(C₁-C₆)-, unido al átomo de nitrógeno por el resto -(CH₂CH₂O)-, representando j un número entero que va de 1 a 40, preferentemente de 1 a 10, preferentemente igual a 2 ó 3, y representando R'' H o un grupo alquilo(C₁-C₄);
- **Q** representa un enlace sencillo o el grupo C(=O) ;
- **k** representa un número entero que va de 0 a 40, preferentemente de 1 a 40, más bien de 1 a 10 ;
- **G** representa un grupo -OR o -NRR', siendo R y R' tales como se han definido anteriormente o siendo tales que forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un grupo heterocicloalquilo(C₄-C₁₀) que puede comprender en el ciclo otro heteroátomo elegido entre N, O o S y que puede estar sustituido opcionalmente con al menos un sustituyente elegido entre un grupo alquilo(C₁-C₄), un átomo de halógeno o un grupo hidroxil;
- **GCR1** representa el grupo -SZ_a o -C(=O)-Z_bR_b ;
- **Z_a** representa Ac, R_a o SR_a ;
- **R_a** representa H, o un grupo alquilo(C₁-C₆), cicloalquilo(C₃-C₈), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo(C₄-C₁₀) sustituido opcionalmente con uno o varios sustituyentes elegidos entre: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, NO₂, un grupo arilo o heteroarilo;

- Z_b representa un enlace sencillo, -O- o -NH- y representando R_b H o un grupo alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_8), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo (C_4-C_{10}) o bien Z_b representa un enlace sencillo y R_b representa Hal;

5 con la condición de que si L_1 representa un enlace sencillo entonces GCR1 representa -SZ_a.

Más particularmente, se trata de los compuestos de fórmula (IA) o (IB) :



10

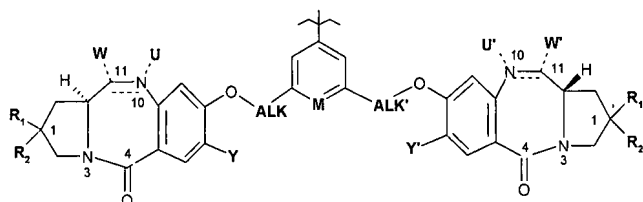
La invención también se refiere al procedimiento de preparación de un conjugado, que consiste en: (i) poner en contacto y dejar reaccionar una disolución acuosa, opcionalmente tamponada, del agente de selección de la diana, opcionalmente modificado mediante un agente de modificación, y una disolución de un compuesto de fórmula (I), (ii) y opcionalmente separar el conjugado formado en la etapa (i) del compuesto de fórmula (I) y/o del agente de selección de la diana que no haya reaccionado y/o de los agregados que se formarían opcionalmente. El grupo químico GCR1 del compuesto de fórmula (I) debe ser reactivo frente a los grupos químicos GCR2 presentes en el agente de selección de la diana principalmente frente a los grupos aminos presentes en el anticuerpo, habiéndose introducido dichos grupos químicos GCR2 llegado el caso con el agente de modificación de forma que se asegure la unión del compuesto de fórmula (I) al agente de selección de la diana por formación de un enlace covalente.

20

La invención también se refiere a un conjugado así como a una disolución de conjugado susceptible de obtenerse por el procedimiento descrito anteriormente.

25

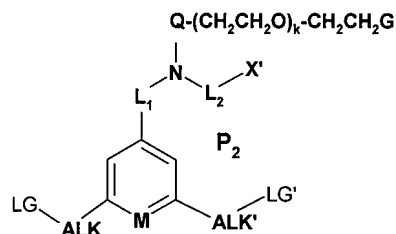
La invención también se refiere a la utilización de un derivado de fórmula (I) para la preparación de un agente de selección de la diana al que esté unido de forma covalente, en la posición para de M, el dímero de fórmula:



30

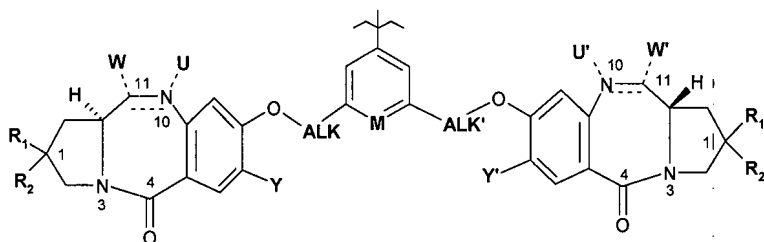
El compuesto, el conjugado así como la disolución del conjugado pueden utilizarse como agente anticanceroso.

La invención también se refiere al compuesto de fórmula P_2 :



en la que L_1 , L_2 , Q , k , ALK , ALK' y G son tales como se han definido anteriormente; representando LG y LG' un grupo saliente y X' representa GCR1.

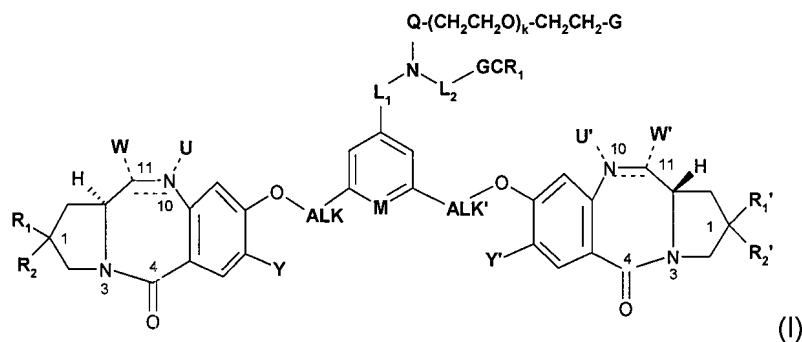
La invención también se refiere a un agente de selección de la diana al que se ha unido de forma covalente en posición para de M el dímero de fórmula:



después de reacción de un compuesto de la invención con el agente de selección de la diana.

[Descripción de la invención]

La invención se refiere a compuestos 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:
 - ❖ U y/o U' , idéntico o diferente, representa(n) independientemente el uno del otro, H;
 - ❖ W y/o W' , idéntico o diferente, representa(n) 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, $-\text{SO}_3^-$, -NRSOOR', -NRR', una amina cíclica tal que N10 y C11 estén incluidos en un ciclo, -NROR', -NRCOR', $-\text{N}_3$, -CN, Hal, un grupo trialquifosfonio o triarilfosfonio;

si --- representa un enlace doble entonces:

- 5
- ❖ U y U' están ausentes;
 - ❖ W y/o W', idéntico o diferente, representa(n) independientemente el uno del otro H;
 - R₁, R₂, R₁', R₂', idénticos o diferentes, representan independientemente el uno del otro: H, Hal o un grupo alquilo(C₁-C₆) sustituido opcionalmente con uno o varios sustituyentes elegidos entre: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo, S(O)_qR con q = 0,1
- 10 ó 2;

o bien

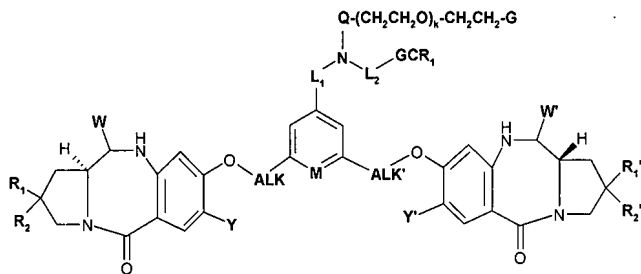
R₁ y R₂ y/o R₁' y R₂' forman juntos respectivamente un enlace doble =CH₂ o =CH-CH₃;

- Y e Y', idénticos o diferentes, representan independientemente el uno del otro H u -OR;
- 15 • M representa CH o N;
- ALK y ALK' designan un grupo alquileo(C₁-C₆);
- R y R' representan, independientemente el uno del otro, H o un grupo alquilo(C₁-C₆) o arilo sustituido opcionalmente con uno o varios sustituyentes elegidos entre: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo;
- 20 • L₁ representa:
 - un enlace sencillo;
 -
 - el grupo -(OCH₂CH₂)_i-, unido al ciclo fenilo o piridinilo por el átomo de oxígeno, representando i un número entero que va de 2 a 40, preferentemente de 2 a 10,
 - 25 preferentemente igual a 3 ;
 -
 - el grupo -D-ALK(C₁-C₆)- unido al ciclo fenilo o piridinilo por D, en el que D representa -O-, -NH- o -Nalquilo(C₁-C₄)-;
 - L₂ representa:
 - 30 ○ un grupo -ALK(C₁-C₆)- ;
 -
 - el grupo -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂-, representando j un número entero que va de 1 a 40, preferentemente de 1 a 10, preferentemente igual a 2 ó 3 ;
 -
 - 35 ○ un grupo -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂NR''-ALK(C₁-C₆)-, unido al átomo de nitrógeno por el resto -(CH₂CH₂O)-, representando j un número entero que va de 1 a 40, preferentemente de 1 a 10, preferentemente igual a 2 ó 3, y representando R'' H o un grupo alquilo(C₁-C₄);

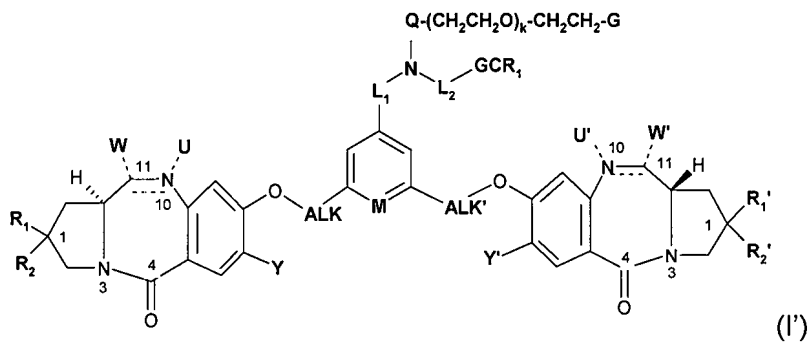
- **Q** representa un enlace sencillo o el grupo $C(=O)$;
- **k** representa un número entero que va de 0 a 40, preferentemente de 1 a 40, más bien de 1 a 10 ;
- **G** representa un grupo $-OR$ o $-NRR'$, siendo **R** y **R'** tales como se han definido anteriormente o siendo tales que forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un grupo heterocicloalquilo (C_4-C_{10}) que puede comprender en el ciclo otro heteroátomo elegido entre **N**, **O** o **S** y que puede estar sustituido opcionalmente con al menos un sustituyente elegido entre un grupo alquilo (C_1-C_4), un átomo de halógeno o un grupo hidroxilo;
- **GCR1** representa el grupo $-SZ_a$ o $-C(=O)-Z_bR_b$;
- **Z_a** representa **Ac**, **R_a** o **SR_a** ;
- **R_a** representa **H**, o un grupo alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_8), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo (C_4-C_{10}) sustituido opcionalmente con uno o varios sustituyentes elegidos entre: **Hal**, **CN**, **NRR'**, **CF₃**, **OR**, **NO₂**, un grupo arilo o heteroarilo;
- **Z_b** representa un enlace sencillo, $-O-$ o $-NH$ y representando **R_b** **H** o un grupo alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo (C_3-C_8), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo (C_4-C_{10}) o bien **Z_b** representa un enlace sencillo y **R_b** representa **Hal**;

con la condición de que si **L₁** representa un enlace sencillo entonces **GCR1** representa $-SZ_a$.

Los compuestos de fórmula (I) pueden existir por lo tanto en la forma:



La invención se refiere igualmente a los compuestos 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'**, idéntico o diferente, representa(n) independientemente el uno del otro, H;

- ❖ **W** y/o **W'**, idéntico o diferente, representa(n) independientemente el uno del otro: OH, -OR, -OCOR, -COOR, -OCOOR, -CONRR', 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, $-\text{SO}_3^-$, -NRSOOR', -NRR', una amina cíclica tal que N10 y C11 estén incluidos en un ciclo, -NROR', -NRCOR', $-\text{N}_3$, -CN, Hal, un grupo trialkilfosfonio o triarilfosfonio;

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

- **M** representa CH o N;

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

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

- **L₁** representa:

- un enlace sencillo;

-

- el grupo -(OCH₂CH₂)_i-, unido al ciclo fenilo o piridinilo por el átomo de oxígeno, representando i un número entero que va de 2 a 40, preferentemente de 2 a 10;

-

- el grupo -D-ALK(C₁-C₆)- unido al ciclo fenilo o piridinilo por D, en el que D representa -O-, -NH- o -Nalquilo(C₁-C₄)-;

- **L₂** representa:

- un grupo -ALK(C₁-C₆)- ;

-

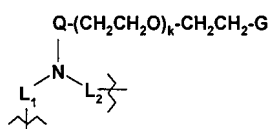
- el grupo -(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂-, representando j un número entero que va de 1 a 40, preferentemente de 1 a 10 ;

-

- o un grupo $-(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, unido al átomo de nitrógeno por el resto $-(CH_2CH_2O)-$, representando j un número entero que va de 1 a 40, preferentemente de 1 a 10, y representando R'' H o un grupo alquilo(C_1-C_4);

- **Q** representa un enlace sencillo o el grupo $C(=O)$;
- 5 • **k** representa un número entero que va de 0 a 40, preferentemente de 1 a 40, más bien de 1 a 10 ;
- **G** representa un grupo $-OR$ o $-NRR'$, siendo R y R' tales como se han definido anteriormente o siendo tales que forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un grupo heterocicloalquilo(C_4-C_{10}) que puede comprender en el ciclo otro heteroátomo elegido entre N, O o S y que puede estar sustituido opcionalmente con al
- 10 menos un sustituyente elegido entre un grupo alquilo(C_1-C_4), un átomo de halógeno o un grupo hidroxilo;
- **GCR1** representa el grupo $-SZ_a$ o $-C(=O)-Z_bR_b$;
- **Z_a** representa Ac, R_a o SR_a ;
- 15 • **R_a** representa H, o un grupo alquilo(C_1-C_6), cicloalquilo(C_3-C_8), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo(C_4-C_{10}) sustituido opcionalmente con uno o varios sustituyentes elegidos entre: Hal, CN, NRR' , CF_3 , OR, NO_2 , un grupo arilo o heteroarilo;
- **Z_b** representa un enlace sencillo, $-O-$ o $-NH-$ y representando R_b H o un grupo alquilo(C_1-C_6), cicloalquilo(C_3-C_8), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo(C_4-C_{10}) o bien **Z_b** representa
- 20 un enlace sencillo y **R_b** representa Hal;

con la condición de que si L_1 representa un enlace sencillo entonces GCR1 representa $-SZ_a$.



Se designa con **L** el conector definido por

- 25 Más particularmente, si L_1 representa un enlace sencillo, L_2 representa $-(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$ o $-(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$ y/o $k \neq 2$.

Más particularmente, cuando **M** representa N, $-D-ALK(C_1-C_6)-$ representa más bien $-O-ALK(C_1-C_6)-$.

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

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

- 35 En las fórmulas (I) y (I') anteriores, cada grupo alquileo (así, por ejemplo, los dos grupos ALK y ALK' unidos al núcleo fenilo o piridinilo pueden ser idénticos o diferentes; según otro ejemplo, el grupo ALK de $-D-ALK(C_1-C_6)-$ puede ser idéntico o diferente del grupo ALK unido al núcleo fenilo

o piridinilo). ALK puede elegirse por ejemplo entre uno de los siguientes: $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, CH_2CMe_2- , $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

Y e Y' representan más particularmente un grupo alcoxi(C_1-C_4), principalmente el grupo metoxi.

- 5 R y R' pueden representar más particularmente, independientemente el uno del otro, H o un grupo alquilo(C_1-C_6).

Según un modo particular, $\text{U}=\text{U}'$ y/o $\text{W}=\text{W}'$ y/o $\text{R}_1=\text{R}_1'$ y/o $\text{R}_2=\text{R}_2'$ y/o $\text{Y}=\text{Y}'$ y/o los dos grupos ALK y ALK' unidos al núcleo fenilo o piridinilo son idénticos (dímero simétrico más fácil de preparar).

- 10 Más particularmente, W y W' son idénticos o diferentes y representan OH, OMe, OEt, NHCONH_2 , SMe.

R'' puede representar H o un grupo alquilo(C_1-C_4), principalmente Me.

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

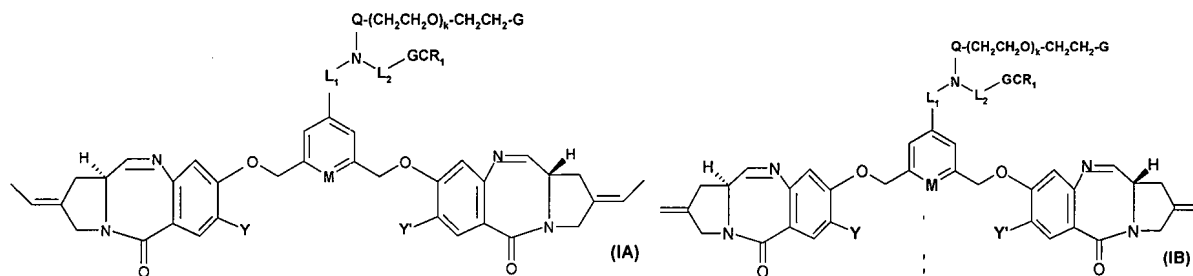
Más particularmente, R_1 y R_2 y/o R_1' y R_2' forman juntos respectivamente un enlace doble $=\text{CH}_2$ o $=\text{CH}-\text{CH}_3$, más específicamente $=\text{CH}-\text{CH}_3$.

- 15 G puede representar un grupo $-\text{OR}$, más particularmente un grupo $-\text{OH}$ o $-\text{Oalquilo}(\text{C}_1-\text{C}_6)$, principalmente $-\text{OMe}$. G puede representar también un grupo $-\text{NRR}'$ en el que R y R' representan independientemente el uno del otro H o un grupo alquilo(C_1-C_6). Más particularmente, G puede representar por lo tanto un grupo $-\text{NH}_2$, $-\text{NHalquilo}(\text{C}_1-\text{C}_6)$ o $-\text{Nalquilo}(\text{C}_1-\text{C}_6)_2$, principalmente $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$. G puede representar también un grupo $-\text{NRR}'$, en el que R y R' forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un grupo heterocicloalquilo(C_4-C_{10}) que puede comprender en el ciclo otro heteroátomo elegido entre N, O o S y que puede estar sustituido opcionalmente con al menos un sustituyente elegido entre un grupo alquilo(C_1-C_4), un átomo de halógeno o un grupo hidroxilo. El grupo heterocicloalquilo puede elegirse principalmente entre piperazino, N-metilpiperazino, morfolino, piperidino o pirrolidino.

- 30 k representa un número entero que va de 0 a 40. k puede tomar el valor 0 (ninguna cadena PEG terminada con G unida al átomo de nitrógeno). Entre los compuestos de la invención, se pueden distinguir aquellos que comprenden una cadena PEG terminada con G unida al átomo de nitrógeno y k va de 1 a 40, más bien de 1 a 10, más bien de 1 a 5. Se pueden distinguir también aquellos que comprenden al menos una cadena PEG es decir aquellos para los que k va de 1 a 40, preferentemente de 1 a 10, más bien de 1 a 5, y/o $\text{L}_1=-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_j-$ y/o $\text{L}_2=-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_j-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ o bien $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_j-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}''-\text{ALK}(\text{C}_1-\text{C}_6)-$.

- 35 Los compuestos de fórmulas (I) y (I'), incluidos los indicados como ejemplo, pueden existir en estado de bases o de sales de adición a ácidos farmacéuticamente aceptables así como en forma de hidratos o de solvatos de estas bases o de estas sales.

Más particularmente, se distinguen aquellos de fórmula (IA) o (IB) :



Además, se distinguen:

- 5
 - un 1^{er} subgrupo de compuestos para el que $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$ y $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$;
 - un 2^o subgrupo de compuestos para el que $L_1 = -(OCH_2CH_2)_i-$ y $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$;
 - un 3^{er} subgrupo de compuestos para el que $L_1 =$ enlace sencillo y $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$;
 - un 4^o subgrupo de compuestos para el que $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, y $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$;
- 10
 - un 5^o subgrupo de compuestos para el que $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$ y $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$.

Se pueden distinguir igualmente los grupos de compuestos siguientes:

- 15
 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR_1 = -SZ_a$;
 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR_1 = -SZ_a$;
 - $L_1 = -(OCH_2CH_2)_i-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR_1 = -SZ_a$;
 - $L_1 = -(OCH_2CH_2)_i-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR_1 = -SZ_a$;
- 20
 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G = NRR'$, $GCR_1 = -SZ_a$;
 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G = NRR'$, $GCR_1 = -SZ_a$;
 - $L_1 =$ enlace sencillo, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR_1 = -SZ_a$;
 - $L_1 =$ enlace sencillo, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR_1 = -SZ_a$;
- 25
 - $L_1 =$ enlace sencillo, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=0-10$, $G = NRR'$, $GCR_1 = -SZ_a$;
 - $L_1 =$ enlace sencillo, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=0-10$, $G = NRR'$, $GCR_1 = -SZ_a$;
- 30
 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=0-10$, $G = NRR'$, $GCR_1 = -SZ_a$;
 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=0-10$, $G = NRR'$, $GCR_1 = -SZ_a$;
 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q =$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR_1 = -SZ_a$;

▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-SZ_a$;

▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=\text{enlace sencillo}$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;

5 ▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;

▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=\text{enlace sencillo}$, $k=1-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;

▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;

▪ $L_1 = -(OCH_2CH_2)_i-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=\text{enlace sencillo}$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$

10 ;

▪ $L_1 = -(OCH_2CH_2)_i-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;

▪ $L_1 = -(OCH_2CH_2)_i-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=\text{enlace sencillo}$, $k=1-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;

▪ $L_1 = -(OCH_2CH_2)_i-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;

15 ▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$, $Q=\text{enlace sencillo}$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;

▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;

▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$, $Q=\text{enlace sencillo}$, $k=0-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;

20

▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$, $Q=CO$, $k=0-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$.

En los grupos de compuestos definidos anteriormente:

25 i representa más particularmente un número entero que va de 2 a 10, principalmente un número entero igual a 3 ;

j representa más particularmente un número entero que va de 1 a 10, principalmente un número entero igual a 2 ó 3 ;

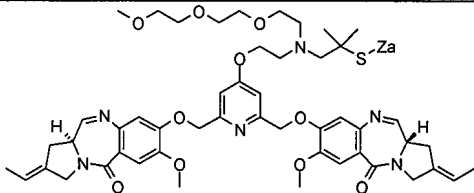
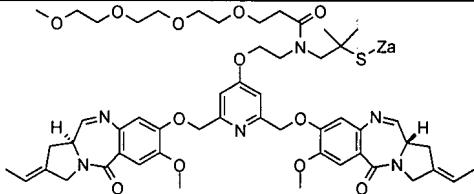
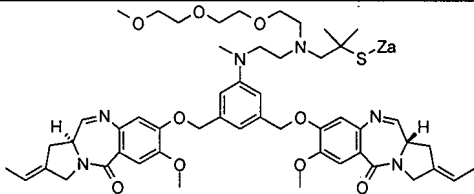
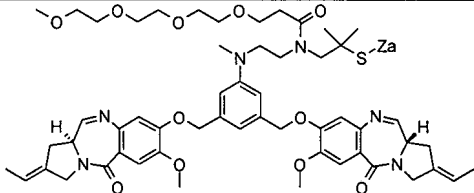
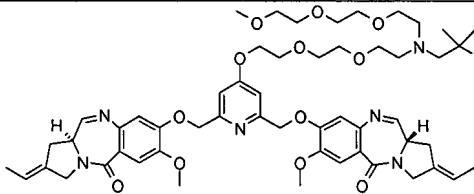
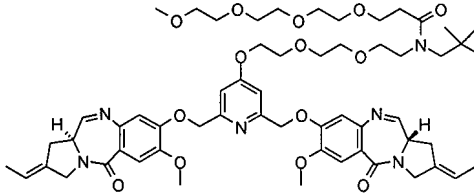
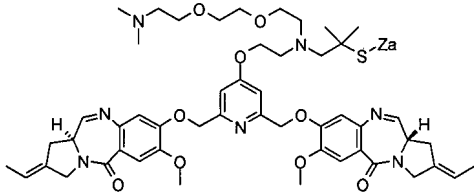
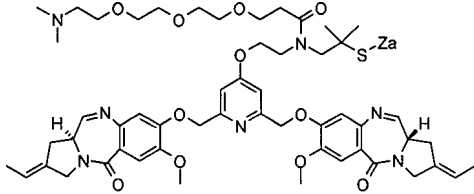
k representa más particularmente un número entero igual a 0, o que va de 1 a 5.

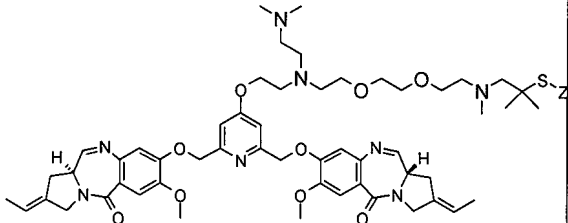
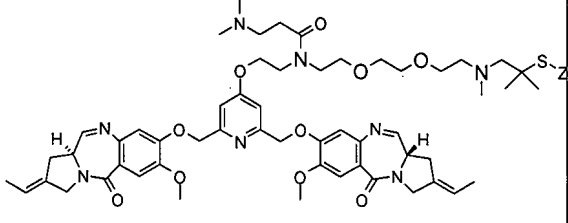
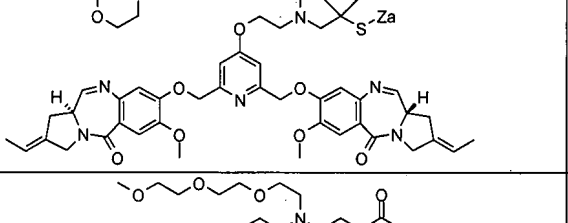
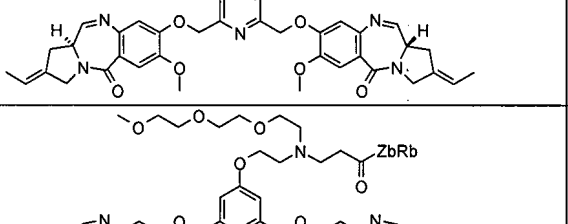
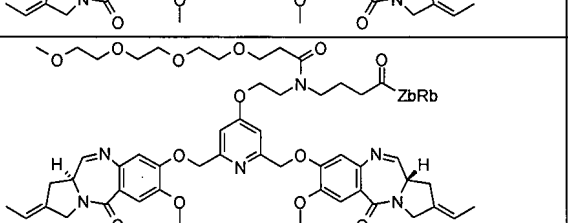
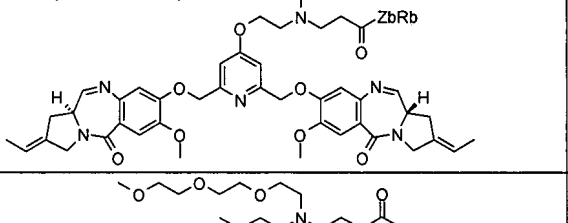
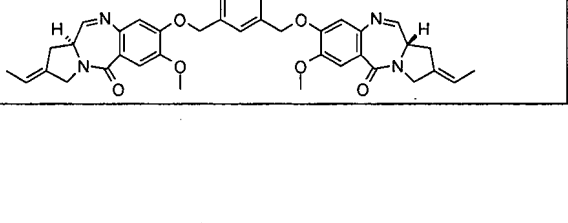
30

La **Tabla I** describe los conectores **L** particulares así como los ejemplos de compuestos que les corresponden. Cada compuesto de esta tabla puede existir en la forma con **M** = CH (benceno) o bien **M** = N (piridina). Los compuestos con **M** = N son más solubles en agua. En esta tabla, los ejemplos se proporcionan en una forma (IA) pero pueden existir también en una forma (IB). Se

35 podrá elegir **L**, **L₁**, **L₂**, **k**, **G** entre los descritos en la **Tabla I** o entre los ejemplos.

Tabla I

L ₁	L ₂	Q	G	compuesto de fórmula (IA)	n°
-D-ALK-	ALK	-	OR		1
-D-ALK-	ALK	CO	OR		2
-D-ALK-	ALK	-	OR		3
-D-ALK-	ALK	CO	OR		4
-(OCH ₂ CH ₂) _n -	ALK	-	OR		5
-(OCH ₂ CH ₂) _n -	ALK	CO	OR		6
-D-ALK-	ALK	-	NRR'		7
-D-ALK-	ALK	CO	NRR'		8

L ₁	L ₂	Q	G	compuesto de fórmula (IA)	n°
-D-ALK-	-(CH ₂ CH ₂ O) ₇ - CH ₂ CH ₂ NR''- ALK-	-	NRR'		17
-D-ALK-	-(CH ₂ CH ₂ O) ₇ - CH ₂ CH ₂ NR''- ALK-	CO	NRR'		18
-D-ALK-	ALK	-	NRR'		19
-D-ALK-	ALK	-	OR		20
-D-ALK-	ALK	-	OR		21
-D-ALK-	ALK	CO	OR		22
-D-ALK-	ALK	CO	OR		23
-D-ALK-	ALK	-	OR		24

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

Los compuestos descritos comprenden un grupo químico reactivo (GCR1) frente a un grupo químico reactivo (GCR2) presente sobre el agente de selección de la diana. La reacción entre GCR1 y GCR2 asegura la unión del compuesto de fórmula (I) sobre el agente de selección de la diana mediante la formación de un enlace covalente. Así, los compuestos de fórmula (I) son aptos para conjugarse con un agente de selección de la diana.

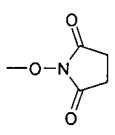
GCR1 representa:

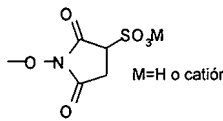
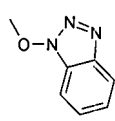
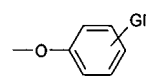
(i) el grupo reactivo -SZ_a para el que Z_a representa H o el grupo -SR_a, con R_a representando un grupo alquilo(C₁-C₆), cicloalquilo(C₃-C₇), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo(C₄-C₁₀);

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

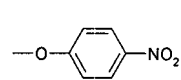
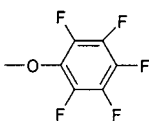
Más particularmente, -SZ_a puede representar -SH o -SSalquilo(C₁-C₆), principalmente -SSMe, o -SS-heteroarilo, principalmente (definiéndose X₁ y X₂ más adelante). Más particularmente, -SZ_a puede representar -SH o -SSalquilo(C₁-C₆), principalmente -SSMe.

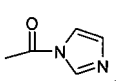
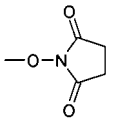
Más particularmente, -Z_bR_b puede representar -OH (función ácido), -Oalquilo(C₁-C₆), principalmente

-OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH=CH₂ (función éster) o bien -Z_bR_b puede representar 

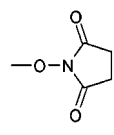
,  o el grupo  en el que Gl representa al menos un grupo

5 electroinductor tal como -NO₂ o -Hal, principalmente -F. Se puede tratar por ejemplo de los

grupos siguientes:  o  . Otro tipo de grupo -C(=O)Z_bR_b es el

siguiente :  . Los grupos reactivos -SH y  presentan una buena reactividad.

Más particularmente, -Z_bR_b puede representar -OH (función ácido), -Oalquilo(C₁-C₆),

principalmente -OCH₃, -OCH₂CH₃, - o bien -Z_bR_b puede representar .

10

Más particularmente, GCR1 podrá elegirse entre uno de los descritos en los ejemplos.

15

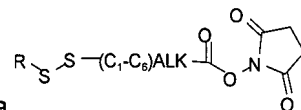
A título de ejemplo de GCR2, se pueden citar los grupos ε-amino de las lisinas portados por las cadenas laterales de los residuos de lisina que están presentes en la superficie de un anticuerpo, los grupos sacáridos de la región bisagra o los tioles de las cisteínas por reducción de los enlaces disulfuros 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**, Fecha de Publicación (Web): 3 de febrero, 2009 (Revisión); DOI: 10.1021/bc800294a ; **WO 2006/069246** y según Chin J. W., et al., *JACS* **2002**, 124, 9026-9027 (tecnología ReCode®)). Estos modos de unión utilizados con los anticuerpos son aplicables al conjunto de los agentes de selección de la diana conocidos, en función de su estructura.

25

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

conjugación y utilizar una mayor variedad de grupos GCR1.

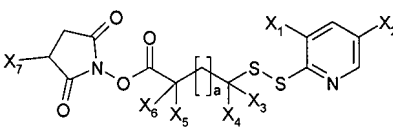
Agentes de modificación que permiten introducir disulfuros

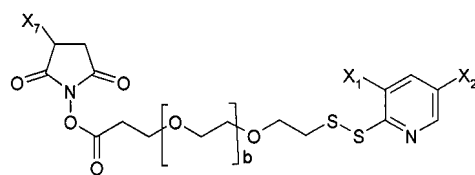


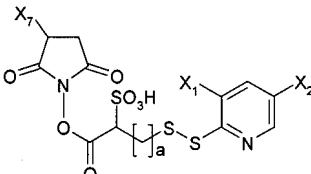
El agente de modificación puede ser un éster activado NHS de fórmula

5 en la que R representa un grupo alquilo(C₁-C₆), arilo, heteroarilo, cicloalquilo(C₃-C₇), heterocicloalquilo(C₄-C₁₀); por ejemplo, se puede utilizar el piridilditiopropionato de N-succinimidilo (SPDP) o el piridilditiobutirato de N-succinimidilo (SPDB o éster N-hidroxi-succinimidilo del ácido 4-(2-piridilditio)butanoico) de forma que se introduzcan los grupos reactivos GCR2 de ditiopiridilo (véase Bourdon M.A., et al., *Biochem. J.* **1978**, 173, 723-737 ; US

10 **5208020**) los que pueden reaccionar a continuación con un grupo químico reactivo GCR1 de tipo -SH presente sobre el conector del dímero de pirrolo[1,4]benzodiazepina con el fin de formar un nuevo enlace -S-S- (véase el ej. 1) para un conjugado que presenta un enlace disulfuro). El grupo N-hidroxisuccinimida reacciona preferiblemente con los grupos amino presentes sobre el anticuerpo de manera que se forman enlaces amidas. Otro ejemplo de agente de modificación

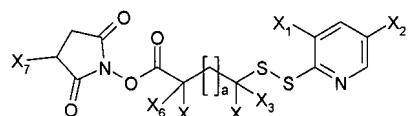
15 se describe en **WO 2004/016801** de fórmula  ; por ejemplo, se puede utilizar el 4-(5-nitro-2-piridilditio)-pentanoato de N-succinimidilo (SNPP), o un grupo

 análogo pegilado de fórmula descrito en **WO 2009/134976**

 o un análogo sulfónico de fórmula descrito en **WO 2009/134977**

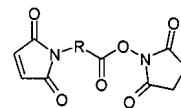
fórmulas en las que:

- 20 - X₃, X₄, X₅, X₆ representan H o un grupo alquilo(C₁-C₆),
- X₁ y X₂ representan -H, -CONX₈X₉, -NO₂, representando X₈ y X₉, H o un grupo alquilo(C₁-C₆),
- X₇ representa -SO₃⁻M⁺ o H o bien un grupo amonio cuaternario;
- a designa un número entero que va de 0 a 4 y b designa un número entero que va de 0 a
- 25 2.000, preferentemente entre 1 y 200 ; a y b pueden tomar todos los valores entre 0 y 4 o entre 0 y 2.000 respectivamente.

Preferentemente, entre los compuestos de fórmula  , a=1, X₃=Me

y $X_2 = \text{NO}_2$ y $X_1 = X_4 = X_5 = X_6 = X_7 = \text{H}$).

Agentes de modificación que permiten introducir grupos maleimido



Otro agente de modificación puede ser un éster activado NHS de fórmula en la que R representa un grupo $-(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n$ -ciclohexilo-, -ciclohexilo- $(\text{CH}_2)_n-$ y n representa un número entero que va de 1 a 10 ; por ejemplo, se puede utilizar el 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) (según **EP 0306943**), o un sulfo-SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo). Se pueden

citar como otros ejemplos :

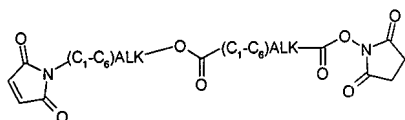
como el 3-maleimido-propionato de

N-succinimidilo ;

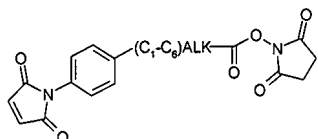
como el 6-(3-maleimidopropionamido)hexanoato

de N-succinimidilo ;

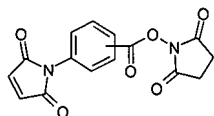
siendo b un número entero comprendido entre 0 y 2.000, preferentemente entre 1 y 200 (b puede tomar todos los valores entre 0 y 2.000), como el 3-(2-{2-[3-maleimido-propionilamino]-etoxi}-etoxi)-propanoato de N-succinimidilo o SM(PEG)₂ ;



como el succinato de maleimidoetilo y de N-succinimidilo ;



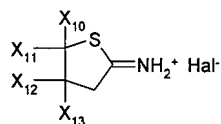
como el 4-(4-maleimidofenil)butanoato de N-succinimidilo o



como el 3-maleimidobenzoato de N-succinimidilo.

Agentes de modificación que permiten introducir grupos tioles

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



en la que :

- Hal representa un átomo de halógeno ;
- X_{10} representa un átomo de halógeno o el grupo COOX_{14} , nitro, alquilo(C_1 - C_8) no sustituido o halogenado, alcoxi(C_1 - C_8) no sustituido o halogenado, alqueno(C_2 - C_8) no sustituido o halogenado, alquino(C_2 - C_8) no sustituido o halogenado, cicloalquilo(C_3 - C_8) no sustituido, arilo

no sustituido o sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados entre amino, átomo de halógeno, grupo alquilo(C₁-C₈) no sustituido o halogenado, alcoxi(C₁-C₈) no sustituido o halogenado ;

- cada uno de los X₁₁, X₁₂, X₁₃ representa independientemente un átomo de hidrógeno o bien puede representar X₁₀ ;

o X₁₀ y X₁₁ forman juntos un ciclo alquilen(C₂-C₅), no sustituido o sustituido con uno a cinco grupos alquilo(C₁-C₄);

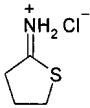
o X₁₀ o X₁₁ forman junto con X₁₂ un ciclo alquilen(C₁-C₅), no sustituido o sustituido con uno a cinco grupos alquilo(C₁-C₄);

y X₁₄ es -H o un grupo alquilo(C₁-C₈);

o X₁₀=X₁₁=X₁₂=X₁₃=H.

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

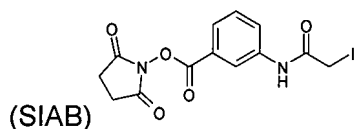
X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	Hal
Me	H	H	H	Cl
Ph	H	H	H	Cl
t-Bu	H	H	H	Cl
Me	Me	H	H	Cl
(-CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₂ -)		H	H	Cl
H	(-CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₂ -)		H	Cl
Et	H	H	H	Br
Et	Me	H	H	Cl
-CH-CH ₂ -CH	H	H	H	Cl
Me	H	Me	H	Cl
H	H	Me	Me	Cl
Ph	Me	H	H	Cl
4-ClPh	H	H	H	Cl
3-furanilo	H	H	H	Cl
i-Pr	H	H	H	Cl
Me	Me	Me	Me	Cl
C ₆ H ₁₁	H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



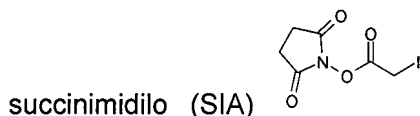
Un ejemplo de iminotiolano preferido es el siguiente :

Agentes de modificación que permiten introducir grupos haloacetamido

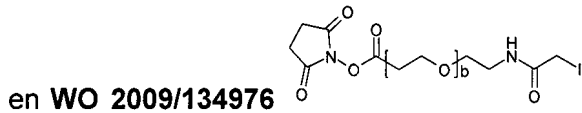
Otro ejemplo de agente de modificación es el 4-(N-yodoacetil)-aminobenzoato de succinimidilo



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



succinimidilo (SIA), el N-bromoacetato de succinimidilo (SBA), o el 3-(N-bromoacetamido)propionato de succinimidilo (SBAP) o un compuesto pegilado similar descrito



en **WO 2009/134976**, siendo **b** tal como se ha descrito anteriormente.

- 5 Las Figuras 1 y 2 ilustran la modificación de un grupo amino de un agente de selección de la diana por el SPDP o bien por el iminotiolano preferido anteriormente.

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

- 10 (–SSR), especialmente de tipo piridildisulfuros , en el caso en que GCR1 representa –SH. Igualmente, se pueden introducir sobre el agente de selección de la diana grupos GCR2 tiol (–SH), por ejemplo, con un iminotiolano, en el caso en que GCR1

representa disulfuro (es decir GCR1= –SZ_a con Z_a≠H, por ejemplo Z_a=). Se pueden modificar igualmente estos grupos GCR2 tiol (–SH) en grupos GCR2 disulfuros (–SSR),

principalmente de tipo piridisulfuros por reacción con los disulfuros

- 15 aromáticos correspondientes . En los dos casos, el enlace covalente que se forma por reacción entre GCR1 y GCR2 es un enlace disulfuro escindible.

Es igualmente posible, en el caso en que GCR1 representa –SH, introducir en la superficie del

agente de selección de la diana grupos GCR2 de tipo maleimido () o haloacetamido (por

- 20 ejemplo, bromo- o yodoacetamido). En este caso, el enlace covalente que se forma por reacción entre GCR1 y GCR2 es un enlace sulfuro no escindible.

Así,

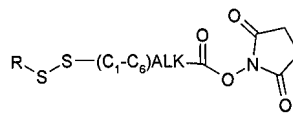
- 25 > en presencia de un derivado de fórmula (I) que comprende un grupo químico reactivo GCR1 de tipo –SZ_a, el agente de selección de la diana comprende:

- grupos químicos disulfuros en el caso en que GCR1 representa $-SH$;
- grupos químicos tioles en el caso en que GCR1 representa $-SZ_a$ con $Z_a \neq H$;
- grupos químicos maleimido o haloacetamido en el caso en que GCR1 representa $-SH$;

5 ➤ en presencia de un derivado de fórmula (I) que comprende un grupo químico reactivo GCR1 de tipo $-C(=O)-Z_bR_b$, se hace reaccionar el derivado de fórmula (I) con las funciones amino del agente de selección de la diana, principalmente los grupos ϵ -amino portados por las cadenas laterales de los residuos de lisina (Lys) de un anticuerpo.

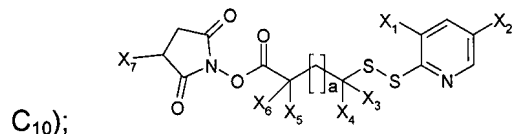
10 Más particularmente,

➤ cuando el grupo químico reactivo GCR1 es de tipo -SH, y el agente de selección de la diana presenta funciones amino, principalmente grupos ϵ -amino portados por las cadenas laterales de los residuos de lisina de un anticuerpo, éste se modifica mediante un agente de

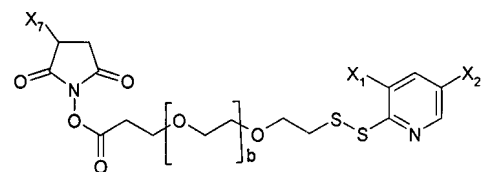


modificación elegido entre un compuesto de fórmula:

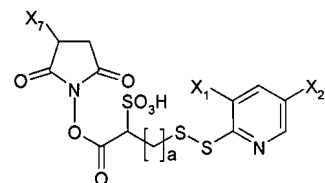
15 representa un grupo alquilo(C₁-C₆), arilo, heteroarilo, cicloalquilo(C₃-C₇), heterocicloalquilo(C₄-



, un análogo pegilado de fórmula :

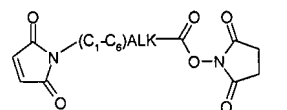


o un análogo sulfónico de fórmula

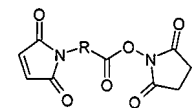


en los cuales X_3, X_4, X_5, X_6 representan H o un grupo

alquilo(C₁-C₆), X₁ y X₂ representan -H, -CONX₈X₉, -NO₂, X₈ y X₉ representan H o un grupo
alquilo(C₁-C₆), X₇ representa -SO₃⁻M⁺ o H o bien un grupo amonio cuaternario y a designa un
número entero que va de 0 a 4 y b designa un número entero que va de 0 a 2.000 ; o entre
4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimido;

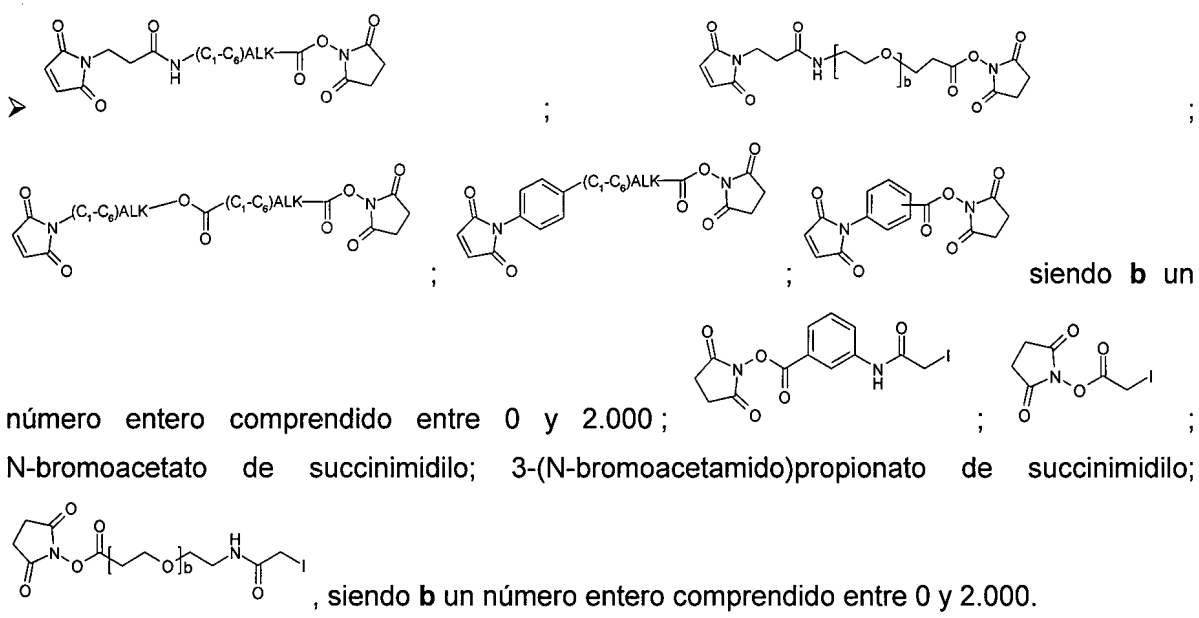


4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo;

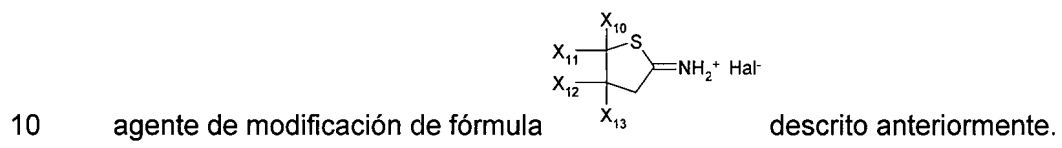


en la que R representa un grupo $-(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_n$ -ciclohexil-, -ciclohexil- $(CH_2)_n-$

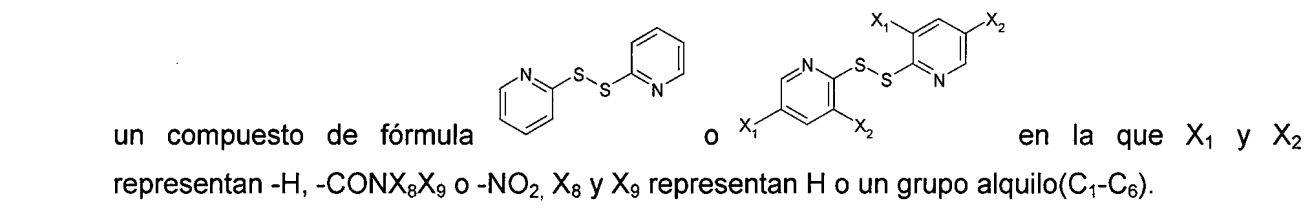
y n representa un número entero que va de 1 a 10 ;



➤ cuando el grupo químico reactivo GCR1 es de tipo -SZ_a con Z_a≠H, y el agente de selección de la diana presenta funciones amino, principalmente los grupos ε-amino portados por las cadenas laterales de los residuos de lisina de un anticuerpo, éste se modifica mediante el



➤ cuando el grupo químico reactivo GCR1 es de tipo -SH, y el agente de selección de la diana presenta funciones tiol, principalmente después de la introducción de cisteínas por mutación o por modificación química de un agente de selección de la diana que presenta funciones amino, el agente de selección de la diana se modifica de forma que sus funciones tiol se transformen en funciones disulfuros. Se puede utilizar, por ejemplo, un agente de modificación elegido entre



20 La Tabla II siguiente ilustra la modificación de un grupo amino de un agente de selección de la diana según los métodos anteriores. Se utilizan para simplificar las abreviaturas siguientes:

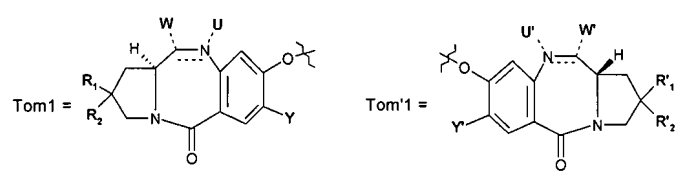
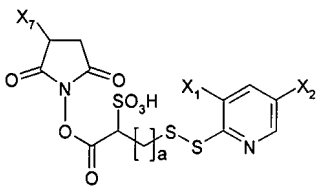
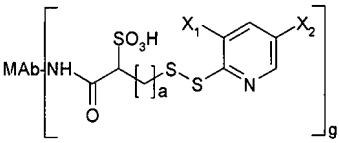
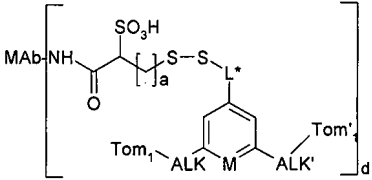
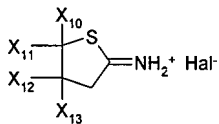
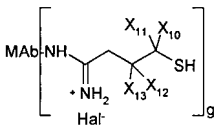
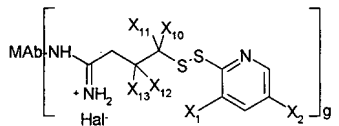
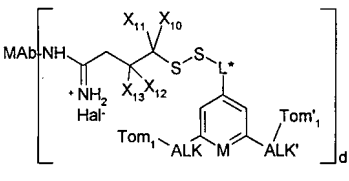
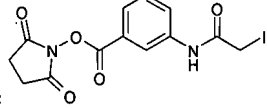
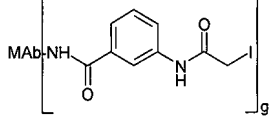
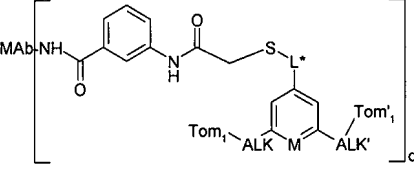
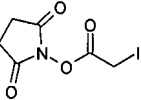
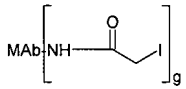
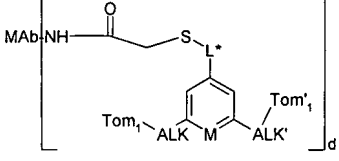
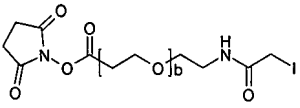
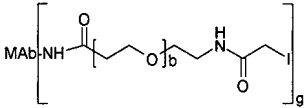
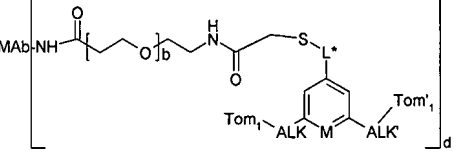


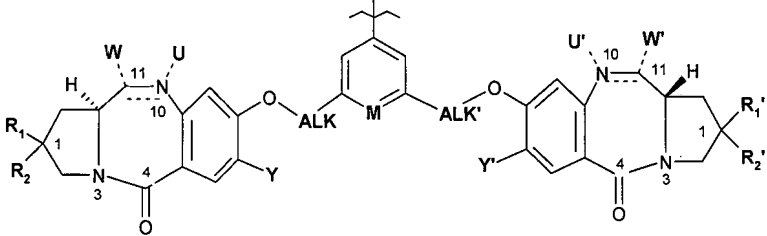
Tabla II: ejemplos de modificaciones del agente de selección de la diana cuando GCR1=SZ_a

agente de modificación	ejemplo después de reacción sobre un grupo amino, especialmente lisina, de un anticuerpo calificado MAb	conjugado
SPDP= 		
SPDB= 		
SMCC= 		
sulfo-SMCC= 		
SNPP= 		

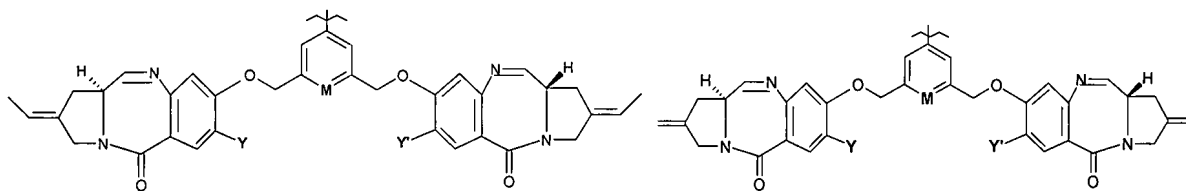
agente de modificación	ejemplo después de reacción sobre un grupo amino, especialmente lisina, de un anticuerpo calificado Mab	conjugado
		
	 	
SIAB= 		
SIA= 		
		

g : número de funciones GCR2 sobre un agente de selección de la diana modificado ; d : número de dímero(s) de pirrolo[1,4]benzodiazepina sobre el agente de selección de la diana Mab
L* representa -L₁-N(Q-CH₂CH₂O)_k-CH₂CH₂-G)-L₂-

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

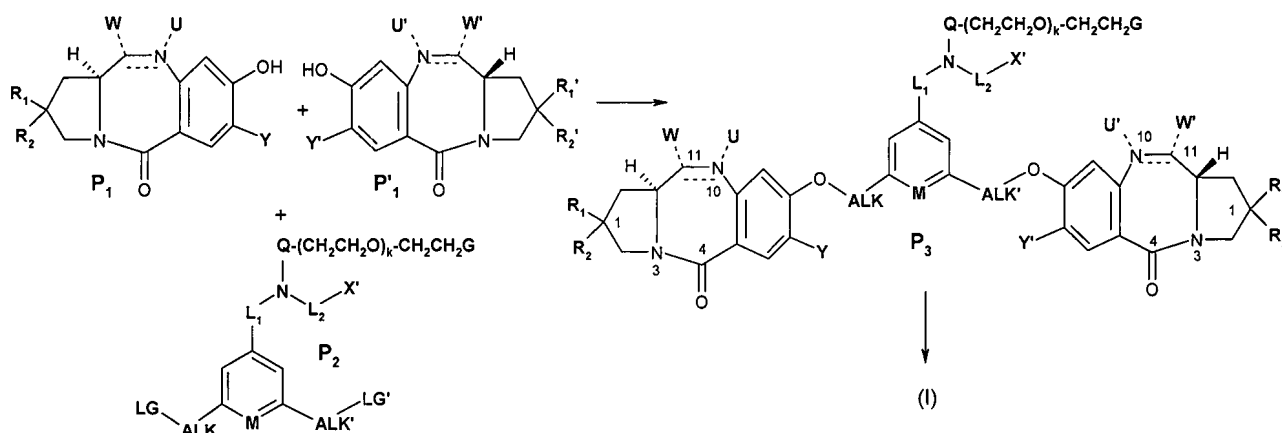


Más particularmente, el agente de selección de la diana es un anticuerpo. Más particularmente, el dímero tiene por fórmula:



5 Procedimiento de preparación de los compuestos de fórmula general (I)

Los compuestos de fórmula (I), pueden prepararse según el Esquema 1:



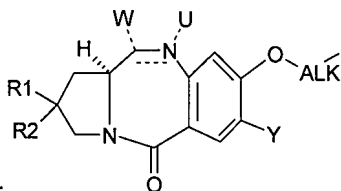
Esquema 1

- 10 Se hacen reaccionar juntos los compuestos P_1 , P'_1 y P_2 para conducir a P_3 . LG y LG' designan un grupo saliente. Se designa con « grupo saliente » un átomo o un grupo de átomos que, en la reacción heterolítica entre P_2 y P_1 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⁺. Los compuestos intermedios P_2 forman igualmente parte de la invención.
- 15

- En la preparación de un compuesto de fórmula (I) que comprende el grupo GCR1, X' puede representar dicho grupo GCR1 en cuyo caso P_3 representa un compuesto de fórmula (I). X' puede ser también un precursor de dicho grupo GCR1 de tipo -SZ_a o bien -C(=O)Z_bR_b y en este caso, es necesario transformar X' en GCR1 mediante una o varias reacciones químicas. Según una variante, la transformación X' → GCR1 puede efectuarse también sobre P_2 .
- 20

- Así, para la preparación de un compuesto P_3 (o según la variante P_2) para el que Z_a=H, se prefiere introducir un grupo X'=-SZ_a para el que Z_a=-Salquilo(C₁-C₆) utilizando el precursor de conector correspondiente, y reducir la función disulfuro -SSalquilo(C₁-C₆) en función tiol -SH. Se puede utilizar para esto por ejemplo la tris(2-carboxietil)fosfina: véase a este propósito Burns J.A., et al., *J. Org. Chem.* **1991**, 56(8), 2648-2650. Esta transformación -SSalquilo(C₁-C₆) → -SH puede aplicarse principalmente a los compuestos n° 1 a 19 de la Tabla I.
- 25

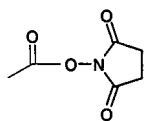
En el caso de la preparación de un compuesto de fórmula (I) a partir de P_3 según la transformación $X' \rightarrow GCR1$ tal que GCR1 representa el grupo $-SH$, se puede formar un compuesto P_3 tal que X' puede representar también el grupo $-SZ_a$ con



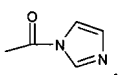
$Z_a =$

correspondiente del producto de adición de una función tiol sobre la función imina.

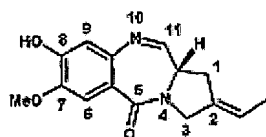
Asimismo, para la obtención de un compuesto de fórmula (I) que comprende un grupo $GCR1 = -C(=O)Z_bR_b$, es posible transformar un grupo $X' = -C(=O)Z_bR_b$ en un grupo $GCR1 = -C(=O)Z_bR_b$ mediante una o varias reacciones químicas. En particular, en el caso en el que $-$



$C(=O)Z_bR_b =$, se puede introducir a nivel de un compuesto P_3 (o según la variante P_2) el grupo $X' = -C(=O)O$ -alquilo(C_1-C_4) o $-C(=O)O$ -alilo que se transforma en grupo $-C(=O)OH$ el cual reacciona finalmente con el carbonato de N,N'-disuccinimidilo o NHS. La transformación $-COO$ alquilo/alilo en $-COOH$ puede realizarse por un tratamiento con una base tal como LiOH o un catalizador de paladio, por ejemplo tetraquis(trifenilfosfina)paladio en presencia de una amina « scavenger », por ejemplo morfolina. 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. Asimismo, en el caso en el que $-C(=O)Z_bR_b =$ , se puede introducir un grupo $-C(=O)Z_bR_b = -COOH$ que reacciona a continuación con el N,N'-carbonildiimidazol (JACS **1958**, 80, 4423; JACS **1960**, 82, 4596). Esta transformación $X' = -C(=O)Z_bR_b \rightarrow GCR1 = -C(=O)Z_bR_b$ puede aplicarse principalmente a los compuestos de los ejemplos 20 a 36 de la Tabla I.

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 representa(n) la tomaimicina de fórmula:

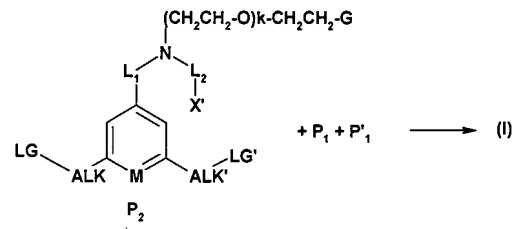


Tomaimicina

, 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

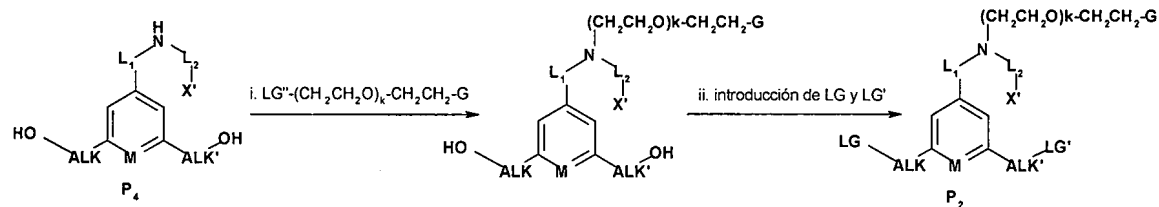
antitumor antibiotics E- and Z- tomaymycins”). Igualmente existen compuestos comerciales P_1/P'_1 . Para la introducción de los grupos W/W', la función imina ($\overset{\text{----}}{\text{---}}$ = enlace doble) es susceptible de añadir varios compuestos HW/HW' (por ej. H₂O o alcohol ROH).

5 **Caso en el que Q=enlace sencillo**



Esquema 2

Preparación de P_2

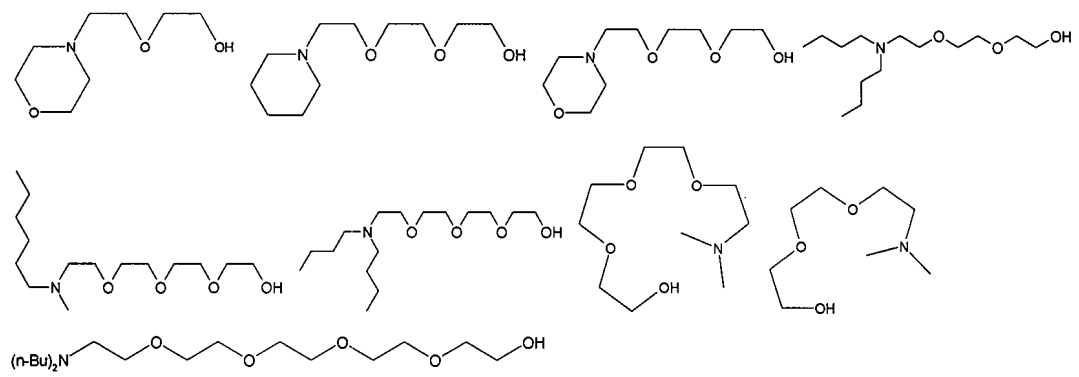


Esquema 3

i. reacción nucleófila entre la función amina secundaria –NH– de P_4 y un reactivo de fórmula $LG''-(CH_2CH_2O)_k-CH_2CH_2-G$ (LG'' =grupo saliente) en presencia de una base tal como por ej. K₂CO₃ en un disolvente polar tal como DMF o THF.

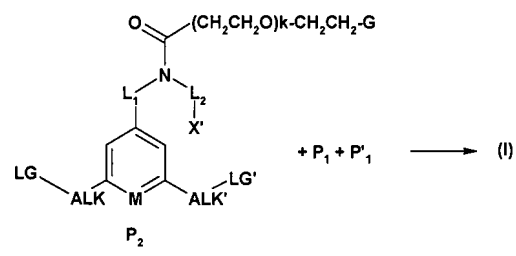
El reactivo $LG''-(CH_2CH_2O)_k-CH_2CH_2-G$ se obtiene a partir de un compuesto de fórmula $HO-(CH_2CH_2O)_k-CH_2CH_2-G$ reemplazando el grupo -OH por el grupo saliente LG'' mediante una o varias reacciones químicas conocidas por el experto en la técnica. Por ejemplo, en el caso en el que LG'' representa un grupo mesilato, se utiliza el cloruro de metanosulfonato en presencia de una base, tal como una amina terciaria (por ejemplo, TEA). En el caso en el que LG'' representa I, se sustituye el mesilato con I utilizando por ej. yoduro de sodio, según D. Marquis et al. *J. Org. Chem.* **1995**, 24, 7984-96.

Los PEG-alcoholes de fórmula $HO(CH_2CH_2O)_k-CH_2CH_2OCH_3$ están disponibles comercialmente (véase por ejemplo el catálogo de la empresa americana QuantaBioDesign, Ltd.). Otros PEG-alcoholes $HO(CH_2CH_2O)_k-CH_2CH_2OR$ con $R \neq Me$ están disponibles comercialmente o bien son accesibles a partir de $HO(CH_2CH_2O)_k-CH_2CH_2OH$ mediante una o varias reacciones químicas conocidas por el experto en la técnica. Asimismo, determinados compuestos para los que $G=NRR'$ y $k \geq 1$ están disponibles comercialmente, por ejemplo:



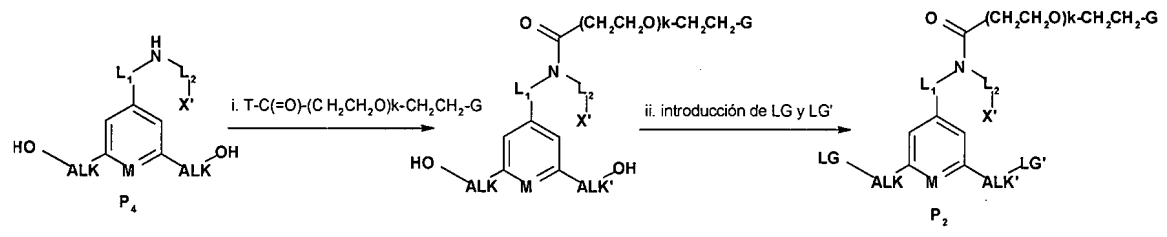
ii. introducción de **LG** y **LG'**. En el caso de un grupo mesilato, se utiliza CMS en presencia de una base, tal como una amina terciaria (por ej. TEA).

Caso en el que Q=C(=O)



Esquema 4

Preparación de P₂



Esquema 5

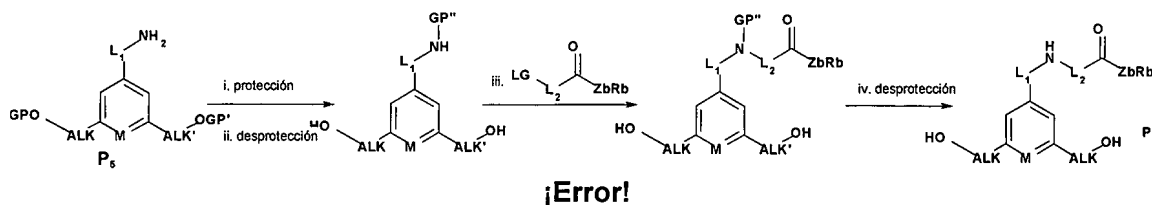
i. reacción de amidificación entre **P₄** y un derivado de ácido carboxílico de fórmula T-C(=O)-(CH₂CH₂O)_k-CH₂CH₂-G.

El derivado de ácido carboxílico puede ser un halogenuro de acilo (T=Hal). Según una variante, se utiliza un éster activado (por ej. T=ONHS) o bien el ácido carboxílico (T=OH) en presencia de un agente de acoplamiento. Los PEG-ácidos de fórmula HOC(=O)-(CH₂CH₂O)_k-CH₂CH₂OR pueden prepararse a partir de los PEG-alcoholes correspondientes de fórmula HO-(CH₂CH₂O)_k-CH₂CH₂OR, que están disponibles comercialmente para k= 1 a 11, por adición sobre el acrilato de sodio según J. Huskens, J.A. Peters, H. van Bakkum, *Tetrahedron* **1993**, 15, 3149-64. Es lo mismo cuando G es el grupo NRR' para k>=1 a partir de los compuestos correspondientes de fórmula H-(OCH₂CH₂)_k-CH₂CH₂NRR'. Asimismo, los compuestos HOC(=O)-(CH₂CH₂)-NRR' (k=0) están disponibles comercialmente.

ii. introducción de **LG** y **LG'**. En el caso de un grupo mesilato, se utiliza CMS en presencia de una base, tal como una amina terciaria (por ej. TEA).

Preparación de **P₄**

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

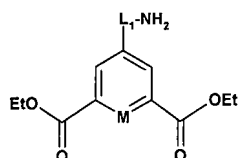


Esquema 6

i. introducción del grupo protector **GP''**. En el caso de un grupo nosilato, se utiliza el cloruro de 2-nitro-benceno-sulfonilo en presencia de una base tal como una amina terciaria (por ej. TEA) o piridina;

ii. desprotección de los grupos **GP** y **GP'**. Por ej. en presencia de ácido clorhídrico o de TFA cuando los grupos **GP** y **GP'** son TBDMS.

Según una variante, en el caso en el que **ALK=ALK'=-CH₂-**, **P₅** puede representar



La etapa de desprotección se reemplaza por una etapa de reducción de la función éster en función **-CH₂OH**, por ejemplo con borohidruro de sodio; se pueden aplicar para esto las condiciones de la reducción proporcionadas en las páginas 62-63 de **WO 2007/085930**. Como se describe más adelante, esta variante que consiste en utilizar un diéster y en aplicar una reducción puede generalizarse a otros **P₅**. Además, la reducción de las funciones éster puede realizarse a nivel de un **P₄** pero opcionalmente también según una variante, a nivel de un **P₅**.

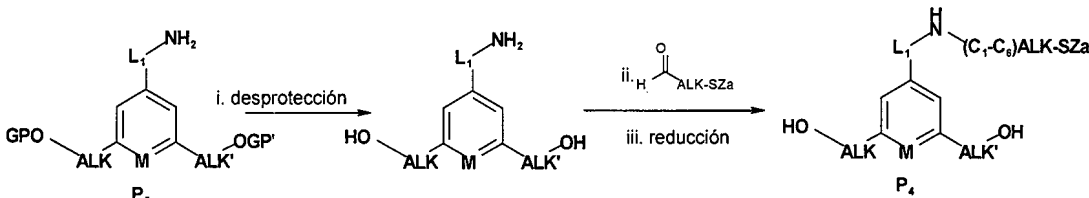
iii. reacción nucleófila entre la función amina protegida **-NH(GP'')** y un reactivo de fórmula **LG-L₂-C(=O)-Z_bR_b** en presencia de una base tal como por ej. **K₂CO₃** en un disolvente polar tal como DMF o THF.

Para el caso en el que **L₂=ALK(C₁-C₆)**, los ésteres de bromo-alquilo de fórmula **Br-ALK(C₁-C₆)-C(=O)-OMe** están disponibles comercialmente. Para el caso en el que **L₂=(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂-**, **LG** puede introducirse a partir de los PEG-alcoholes correspondientes de fórmula **HO-(CH₂CH₂O)_j-CH₂CH₂-C(=O)Z_bR_b**. Dichos compuestos están disponibles comercialmente o bien pueden obtenerse a partir de los PEG-dioles correspondientes de fórmula **HO-(CH₂CH₂O)_j-H**, los cuales están disponibles comercialmente para **j = 1 a 11** por adición sobre el acrilato de sodio según J. Huskens, J.A. Peters, H. van Bekkum, *Tetrahedron* **1993**, *15*, 3149-64.

iv. desprotección del grupo GP". Por ej. en presencia de tiofenol y de una base tal como el carbonato de cesio cuando GP" es el grupo nosilato.

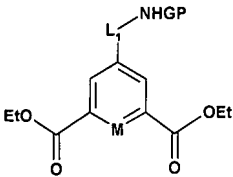
Caso en el que X' = -SZ₃

Caso en el que L₂ = ALK(C₁-C₆)



i. desprotección de los grupos protectores GP y GP', preferentemente en medio ácido, por ej. en presencia de ácido clorhídrico o de TFA cuando los grupos GP y GP' son TBDMS.

10 Según una variante, en el caso en el que ALK=ALK'=-CH₂-, P₅ puede representar

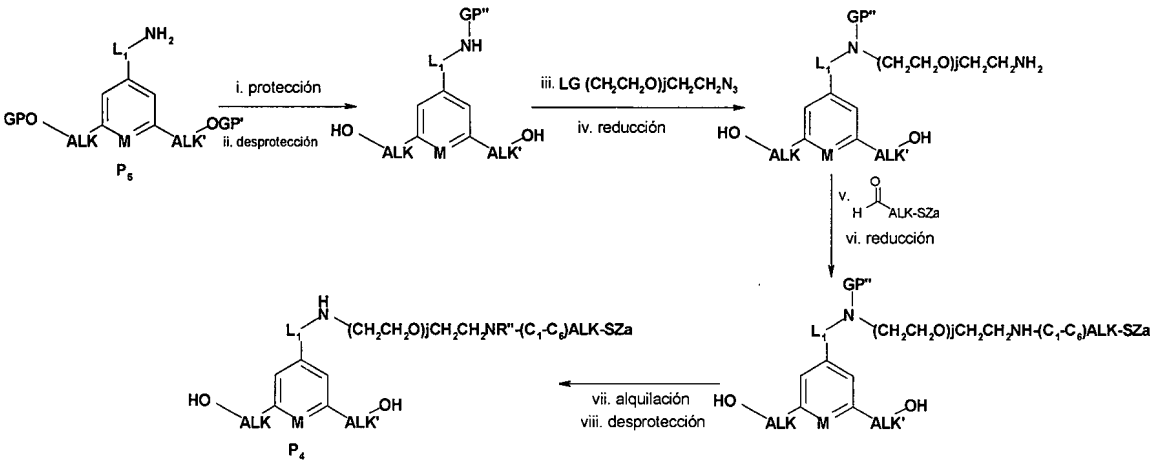


La etapa de desprotección de las funciones alcohol se reemplaza por una reacción de reducción de la función éster en función -CH₂OH, por ejemplo con borohidruro de sodio, seguido de una etapa de desprotección de la función amina; se pueden aplicar para esto las condiciones de la reducción proporcionadas en las páginas 62-63 de WO 2007/085930.

ii. aminación reductora con el aldehído de fórmula HC(=O)-ALK-SZa ;

iii. la imina intermedia se reduce *in situ* con un agente reductor como por ejemplo triacetoxiborohidruro de sodio según A.F. Abdel-Magid et al., J. Org. Chem. 1996, 61, 3849-62, preferentemente en ácido acético.

Caso en el que L₂ = -(CH₂CH₂O)_i-CH₂CH₂NR"-ALK-

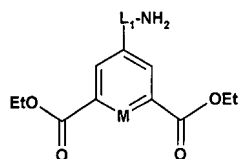


¡Error!

i. introducción del grupo protector GP". En el caso de un grupo nosilato, se utiliza el cloruro de 2-nitro-benceno-sulfonilo en presencia de una base tal como una amina terciaria (por ej. TEA) o piridina;

5 ii. desprotección de los grupos GP y GP'. Por ej. en presencia de ácido clorhídrico o de TFA cuando los grupos GP y GP' son TBDMS.

Según una variante, en el caso en el que $ALK=ALK'=-CH_2-$, P_5 puede representar



La etapa de desprotección se reemplaza por una etapa de reducción de la función éster en
10 función $-CH_2OH$, por ejemplo con borohidruro de sodio; se pueden aplicar para esto las condiciones de la reducción proporcionadas en las páginas 62-63 de **WO 2007/085930**.

iii. reacción nucleófila entre la función amina protegida $-NH(GP'')$ y un reactivo de fórmula LG-
(CH_2CH_2O)_j $CH_2CH_2N_3$ en presencia de una base tal como por ej. K_2CO_3 en un disolvente polar
tal como DMF o THF. Dichos compuestos pueden obtenerse según **WO 07/085930**, a partir de
15 los PEG-dioles correspondientes de fórmula $HO-(CH_2CH_2O)_{j+1}-H$, los cuales están disponibles comercialmente para $j=0$ a 10.

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

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

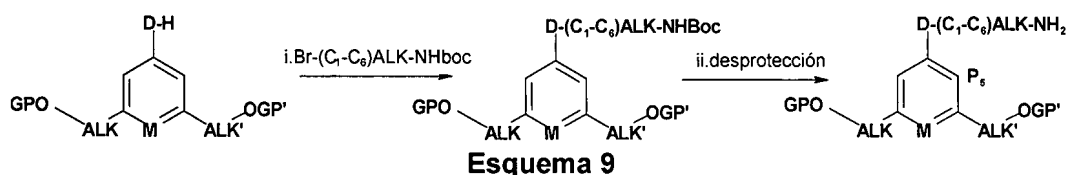
20 vi. la imina intermedia se reduce *in situ* con un agente reductor como por ejemplo triacetoxiborohidruro de sodio según A.F. Abdel-Magid et al., J. Org. Chem. **1996**, *61*, 3849-62, preferentemente en ácido acético.

vii. alquilación de la función amina secundaria.

viii. desprotección del grupo GP". Por ej. en presencia de tiofenol y de una base tal como el
25 carbonato de cesio cuando GP" es el grupo nosilato.

Preparación de P_5

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



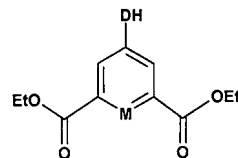
i. reacción nucleófila entre la función $-DH$ y una bromo-amina protegida con boc de fórmula $BrALK(C_1-C_6)-NHBoc$ en presencia de una base tal como por ej. K_2CO_3 en un disolvente polar tal como DMF o THF (véanse por ej. las condiciones en la página 63 de **WO 07085930**).

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

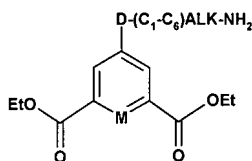
5

Según una variante, en el caso en el que $ALK=ALK'=-CH_2-$, se puede realizar la sustitución

nucleófila de la bromo-amina con un diéster de fórmula:



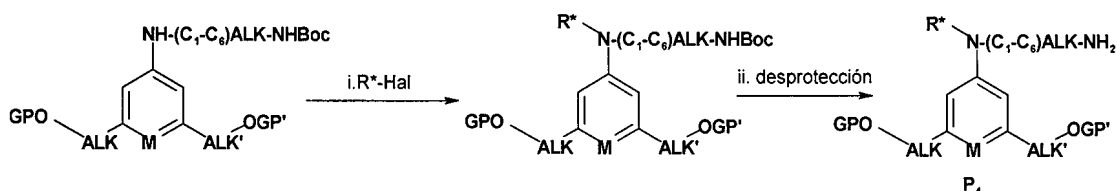
obtiene un compuesto P_5 de fórmula



que se utiliza tal cual para la preparación de P_4 .

10

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

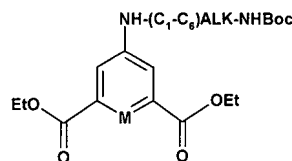


Esquema 9'

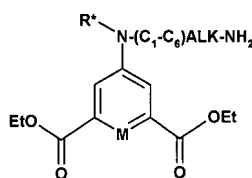
i. reacción nucleófila entre la función $-NH-$ y un halogenuro de alquilo de fórmula R^*-Hal con $R^* =$ alquilo(C_1-C_4) en presencia de una base tal como por ej. K_2CO_3 en un disolvente polar tal como DMF o THF.

Según una variante, en el caso en el que $ALK=ALK'=-CH_2-$, se puede realizar la sustitución

nucleófila del halogenuro de alquilo con un diéster de fórmula:



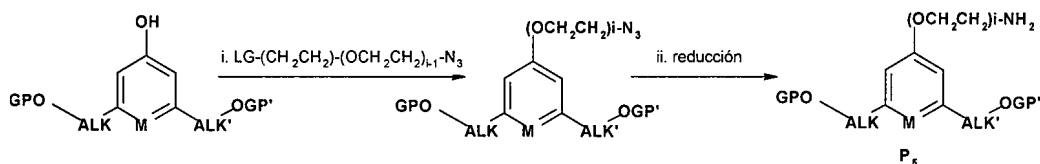
que se obtiene un compuesto P_5 de fórmula



que se utiliza tal cual para la preparación de P_4 .

20

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



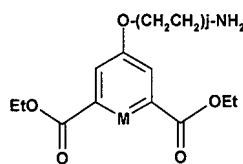
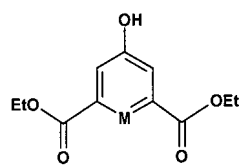
Esquema 10

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

ii. reducción del grupo azido por ejemplo por la trifenilfosfina en presencia de agua en un disolvente polar tal como THF.

Según una variante, en el caso en el que $ALK=ALK'=-CH_2-$, se puede realizar la sustitución

nucleófila del reactivo azido-PEG por el hidroxi-diéster de fórmula:



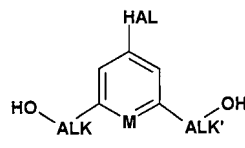
que se obtiene un compuesto P_5 de fórmula que se utiliza tal cual para la preparación de P_4 .

Caso en el que $L_1 = \text{enlace sencillo}$



Esquema 11

i. protección de los grupos alcoholes



P_5 puede obtenerse a partir del diol halogenado de fórmula . Un ejemplo de diol halogenado y de diol protegido correspondiente es el descrito en el Esquema 1 en la página 48 de **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. 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).

El experto en la técnica podrá inspirarse en las condiciones de operación de los ejemplos descritos a continuación que se proporcionan para los conectores L_1 y L_2 particulares y adaptarlos a otros conectores L_1 y L_2 .

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, opcionalmente tamponada, del agente de selección de la diana, opcionalmente modificado mediante un agente de modificación, y una disolución de un compuesto de fórmula (I) ;
- (ii) después separar opcionalmente el conjugado formado en la etapa (i) del compuesto de fórmula (I) y/o del agente de selección de la diana que no haya reaccionado y/o de los agregados que se formarían opcionalmente.

El grupo químico GCR1 del compuesto de fórmula (I) debe ser reactivo frente a los grupos químicos GCR2 presentes en el agente de selección de la diana principalmente frente a los grupos aminos presentes en el anticuerpo, habiéndose introducido dichos grupos químicos GCR2 llegado el caso con el agente de modificación, esto con el fin de asegurar la unión del compuesto de fórmula (I) al agente de selección de la diana por formación de un enlace covalente.

Según una variante, se separa en la etapa (ii) el conjugado que se ha formado en la etapa (i) del agente de selección de la diana que no haya reaccionado y de los agregados opcionalmente 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 formarían y se deja en la disolución el agente de selección de la diana que opcionalmente no haya reaccionado.

La disolución acuosa del agente de selección de la diana puede estar tamponada mediante al menos un tampón tal como por ejemplo fosfato de potasio o ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (tampón HEPES). El tampón depende de la naturaleza del agente de selección de la diana. 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 h. La reacción entre el agente de selección de

la diana 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 bien añadir 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.

El experto en la técnica dispone de diferentes técnicas cromatográficas 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 entiende por « agregados » las asociaciones que se pueden formar entre dos agentes de selección de la diana o más, habiendo sido o no modificados los agentes de selección de la diana por conjugación. Los agregados son susceptibles de formarse bajo la influencia de un gran número de parámetros tales como una concentración elevada de agente de selección de la diana en la 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.

anticuerpo

El anticuerpo (véase a este propósito, Janeway et al., « Immunobiology », 5ª edición, 2001, Garland Publishing, Nueva York) se podrá elegir entre los descritos principalmente en las solicitudes **WO 04043344**, **WO 08010101**, **WO 08047242**, **WO 05009369** (anti CA6). El anticuerpo puede ser principalmente monoclonal, policlonal o multiespecífico. Se puede tratar también de un fragmento de anticuerpo. Se puede tratar también de un anticuerpo murino, humano, humanizado o quimérico.

conjugado

Un conjugado comprende generalmente del orden de 1 a 10 dímero(s) de pirrolo[1,4]benzodiazepina unido(s) al agente de selección de la diana (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 de la diana 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 de la diana, el tiempo de reacción y la naturaleza del disolvente y del eventual codisolvente). La puesta en contacto del agente de selección de la diana y del dímero lleva a una mezcla que comprende: varios conjugados que se distinguen individualmente unos de otros por diferentes DAR; opcionalmente, el agente de selección de la diana que no haya reaccionado (en el caso de una reacción incompleta); opcionalmente 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 de la diana sea un anticuerpo, la espectroscopía UV puede ser un método utilizado para determinar la DAR. Este método se inspira en el presentado en Antony S. Dimitrov (ed), LLC, 2009, « Therapeutic Antibodies and Protocols », vol. 525, 445, Springer Science. Consiste en medir la absorbancia de una 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.

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 en la forma:

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

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

ecuaciones para las que:

- c_D y c_A designan 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 $e_{D LO2}$ designan respectivamente los coeficientes de absorción molares del dímero de pirrolo[1,4]benzodiazepina antes de conjugación a las dos longitudes de onda LO1 y LO2;
- $e_{A LO1}$ y $e_{A LO2}$ designan respectivamente los coeficientes de absorción molares del anticuerpo desnudo a las dos longitudes de onda LO1 y LO2.

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.

La resolución de estas dos ecuaciones lleva a:

5 $c_D = [(e_{A\ LO1} \times A_{LO2}) - (e_{A\ LO2} \times A_{LO1})] / [(e_{D\ LO2} \times e_{A\ LO1}) - (e_{A\ LO2} \times e_{D\ LO1})]$
 $c_A = [A_{LO1} - (c_D \times e_{D\ LO1})] / e_{A\ LO1}$

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
10 nm. La DAR media está comprendida preferentemente entre 1 y 10, preferentemente 1,5 y 7.

El conjugado se puede utilizar como compuesto anticanceroso. Por la presencia del agente de selección de la diana, el conjugado se vuelve muy selectivo frente a las células tumorales en vez de las células sanas. Esto permite dirigir el 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
15 cánceres sólidos o líquidos.
20

El conjugado se formula en forma de una disolución acuosa tamponada a una concentración comprendida generalmente 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.
25

[Ejemplos]

Método A: Cromatografía Líquida de Alta presión – Espectrometría de masas (LCMS)

Los espectros se han obtenido con un dispositivo Waters UPLC-SQD en modo de ionización por electropulverización positiva y/o negativa (ES+/-). Condiciones cromatográficas: columna:
30 ACQUITY BEH C18- 1,7 µm - 2,1x50 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 Líquida de Alta presión – Espectrometría de masas (LCMS)

35 Los espectros se han obtenido con un dispositivo Waters ZQ en modo de electropulverización positiva y/o negativa (ES+/-) con detector UV. DAD 200<LO<400 nm. Condiciones cromatográficas: columna: Phenomenex Kinetex C18 100A 3x50 mm diámetro de partículas 2,6 µm ; disolventes: A: H₂O (ácido fórmico al 0,1%). B: CH₃CN; temperatura de la columna: 50°C ;

caudal: 1 ml/min; gradiente (6 min): 6% de B durante 0,80 min ; de 6 a 100% de B en 3,9 min; 4,80 min: 100% de B; 5 min : 6% de B ; 6 min: 6% de B.

Método C: Cromatografía Líquida de Alta presión – Espectrometría de masas (LCMS)

- 5 Los espectros se han obtenido con un dispositivo Waters ZQ en modo de electropulverización positiva y/o negativa (ES+/-) con detector UV. DAD 200<LO<400 nm. Condiciones cromatográficas: columna: Columna Phenomenex Kinetex C18 3x100 mm diámetro de partículas 2,6 µm ; disolventes: A: H₂O (ácido fórmico al 0,1%). B: CH₃CN; temperatura de la columna: 50°C ; caudal: 0,8 ml/min; gradiente (8,2 min): 4% de B durante 0,15 min ; de 6% a 100% de B en 6,85 min; 7,1 min: 100% de B; 7,4 min: 4% de B ; 8,2 min: 4% de B.
- 10

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

- La desglicosilación es una técnica de digestión enzimática por medio de glicosidasas. 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 realizar sin desglicosilación previa. En los dos casos, los espectros de masas han sido obtenidos con un dispositivo Waters Xévo Q-ToF en modo de electropulverización positiva (ES+). Condiciones cromatográficas: columna Acquity UPLC Waters BEH 300 C4 2,1x150mm diámetro de las partículas 1,7µm ; disolventes: A :H₂O + 0,1% de ácido fórmico: B: CH₃CN + 0,1% de ácido fórmico; temperatura de la columna: 70°C: caudal 0,5 ml/min; gradiente (10 min): 20% de B durante 2 min 50s ; de 20 a 80 % de B en 2min 5s ; 8 min 50s: 80% de B; 8 min 55s : 20% de B; 10 min : 20% de B.
- 15
- 20

25

Método E: Cromatografía Líquida de Alta presión – Espectrometría de masas (LCMS)

- Los espectros se han obtenido con una cadena Waters UPLC-SQD en modo de ionización por electropulverización positiva y/o negativa (ES+/-) con detector UV. DAD 210<LO<400 nm. Condiciones cromatográficas: columna: ACQUITY UPLC BEH C18- 1,7 µm - 2,1x30 mm ; disolventes: A: H₂O (ácido fórmico al 0,1%). B: CH₃CN (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; de 50% a 100% de B en 0,3 min; 1,45 min: 100% de B; de 100% a 5% de B en 0,3 min; 2 min: 100% de B.
- 30

Método F: Cromatografía Líquida de Alta presión – Espectrometría de masas (LCMS)

- 35 Los espectros se han obtenido con una cadena Waters ZQ en modo de electropulverización positiva y/o negativa (ES+/-) con detector UV. DAD 200<LO<400 nm. Condiciones cromatográficas: columna: XSelect CSH Waters C18 3x75 mm diámetro de partículas 3,5 µm ; disolventes: A: H₂O (ácido fórmico al 0,1%). B: CH₃CN (ácido fórmico al 0,1 %); temperatura de

la columna: 50°C ; caudal: 0,8 ml/min; gradiente (6 min): 6% de B durante 0,80 min ; de 6 a 100% de B en 3,9 min; 4,80 min: 100% de B; 5 min : 6% de B ; 6 min: 6% de B.

Método G: Cromatografía Líquida de Alta presión – Espectrometría de masas (LCMS)

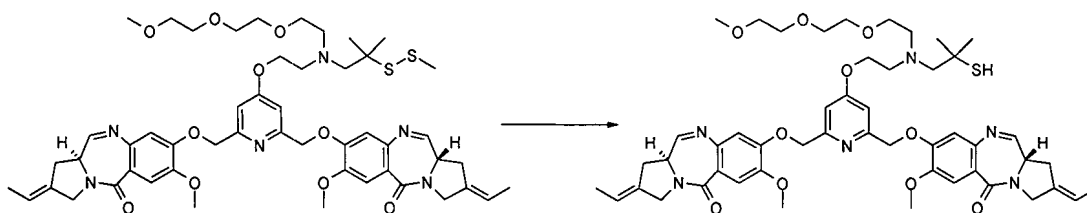
- 5 Los espectros se han obtenido con un dispositivo Waters UPLC-SQD en modo de ionización por electropulverización positiva y/o negativa (ES+/-). Condiciones cromatográficas: columna: ACQUITY BEH C18- 1,7 μ m - 2,1x50 mm ; disolventes: A: H₂O (ácido fórmico al 0,1%). B: CH₃CN (ácido fórmico al 0,1 %); temperatura de la columna: 50°C ; caudal: 0,8 ml/min; gradiente (2,5 min): de 5% a 100% de B en 1,8 min; 2,40 min: 100% de B; 2,45 min: 100% de B; de 100 a 10 5% de B 0,05 min.

Se utiliza el anticuerpo hu2H11 (denominado también hu53 2H11 en la página 15 de **WO 2008010101** ; se trata de un anticuerpo que comprende una Vh que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°24) o el anticuerpo hu2H11R35R74 obtenido por mutagénesis dirigida de hu53 2H11 (referenciado en la página 20 de **WO 2011039721** ; se trata de un anticuerpo que comprende una Vh que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°18 y una VI que tiene la secuencia SEQ N°16).

Capítulo 1 : Nuevos derivados de tomamicina

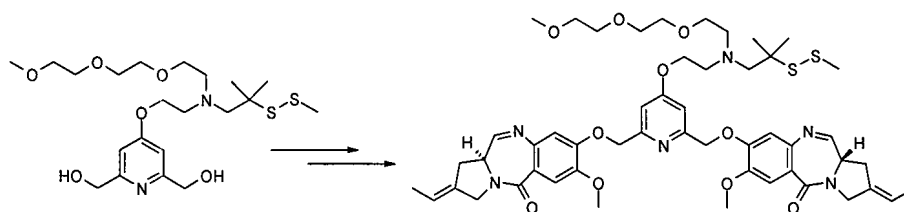
Ejemplo 1:

- 20 **1.1. 4-{2-[{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-(2-metil-(2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina**



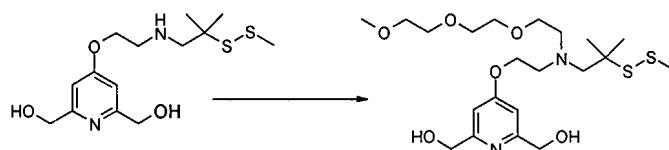
- A 20 mg de 4-{2-[{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina en disolución en 900 μ L de MeOH y 400 μ L de DMF, se añade una disolución de 17,5 mg de hidrocloreuro de tris(2-carboxietil)fosfina y de 15,8 mg de NaHCO₃ en 370 μ L de agua. La mezcla obtenida se agita 1 h a TA, se concentra bajo PR y se purifica por cromatografía flash en sílice (Sílice Interchrom Puriflash 15/35U 2G), utilizando un gradiente de 0 a 10% de MeOH en una mezcla DCM/acetonitrilo 9:1. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen así 7 mg de 4-{2-[etil-(2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina: LC/MS (A): tr = 1,06 min; [M+H]⁺: m/z 941; [M - H₂O + H]⁺: m/z 959.

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



- 5 A una disolución de 30 mg de 4-{2-[{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-(hidroxi metil)-piridina y de 65,5 μL de diisopropiletilamina en 200 μL de DCM enfriada a -20°C , se añaden 19,4 μL de CMS. Después de 20 minutos de agitación, la mezcla se hidroliza y la fase orgánica se lava con agua y después se seca sobre MgSO_4 y se concentra bajo PR. El residuo así obtenido (36 mg) en disolución en 400 μL de DMF se añade a
- 10 una disolución de 26 mg de tomamicina en 425 μL de DMF, así como 39,6 mg de K_2CO_3 y 15,8 mg de KI. La mezcla se agita 12 h a 30°C y se hidroliza hasta la precipitación. El insoluble se elimina por filtración sobre frit, se lava con DCM y las fases orgánicas reunidas se concentran bajo PR y se purifican por cromatografía flash en sílice (Analogix Super Flash SiO_2 SF25-8g) utilizando un gradiente de 0 a 10% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto
- 15 investigado se reúnen, se concentran bajo PR, se recogen en una mezcla dioxano/agua 1/1 y se concentran de nuevo bajo PR. Se obtienen así 23 mg de 4-{2-[{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c] [1,4] benzodiazepin-5-ona-8-iloimetil]-piridina. RMN ^1H (500 MHz, CLOROFORMO-d): señales anchas: 1,20 a 1,78 (m, 12 H); 2,40 (s, 3 H); 2,70 a 3,10 (m, 10 H); 3,34 (m, 4 H); 3,49 a 3,70 (m, 8 H); 3,71 (s, 3 H); 3,91 (m, 2 H); 4,00 (s, 6 H); 4,27 (m, 4 H); 5,27 (m, 4 H); 5,60 (m, 2 H); 6,86 (s, 2 H); 7,00 (m, 2H); 7,56 (s, 2 H); 7,65 (d, $J=4,4$ Hz, 2 H) . LC/MS (A) : Tr = 0,81 min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 987.
- 20

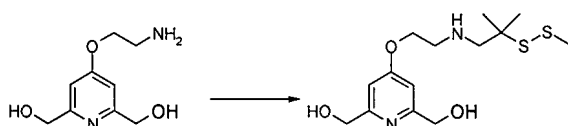
1.3. 4-{2-[{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-(hidroxi metil)-piridina



- A una disolución de 100 mg de 4-{2-(2-metil-2-metildisulfanil-propilamino)-etoxi}-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina en 2 mL de DMF se añaden 99 mg de 1-yodo-2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etano (B.Ben Aroya Bar Nir, J.F.Kadla *Carbohydrate Polymers*, 2009, 76, 60-67) y 54 mg de K_2CO_3 . Después de 12 h a 60°C , a la mezcla se añaden 40 mg de 1-yodo-2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etano y 55 mg de K_2CO_3 adicionales. La mezcla obtenida se agita 24 h adicionales a 80°C . Después de concentrar bajo PR, el bruto así obtenido se pone en disolución en un mínimo de
- 30

MeOH y se deposita sobre Mega BE-SCX, 1GM 6ML (Varian). Después de lavar la fase con MeOH, el producto de interés se eluye con una disolución de amoníaco 2N en MeOH. La fase MeOH se concentra bajo PR y se redeposita sobre Mega BE-SCX, 2GM 12ML (Varian) según el mismo protocolo. Las fases metanol / NH₃ se concentran bajo PR y el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en sílice (Merck SuperVarioFlash 10g columna, Si60 15-40 μm), utilizando un gradiente de 0 a 10% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen así 30 mg de 4-[2-[[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,27 (s, 6 H); 2,40 (s, 3 H); 2,75 (s, 2 H); 2,80 (t, J=5,9 Hz, 2 H); 3,00 (t, J=5,9 Hz, 2 H); 3,23 (s, 3 H); 3,40 (m, 2 H); 3,47 a 3,55 (m, 8 H); 4,12 (t, J=5,9 Hz, 2 H); 4,45 (d, J = 5,9 Hz, 4 H); 5,30 (t, J = 5,9 Hz, 2 H); 6,85 (s, 2 H). LC/MS (A): tr = 0,44 min; [M+H]⁺: m/z 479; [M-H+CO₂H]⁻: m/z 523.

1.4. 4-[2-(2-metil-2-metildisulfanil-propilamino)-etoxi]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina

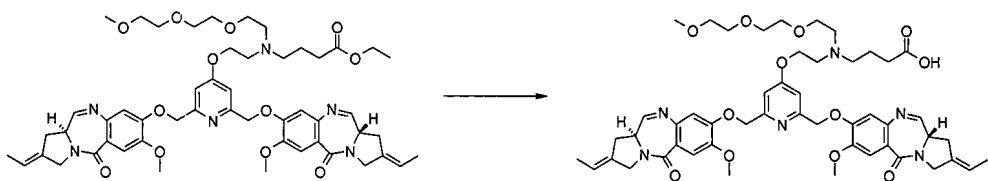


A una suspensión de 390 mg de 4-[2-amino-etoxi]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (preparada después de la desprotección del grupo boc de la 4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina descrita en la página 101 de **WO 07085930**) en 2 mL de THF, se le añaden 270 μL de 2-(metilditio)-isobutiraldehído y 730 μL de isopropóxido de titanio. Después de 20 min, se añaden 270 μL de 2-(metilditio)-isobutiraldehído y 730 μL de isopropóxido de titanio adicionales y la mezcla se agita 2 h a TA. A la mezcla se añaden 6 mL de etanol, se agita 20 minutos a TA y se le añaden 124 mg de cianoborohidruro de sodio. Después de 45 min de agitación, se añaden 124 mg de cianoborohidruro de sodio adicionales y después de 1 hora de agitación, la mezcla se concentra bajo 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 5 M, se extrae 3x con DCM y las fases orgánicas reunidas se concentran bajo PR. Se obtienen 322 mg de 4-[2-(2-metil-2-metildisulfanil-propilamino)-etoxi]-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 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; [M+H]⁺: m/z 347.

Ejemplo 2

2.1. Ácido 4-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoico

5



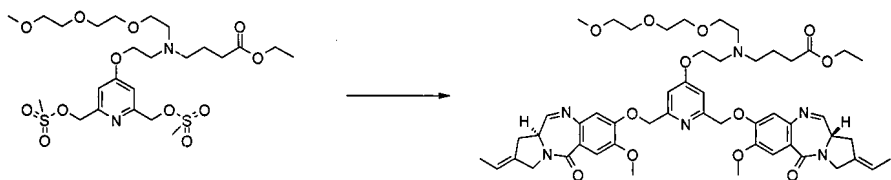
10

A una disolución de 28 mg de 4-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoato de etilo en 527 µl de THF y 61 µl de agua se añaden 32 µl de una disolución acuosa 1 M de litina. La mezcla se agita 1h30 a TA y se añaden de nuevo 5 µl de una disolución acuosa 1 M de litina. Después de agitar 1h30 a TA, la mezcla se acidifica a un pH cercano a 3 por adición de 800 µl de tampón fosfato de potasio (pH=3) y se extrae 5x con DCM. Las fases orgánicas se reúnen, se secan sobre MgSO₄, se concentran bajo PR y se purifican por cromatografía flash en sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF10-4 g) utilizando un gradiente de 3 a 20% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 10,2 mg de ácido 4-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoico. LC/MS (B): tr = 3,08min ; [M+H]⁺: m/z 939.

15

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

20

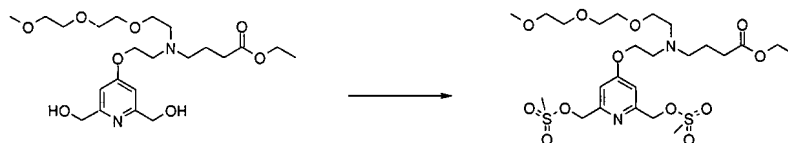


25

A una disolución de 50,4 mg de (S)-2-et-(E)-iliden-8-hidroxi-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona en 4 ml de DMF se añaden 77 mg de K₂CO₃, 30,7 mg de yoduro de potasio y 67 mg de 4-([2-(2,6-bis-metanosulfoniloximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butirato de etilo. La mezcla se calienta 18 h a 30°C, se lleva a TA, se filtra sobre una membrana de 0,45 µm, se concentra bajo PR y se purifica por cromatografía flash en sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF15-12g), utilizando un gradiente de 0 a 10 % de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 51 mg de 4-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoato de etilo. LC/MS (B): tr = 3,20 min; [M+H]⁺: m/z 967.

30

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



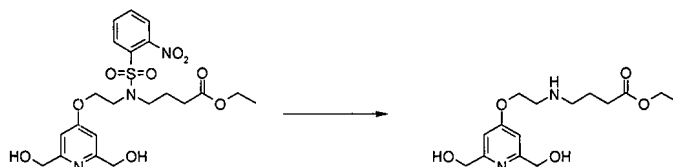
- 5 A una disolución de 51 mg de 4-([2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoato de etilo en 5 ml de DCM, previamente enfriada a -25°C, se añaden 110 µl de diisopropiletilamina y 34 µl de CMS. La mezcla se agita 1 h a -15°C y se lava con 5 ml de agua. La fase acuosa se extrae con 5 ml de DCM. Las fases orgánicas se reúnen, se secan sobre MgSO₄, y se concentran bajo PR. Se obtienen 69 mg de 4-([2-(2,6-bis-metanosulfoniloximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butirato de etilo. LC/MS (B): tr = 2,87 min; [M+H]⁺: m/z 615.
- 10

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



- 15 A una disolución de 180 mg de 4-([2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoato de etilo en 18 ml de acetonitrilo se añaden 207 mg de 1-yodo-2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etano y 192 µl de diisopropiletilamina. La mezcla se calienta 3 días a 80°C, se concentra bajo PR y se purifica por cromatografía flash en sílice (Merck SuperVarioFlash 15 g columna, Si60 15-40 µm), utilizando una mezcla DCM / MeOH / agua (40/5/0,5). Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 51 mg de 4-([2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoato de etilo. LC/MS (B): tr = 0,70 min; [M+H]⁺: m/z 459.
- 20

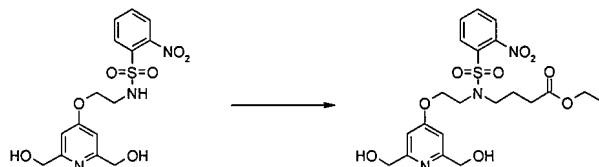
2.5. 4-([2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoato de etilo



- 25 A una disolución de 390 mg de 4-([2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-butanoato de etilo en 10 ml de acetonitrilo, bajo argón, se añaden 766 mg de carbonato de cesio y 160 µl de tiofenol. La mezcla se agita 17 h a TA y se filtra sobre vidrio fritado porosidad 4. La torta se lava con AcOEt y el filtrado se concentra bajo PR y se purifica en cartucho Mega BE-SCX, 2GM 12ML (Varian), utilizando un lavado con MeOH y un desprendimiento del producto esperado con una disolución de amoníaco 2 N en MeOH. Las
- 30

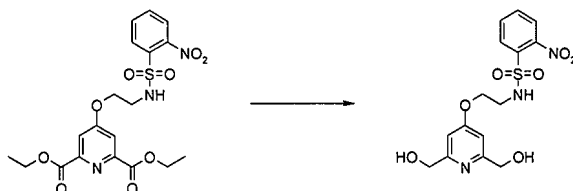
fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 183 mg de 4-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-butanoato de etilo. LC/MS (B): $t_r = 0,68$ min; $[M+H]^+$: m/z 313.

5 **2.6. 4-[[2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-butanoato de etilo**



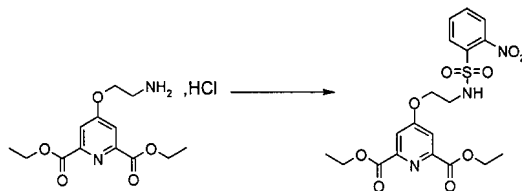
10 A una disolución de 767 mg de N-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-2-nitro-bencenosulfonamida en 15 ml de DMF bajo argón, se añaden 344 μ l de 3-bromo-butirato de etilo y 1,38 g de K_2CO_3 . La mezcla se agita aproximadamente 20 h a 40°C y se filtra sobre vidrio fritado porosidad 4. La torta se lava con AcOEt y el filtrado se concentra bajo PR. El bruto se purifica por cromatografía flash en sílice (Merck SuperVarioPrep 90 g columna, Si60 15-40 μ m), utilizando un gradiente de 0 a 10 % de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 395 mg de 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-butanoato de etilo. LC/MS (B): $t_r = 2,72$ min; $[M+H]^+$: m/z 498; $[M+HCO_2H-H]^+$: m/z 542.

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



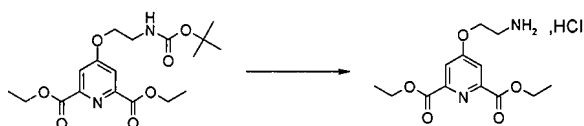
20 A una disolución de 1,3 g de 4-[2-(2-nitro-bencenosulfonilamino)-etoxi]-piridina-2,6-dicarboxilato de dietilo en 200 ml de etanol, se añaden sucesivamente 315 mg de borohidruro de sodio y 941 mg de $CaCl_2$. La mezcla se agita 1h30 a TA y se le añaden 50 ml de agua. El etanol se elimina bajo PR y se añaden 50 ml de agua al residuo obtenido; la fase acuosa se extrae 3x con AcOEt. Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una disolución saturada de NaCl, se secan sobre
25 $MgSO_4$, y se concentran bajo PR. Se obtienen 1,06 g de N-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-2-nitro-bencenosulfonamida. LC/MS (A): $t_r = 0,57$ min; $[M+H]^+$: m/z 384.

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



A una disolución de 957 mg de monohidrocloruro de 4-(2-amino-etoxi)-piridina-2,6-dicarboxilato de dietilo en 30 ml de DCM y 734 μ l de piridina, previamente enfriada a aproximadamente 5°C, se añaden 798 mg de cloruro de 2-nitrobencenosulfonilo. La mezcla se lleva a TA y se agita 2 h. Se le añaden 244 μ l de piridina y 665 mg de cloruro de 2-nitrobencenosulfonilo adicionales y la agitación se continúa durante 15 h. La mezcla se lava con 25 ml de agua y la fase acuosa se extrae 2x con 25 ml de DCM. Las fases orgánicas se reúnen, se secan sobre MgSO_4 , se concentran bajo PR y se purifican por cromatografía flash en sílice (Merck EasyVarioPrep 150 g columna, Si60 15-40 μ m), utilizando un gradiente de 0 a 10 % AcOEt en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 960 mg de 4-[2-(2-nitro-bencenosulfonilamino)-etoxi]-piridina-2,6-dicarboxilato de dietilo. RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): 1,35 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H); 3,41 (t, $J = 5,2$ Hz, 2 H) ; 4,22 (t, $J = 5,2$ Hz, 2 H) ; 4,39 (q, $J = 7,2$ Hz, 4 H); 7,50 (s, 2 H); 7,80 (m, 2 H); 7,92 (m, 1 H); 8,04 (m, 2 H); 8,40 (m, 1 H). LC/MS (C) : tr = 3,50 min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 468.

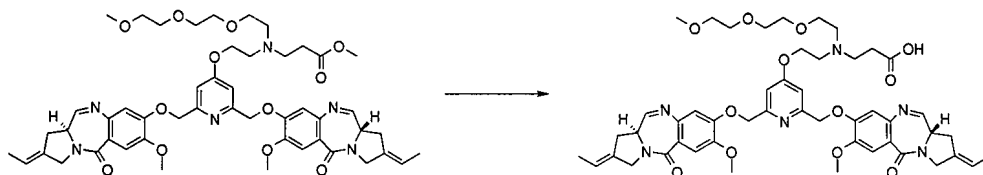
2.9. 4-(2-Amino-etoxi)-piridina-2,6-dicarboxilato de dietilo, monohidrocloruro



A una disolución de 2,64 g de 4-(2-*tert*-butoxicarbonilamino-etoxi)-piridina-2,6-dicarboxilato de dietilo (descrito en la página 101 de **WO 07085930**) en 27 ml de dioxano se añaden 20,7 ml de ácido clorhídrico 4 N en dioxano. La mezcla se agita aproximadamente 20 h a TA y se concentra bajo PR. El residuo de la evaporación se recoge con aproximadamente 70 ml de dioxano y se concentra de nuevo bajo PR. La operación se repite 3x. La mezcla se recoge con 50 ml de *tert*-butil-metil-éter y la suspensión obtenida se filtra sobre vidrio fritado porosidad 4. La torta se lava con *tert*-butil-metil-éter y se seca en desecador bajo PR a TA. Se obtienen 2 g de 4-(2-amino-etoxi)-piridina-2,6-dicarboxilato de dietilo, monohidrocloruro. RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): 1,35 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H); 3,26 (m, 2H); 4,39 (q, $J = 7,2$ Hz, 4 H); 4,45 (m, 2 H); 7,77 (s, 2 H); 8,16 (m ancho, 3 H). LC/MS (C) : tr = 2,39 min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 283.

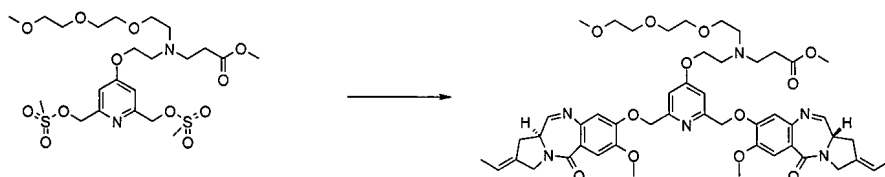
Ejemplo 3

3.1. Ácido 3-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-propanoico



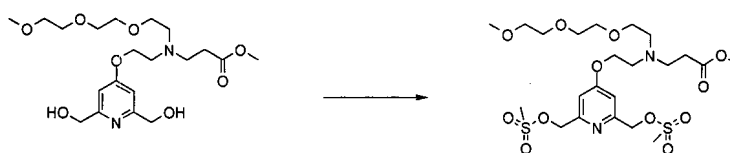
A una disolución de 30 mg de 3-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-propanoato de metilo en 576 µl de THF y 67 µl de agua se añaden 35 µl de una disolución acuosa 1 M de litina. La mezcla se agita 1h30 a TA, se recoge con 4 ml de DCM y se acidifica a un pH cercano a 3 por adición de 1 ml de tampón fosfato de potasio (pH=3). La mezcla se extrae 4x con DCM y las fases orgánicas se reúnen, se secan sobre MgSO₄, se concentran bajo PR y se purifican por cromatografía flash en sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF10-4 g) utilizando un gradiente de 10 a 20% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 13 mg de ácido 3-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-propanoico. LC/MS (B): tr = 3,07 min; [M+H]⁺: m/z 925

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



A una disolución de 84 mg de (S)-2-et-(E)-iliden-8-hidroxi-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona en 5 ml de DMF se añaden 128 mg de K₂CO₃, 51 mg de KI y 110 mg de 3-([2-(2,6-bis-metanosulfoniloximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-propanoato de metilo. La mezcla se calienta 18 h a 30°C, se lleva a TA, se filtra sobre una membrana de 0,45 µm, se concentra bajo PR y se purifica por cromatografía flash en sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF15-24g), utilizando un gradiente de 0 a 10 % de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 33 mg de 3-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-propanoato de metilo. LC/MS (B): tr = 3,21 min; [M+H]⁺: m/z 939

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



A una disolución de 80 mg de 3-([2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-propanoato de metilo en 8 ml de DCM, previamente enfriada a -25°C, se

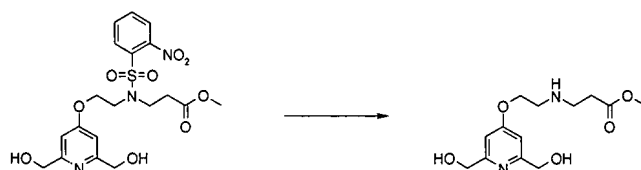
añaden 183 µl de diisopropiletilamina y 57 µl de cloruro de metanosulfonilo. La mezcla se agita 1 h a -15°C y se lava con 5 ml de agua. La fase acuosa se extrae con 5 ml de DCM. Las fases orgánicas se reúnen, se secan sobre MgSO₄, y se concentran bajo PR. Se obtienen 110 mg de 3-([2-(2,6-bis-metanosulfoniloximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-propanoato de metilo. LC/MS (B): tr = 2,67 min; [M+H]⁺: m/z 587

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



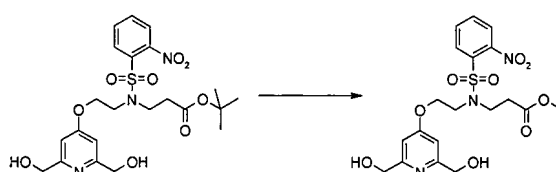
A una disolución de 284 mg de 3-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-propanoato de metilo en 28 ml de acetonitrilo se añaden 356 mg de 1-yodo-2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etano y 330 µl de diisopropiletilamina. La mezcla se calienta a 80°C durante 3 días, se concentra bajo PR y se purifica por cromatografía flash en sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF25-40 g), utilizando un gradiente de 5 a 10% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 165 mg de 3-([2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-propanoato de metilo. LC/MS (B): tr = 0,44 min; [M+H]⁺: m/z 431.

3.5. 3-[2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-propanoato de metilo



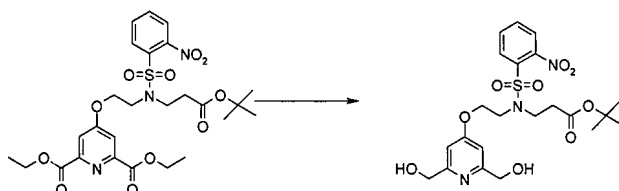
A una disolución de 155 mg de 3-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propanoato de metilo en 6 ml de acetonitrilo, bajo argón, se añaden 325 mg de carbonato de cesio y 67 µl de tiofenol. La mezcla se agita 4 h a TA y se filtra sobre vidrio fritado porosidad 4. La torta se lava con AcOEt y el filtrado se concentra bajo PR y se purifica en cartucho Mega BE-SCX, 2GM 12ML (Varian), utilizando un lavado con MeOH y un desprendimiento del producto esperado con una disolución de amoníaco 2 N en MeOH. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 82 mg de 3-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-propanoato de metilo. LC/MS (B): tr = 0,33 min; [M+H]⁺: m/z 285.

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



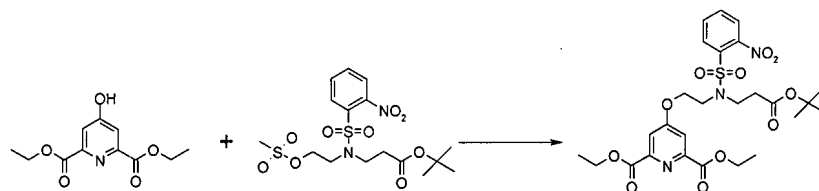
A una disolución de 670 mg de 3-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-propanoato de *terc*-butilo en 20 ml de DCM, se añaden 2 ml de TFA. La mezcla se agita 6 h a TA, se concentra bajo PR, se recoge con DCM y se concentra de nuevo bajo PR. Al residuo obtenido, puesto en disolución en 10 ml de MeOH, se añaden, a 5°C, 7 ml de disolución 2 M de (trimetilsilil)diazometano en hexano. La mezcla se agita 1h30 a 5°C y se añaden 200 µl de ácido acético. La mezcla se recoge con 30 ml de agua y 30 ml de AcOEt. La fase acuosa se extrae 2x con 30 ml de AcOEt. Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una disolución saturada de NaCl, se concentran bajo PR y se purifican por cromatografía flash en sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF15-24 g) utilizando un gradiente de 0 a 10% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 155 mg de 3-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-propanoato de metilo. LC/MS (C) : tr = 2,56 min; [M+H]⁺: m/z 470.

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



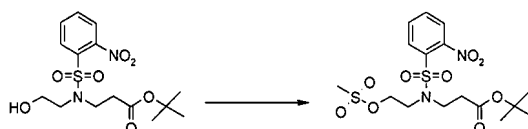
A una disolución de 0,8 g de 4-{2-[(2-*terc*-butoxicarbonil-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-etoxi}-piridina-2,6-dicarboxilato de dietilo en 80 ml de etanol, se añaden sucesivamente 152 mg de borohidruro de sodio y 447 mg de CaCl₂. La mezcla se agita a TA y se le añaden 20 ml de agua al final de la reacción. El etanol se elimina bajo PR y se añaden 100 ml de agua al residuo obtenido y la fase acuosa se extrae 3x con AcOEt. Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una disolución saturada de NaCl, se secan sobre MgSO₄, y se concentran bajo PR. Se obtienen 670 mg de 3-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propanoato de *terc*-butilo. LC/MS (C) : tr = 3 min; [M+H]⁺: m/z 512.

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



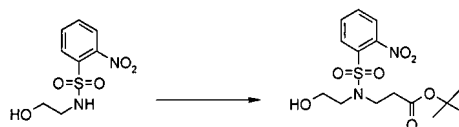
A una disolución de 10,6 g de 3-[(2-metanosulfoniloxi-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propionato de *terc*-butilo en 220 ml de DMF, se añaden 16,2 g de K_2CO_3 y 5,6 g de 4-hidroxi-piridina-2,6-dicarboxilato de dietilo. La mezcla se calienta 20 h a $60^\circ C$, se concentra bajo PR y se recoge con 200 ml de agua y 200 ml de AcOEt. La fase acuosa se extrae 2x con AcOEt. Las fases orgánicas se reúnen, se lavan con una disolución saturada de NaCl, se secan sobre $MgSO_4$, se concentran bajo PR y se purifican por cromatografía flash en sílice (Merck EasyVarioPrep 600 g columna, Si60 15-40 μm), utilizando un gradiente de 0 a 20% AcOEt en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 6,56 g de 4-{2-[(2-*terc*-butoxicarbonil-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-etoxi}-piridina-2,6-dicarboxilato de dietilo. LC/MS (C) : $tr = 4,14$ min; $[M+H]^+$: m/z 596.

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



A una disolución de 9,2 g de 3-[(2-hidroxi-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propionato de *terc*-butilo en 92 ml de DCM se añaden 8,1 ml de diisopropiletilamina. La mezcla se enfría a $-5^\circ C$ y se añade gota a gota una disolución de 2,34 ml de CMS en 10 ml de DCM. Después de volver a TA, la mezcla se agita 2 h aproximadamente y se añaden 100 ml de agua. La fase acuosa se extrae 2 veces con DCM y las fases orgánicas se reúnen, se secan sobre $MgSO_4$, se concentran bajo PR y se purifican por cromatografía flash en sílice (Analogix Super Flash SiO_2 SF40-240 g) utilizando un gradiente de 0 a 5% de acetato de etilo en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 10,62 g de 3-[(2-metanosulfoniloxi-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propionato de *terc*-butilo. LC/MS (C) : $tr = 3,77$ min; $[M+Na]^+$: m/z 475.

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



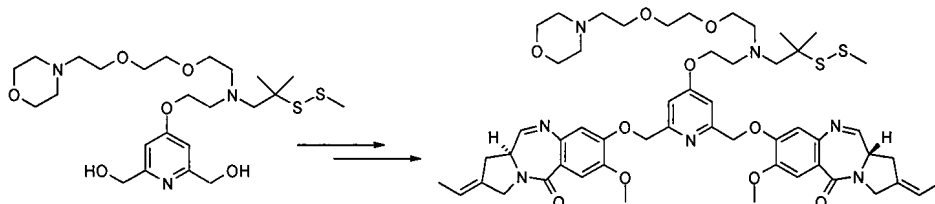
A una disolución de 8,7 g de N-(2-hidroxi-etil)-2-nitro-bencenosulfonamida (Skerlj, R.T. ; Nan, S. ; Zhou, Y. ; Bridger, G.J. *Tetrahedron Lett.* **2002** (43) 7569-7571) en 87 ml de DMF, bajo argón, se

añaden 8,8 ml de 3-bromo propionato de *terc*-butilo y 14,6 g de K_2CO_3 . La mezcla se agita 15 h a 40°C y se añaden de nuevo 5 ml de 3-bromo propionato de *terc*-butilo. La mezcla se calienta a 40°C hasta el día siguiente y se filtra sobre vidrio frito porosidad 4. La torta se lava con acetato de etilo y el filtrado se concentra bajo PR y se purifica por cromatografía flash en sílice (Merck EasyVarioPrep 400 g columna, Si60 15-40 μm), utilizando un gradiente de 0 a 10% de AcOEt en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 9,54 g de 3-[(2-hidroxi-etil)-(2-nitro-bencenosulfonil)-amino]-propionato de *terc*-butilo. LC/MS (C) : tr = 3,39 min; $[M+Na]^+$: m/z 397.

10 Ejemplo 4

4.1. 4-[2-((2-metil-2-metildisulfanil-propil)-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro pirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina

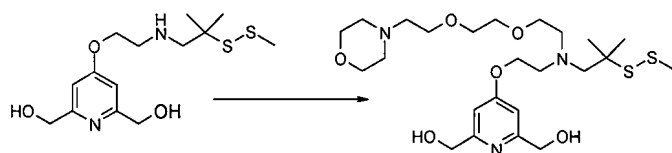
Preparado como para el ej. 1, a partir de 4-[2-((2-metil-2-metildisulfanil-propil)-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-etoxi]-2,6-bis-(hidroxi metil)-piridina:



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

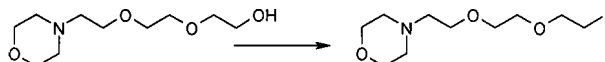
4.2. 4-[2-((2-metil-2-metildisulfanil-propil)-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-etoxi]-2,6-bis-(hidroxi metil)-piridina

Preparado como para el ej. 1, a partir de 4-[2-((2-metil-2-metildisulfanil-propil)-{2-[2-(2-yodo-etoxi)-etoxi]-etil}-amino)-etoxi]-2,6-bis-(hidroxi metil)-piridina y 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); 2,36 (m, 4 H); 2,39 (s, 3 H); 2,43 (t, $J=5,9$ Hz, 2 H); 2,74 (s, 2 H); 2,79 (t, $J=5,9$ Hz, 2 H); 3,00 (t, $J=5,9$ Hz, 2 H); 3,46 a 3,55 (m, 12 H); 4,12 (t, $J=5,9$ Hz, 2 H); 4,45 (d, $J = 5,9$ Hz, 4 H); 5,30 (t, $J=5,9$ Hz, 2 H); 6,84 (s, 2 H). LC/MS (E): tr = 0,33 min; $[M+H]^+$: m/z 534

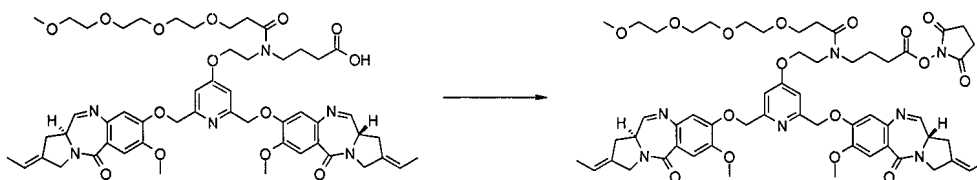
4.3. 4-{2-[2-(2-Yodo-etoxi)-etoxi]-etil}-morfolina



A una disolución de 1,12g de 2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etanol y de 940 μL de diisopropiletilamina en 6 ml de DCM, enfriada a 0°C , se añade una disolución de 440 μL de cloruro de metanosulfonilo en 3mL de DCM a la misma temperatura. La mezcla se agita 1 h a 0°C y se lava con 8 ml de agua. La fase orgánica se seca sobre MgSO_4 y se concentra bajo PR. El residuo obtenido se pone en disolución en 30mL de acetona y se le añaden 1,42g de yoduro de sodio. Después de 5h de agitación a reflujo, el insoluble se elimina por filtración sobre vidrio fritado. El filtrado se concentra bajo PR y se recoge en diclorometano. El insoluble se elimina de nuevo por filtración, el filtrado se concentra bajo PR y se purifica por cromatografía flash en sílice (Analogix Super Flash SiO_2 SF25-40 g), utilizando un gradiente de 0 a 5% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 1,09 g de 4-{2-[2-(2-yodo-etoxi)-etoxi]-etil}-morfolina. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 2,39 (m, 4 H) ; 2,45 (t, $J=5,9$ Hz, 2 H) ; 3,32 (t, $J=6,4$ Hz, 2 H) ; 3,47 a 3,60 (m, 10 H); 3,67 (t, $J=6,4$ Hz, 2 H). LC/MS (A): tr = 0,29 min; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 330

Ejemplo 5

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

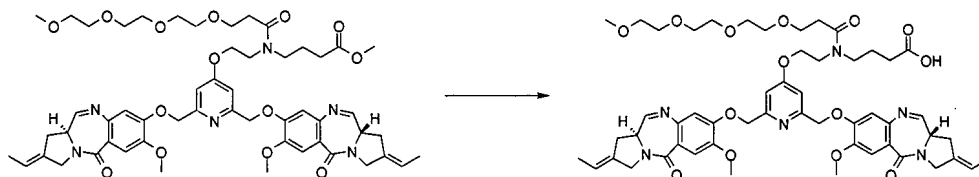


A 65 mg de ácido 4-{[2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-[3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-propionil)-amino]-butanoico en disolución en 3,8 mL de THF se añaden 67 μL de DIPEA y 33 mg de carbonato de N,N'-disuccinimidilo. Después de 1 h a TA, se añaden 8 mL de DCM y la fase orgánica resultante se lava dos veces con agua, se seca sobre MgSO_4 , se concentra bajo PR y se purifica por cromatografía flash en sílice (Analogix Super Flash SiO_2 SF10-8g), utilizando un gradiente de 0 a 7,5% de metanol en DCM. Se obtienen así 35 mg de 4-{[2-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-[3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de N-hidroxisuccinimidilo

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

5.2. Ácido 4-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoico

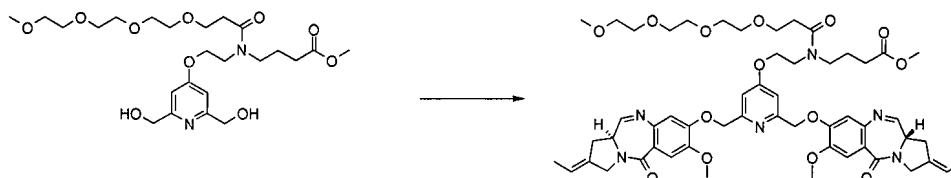
Preparado como para el ej. 2, a partir de 4-([2-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoato de metilo:



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

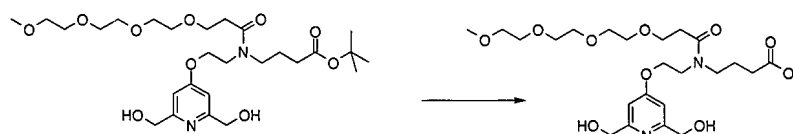
5.3. 4-([2-(2,6-Bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoato de metilo

Preparado como para el ej. 2, a partir de 4-([2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoato de metilo :



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

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

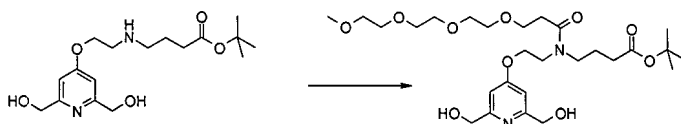


A una disolución de 460 mg de 4-([2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoato de terc-butilo en 7 ml de DCM, se añaden 1,14 ml de TFA. La mezcla se agita 15 h a TA y se concentra bajo PR. Al residuo obtenido, puesto en disolución en 3,8 ml de MeOH, se añaden, a 5°C, 3,1 ml de disolución 2 M de (trimetilsilil)diazometano en hexano. La mezcla se agita 1h a 5°C y se añaden 100 µl de ácido acético. Después de concentrar bajo PR, el residuo obtenido se purifica por cromatografía flash en sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF25-40g), utilizando un gradiente de 2 a 10 % de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 265 mg.de 4-([2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoato de metilo. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): mezcla 50%-

50% de confórmers con: 1,67 a 1,86 (m, 2 H); 2,27 (t, $J=7,3$ Hz, 1 H) ; 2,36 (t, $J=7,3$ Hz, 1 H) ; 2,57 (t, $J=6,7$ Hz, 1 H) ; 2,66 (t, $J=6,7$ Hz, 1 H) ; 3,23 (s, 3 H); 3,31 a 3,75 (m, 21 H); 4,14 (t, $J=5,6$ Hz, 1 H) ; 4,19 (t, $J=5,6$ Hz, 1 H) ; 4,45 (m, 4 H); 5,30 (m, 2 H); 6,84 (s, 1 H); 6,86 (s, 1 H). LC/MS (G) : tr = 0,62 min; $[M+H]^+$: m/z 517; $[M-H+CO_2H]^-$: m/z 561

5

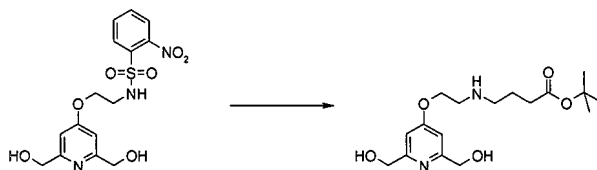
5.5. 4-[[2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoato de terc-butilo



A una disolución de 560 mg de 3-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-butanoato de terc-butilo en 4 ml de DMF se añade una disolución de 658 mg de 3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de N-hidroxisuccinimidilo (véase M.A.Miller, N.B.Malkar, D.Severynse-Stevens, K.G.Yarbrough, M.J.Bednarcik, R.E.Dugdell, M.E.Puskas, R.Krishnan, K.D.James *Bioconjugate Chem.*, **2006**, *17*, 267-274) en 4mL de DMF. La mezcla se agita a TA durante 15h, se concentra bajo PR y se purifica por cromatografía flash en sílice (Analogix Super Flash SiO₂ SF40-80g), utilizando un gradiente de 0 a 10 % de una disolución al 10% de amoniaco en MeOH, en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 460 mg de 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoato de terc-butilo. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): mezcla 50%-50% de confórmers con: 1,39 (s, 4,5 H); 1,40 (s, 4,5 H); 1,63 a 1,81 (m, 2 H); 2,16 (t, $J=7,3$ Hz, 1 H) ; 2,25 (t, $J=7,3$ Hz, 1 H) ; 2,57 (t, $J=6,7$ Hz, 1 H) ; 2,66 (t, $J=6,7$ Hz, 1 H) ; 3,23 (s, 3 H); 3,31 a 3,74 (m, 18 H); 4,14 (t, $J=5,7$ Hz, 1 H) ; 4,19 (t, $J=5,7$ Hz, 1 H) ; 4,45 (m, 4 H); 5,30 (m, 2 H); 6,84 (s, 1 H); 6,86 (s, 1 H). LC/MS (G) : tr = 0,80 min; $[M+H]^+$: m/z 559; $[M-H+CO_2H]^-$: m/z 603.

5.6. 3-[2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-butanoato de terc-butilo

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

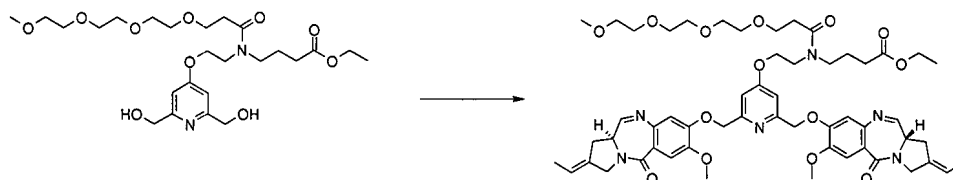


RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,39 (s, 9 H); 1,62 (t, $J=7,2$ Hz, 2 H) ; 1,84 (m extendido, 1 H) ; 2,22 (t, $J=7,2$ Hz, 2 H) ; 2,55 (t, $J=7,2$ Hz, 2 H) ; 2,86 (t, $J=5,7$ Hz, 2 H) ; 4,07 (t, $J=5,7$ Hz, 2 H) ; 4,45 (d, $J = 5,7$ Hz, 4 H); 5,29 (t, $J=5,7$ Hz, 2 H) ; 6,85 (s, 2 H). LC/MS (A): tr = 0,40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

Ejemplo 6

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

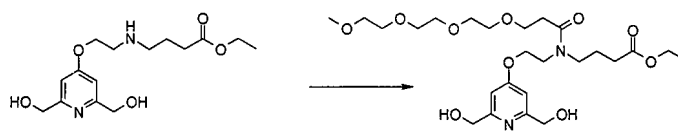
- 5 Preparado como para el ej. 5, a partir de 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de etilo :



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

- 15 6.2. 4-[[2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propionil)-amino]-butanoato de etilo

Preparado como para el ej. 5, a partir de 3-[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etilamino]-butanoato de etilo :



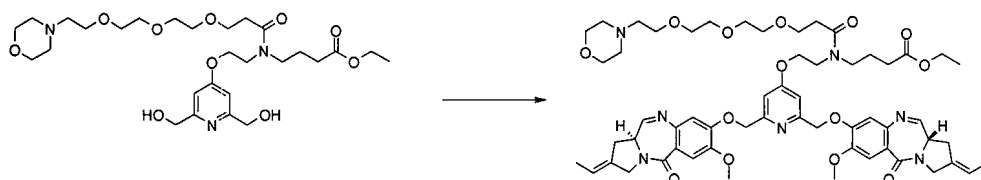
- 20 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) mezcla 50%-50% de confórmers con: 1,16 (t, J=7,1 Hz, 1,5 H) ; 1,17 (t, J=7,1 Hz, 1,5 H) ; 1,67 a 1,97 (m, 2 H) ; 2,25 (t, J=7,3 Hz, 1 H) ; 2,34 (t, J=7,3 Hz, 1 H) ; 2,57 (t, J=6,8 Hz, 1 H) ; 2,66 (t, J=6,8 Hz, 1 H) ; 3,23 (s, 3 H) ; 3,32 a 3,74 (m, 18 H) ; 4,04 (q, J = 7,1 Hz, 1 H) ; 4,05 (q, J = 7,1 Hz, 1 H) ; 4,14 (t, J=5,7 Hz, 1 H) ; 4,19 (t, J=5,7 Hz, 1 H) ; 4,45 (m, 4 H) ; 5,30 (m, 2 H) ; 6,84 (s, 1 H) ; 6,86 (s, 1 H). LC/MS (A): tr = 0,47 min; [M+H]⁺: m/z 531; pico de base: m/z 376 ; [M-H+CO₂H]⁻: m/z 575
- 25

Ejemplo 7

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

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

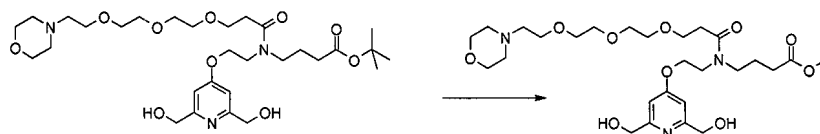
60



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

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

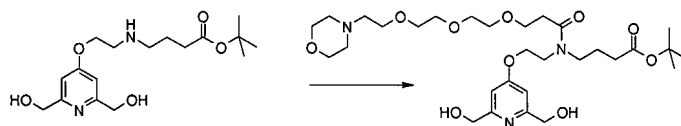
Preparado como para el ej. 5, a partir de 4-[[2-(2,6-bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoato de terc-butilo:



RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,83 (m, 2 H); 2,33 (m, 2 H); 2,42 (m, 4 H); 2,48 (t, J=5,8 Hz, 2 H); 2,61 (m, 2 H); 3,40 (m, 2 H); 3,49 a 3,55 (m, 10 H); 3,56 (m, 4 H); 3,62 (s, 3 H); 3,69 (t ancho, J=6,6 Hz, 4 H); 4,21 (t, J=5,6 Hz, 2 H); 4,49 (d, J = 5,3 Hz, 4 H); 4,90 (t, J=5,3 Hz, 2 H); 6,87 (s, 2 H). LC/MS (G): tr = 0,50 min; $[M+H]^+$: m/z 572; pico de base: m/z 198; $[M-H+CO_2H]^-$: m/z 616

7.3. 4-[[2-(2,6-Bis-hidroximetil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoato de terc-butilo

Preparado como para el ej. 5, a partir de 3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de N-hidroxi succinimidilo:



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

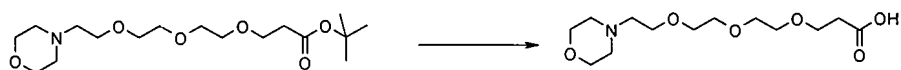
7.4. 3-{2-[2-(2-Morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de N-hidroxi succinimidilo



A 830mg de ácido 3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoico en disolución en 50 mL de THF se añaden 1,1 g de carbonato de N,N'-disuccinimidilo y 1,5 mL de DIPEA. Después de 24 h a TA, se añaden 200 mL de DCM y la fase orgánica resultante se concentra a la mitad bajo PR, se lava dos veces con agua, se seca sobre $MgSO_4$ y se concentra bajo PR. Se obtienen así 1,05 g de 3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de N-hidroxi succinimidilo. RMN

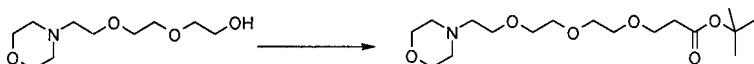
^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 2,39 (m, 4 H) ; 2,45 (t, J=5,9 Hz, 2 H) ; 2,81 (s, 4 H); 2,92 (t, J=6,0 Hz, 2 H) ; 3,45 a 3,57 (m, 14 H); 3,72 (t, J = 6,0 Hz, 2 H). LC/MS (G) : tr (ELSD) = 0,49 min ; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 389.

5 **7.5. Ácido 3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoico**



A una disolución de 1g de 3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de terc-butilo en 50 ml de DCM, se añaden 4 ml de TFA. La mezcla se agita 10 h a TA, se concentra bajo PR y se purifica en cartucho Mega BE-SCX, 25GM 150ML (Varian), utilizando un lavado con MeOH y un desprendimiento del producto esperado con una disolución de amoniaco 2 N en MeOH. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtienen 830 mg de ácido 3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoico. LC/MS (E): tr (ELSD) = 0,16 min ; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 292

15 **7.6. 3-{2-[2-(2-Morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de terc-butilo**



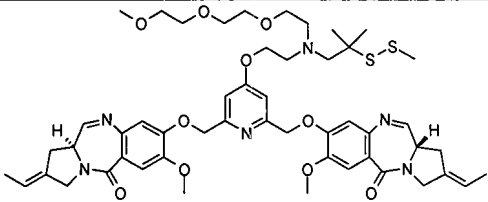
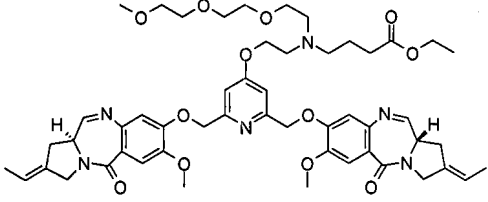
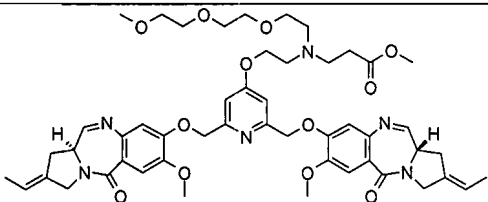
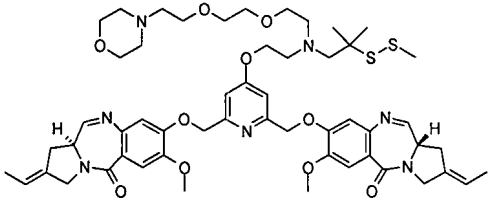
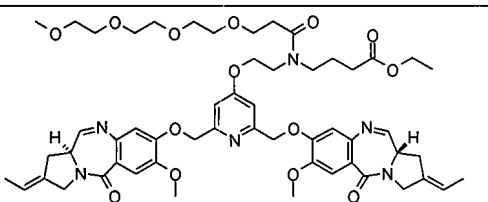
A una disolución de 989mg de 2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etanol en 2,8mL de THF anhidro, se añaden 1,04mg de sodio. Después de calentar a 40°C durante 2h15, se añaden 793μL de acrilato de terc-butilo. Después de 2h de calentamiento adicional a 40°C, la mezcla de reacción se deja 20h a temperatura ambiente, se concentra bajo PR y se purifica por cromatografía flash en sílice (Merck SuperVarioPrep 70 g columna, Si60 15-40 μm), utilizando un gradiente de 0 a 6% de MeOH en DCM. Las fracciones que contienen el producto investigado se reúnen y se concentran bajo PR. Se obtiene 1 g de 3-{2-[2-(2-morfolin-4-il-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propanoato de terc-butilo. LC/MS (E): tr (ELSD) = 0,59 min ; $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 348

25 **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 GCR1=-SZ_a (Z_a=SMe) o GCR1=-C(=O)Z_bR_b (Z_bR_b=OMe)**

Las células MDA-MB-231, MDA-A1 o HCT116 en su fase de crecimiento exponencial se tripsinizan y se ponen en suspensión en su medio de cultivo respectivo (DMEM/F12 Gibco #21331, SVF al 10 % Gibco #10500-056, Glutamina 2 nM Gibco #25030 para las células MDA; DMEM Gibco #11960, SVF al 10 % Gibco #10500-056, Glutamina 2 mM Gibco #25030 para las células HCT116). La suspensión celular se siembra en placas de cultivo de 96 pocillos Cytostar (GE Healthcare Europe, #RPNQ0163) en el medio de cultivo completo que contiene suero a una densidad de 5.000 células/pocillo (MDA-MB-231, MDA-A1, HCT116). Después de 4 horas de incubación, se añaden diluciones sucesivas de los dímeros de tomamicina en los pocillos 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 4º día, se añaden a cada pocillo 10 μL

de una solución de timidina ¹⁴C (0,1 µCi/pocillo, Perkin Elmer #NEC56825000). La incorporación de timidina ¹⁴C se mide 96 h después del principio del experimento con un contador radioactivo microbeta (Perkin Elmer). Los datos se expresan en forma de % de supervivencia calculando la relación entre el recuento obtenido con las células tratadas con el citotóxico y el obtenido con las células de los pocillos de control (tratados con el medio de cultivo solo).

Tabla II

Inhibición de la proliferación (pulso de ¹⁴ C timidina a las 96 h)	CI50 [pM]		
Estructura del compuesto de fórmula (IA)	HCT116	MDA-MB231	MDA-A1
	61	128	16.270
	18	41	3.465
	235	384	17.849
	48	81	26.474
	4.984	5.665	>50.000

Se constata que los compuestos ensayados, para los que GCR1=-SZ_a, con Z_a=SMe) o GCR1=-C(=O)Z_bR_b, con 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 al menos idéntica.

10

Capítulo 2 : Nuevos conjugados de tomaimicina

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

A 24 mg de hu2H11 (anticuerpo descrito también por hu53 2H11 en la página 15 de **WO 2008010101** ; se trata de un anticuerpo que comprende una Vh que tiene la secuencia de aminoácidos SED ID N°24) en 2,37 mL de un tampón acuoso de concentración 0,05 M en fosfato de potasio, 0,05 M en NaCl y 2 mM en ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) de pH=6,5, se añaden 320 µg de SPDB (descrito en la página 7 de **WO 2010/076474**) en disolución en 62 µL de DMA bajo agitación magnética. Después de 4 h a TA, el anticuerpo modificado se purifica por filtración en gel en Sephadex G25 (Columna PD-10 GE) previamente equilibrada en un tampón acuoso de concentración 0,05 M en ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 0,05 M en NaCl y 2 mM en ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) de pH=8. Un alícuota del anticuerpo modificado se trata con ditioneitol (DTT) para escindir los grupos ditiopiridinas. El anticuerpo modificado así como la piridina tiol libre se dosifican por espectrofotometría utilizando los coeficientes de extinción de la piridina tiol ($\epsilon_{343\text{ nm}} = 8.080\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), del grupo ditiopiridina ($\epsilon_{280\text{ nm}} = 5.100\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y de hu2H11 ($\epsilon_{280\text{ nm}} = 20.6941\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) : se ha determinado una media de 3,2 grupos ditiopiridina por molécula de anticuerpo a la concentración de 7,08 mg/mL.

A 12 mg de anticuerpo modificado anterior en 3,2 mL de un tampón acuoso de concentración 0,05 M en ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 0,05 M en NaCl y 2 mM en ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) de pH=8, se añaden 713 µL de DMA y 1,22 mg de 4-{2-[[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]-(2-metil-(2-metil-2-mercapto-propil)-amino)-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina en disolución en 87 µL de dimetilacetamida (DMA) bajo agitación magnética. Después de 12 h a 30°C, la mezcla se filtra sobre Millex^R-SV 0,45 µM (PVDF Durapore Millipore) y se purifica en una columna SuperdexTM 200 grado prep (Columna HiloadTM 26/60 GE) previamente equilibrada en un tampón fosfato salino que contiene 20% de N-metilpirrolidona (NMP). Las fracciones de interés se reúnen y se concentran sobre Amicon Ultra-15 (Ultracel 50k Millipore) y se filtran sobre Sephadex G-25 (Columnas PD10, GE) previamente equilibrada en un tampón acuoso a pH=6,5, de concentración 10mM en histidina que contiene 10% de sacarosa y 5% de NMP.

El conjugado obtenido (3,5 mL) se dosifica por espectrofotometría utilizando los coeficientes de extinción $e_{320\text{ nm}} = 7.843\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y $e_{280\text{ nm}} = 4.436\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ para la 4-{2-[[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina y $e_{280\text{ nm}} = 206.941\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ para hu2H11: se ha determinado una media de 2,9 dímeros de tomamicina (4-{2-[[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]-(2-metil-2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrol[2,1c][1,4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina) por molécula de anticuerpo a la concentración de 1,74 mg/mL.

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

A 100 mg de hu2H11R35R74 (referenciado en la página 20 de **WO 2011039721**) en 8,2 mL de un tampón acuoso de concentración 0,05 M en fosfato de potasio, 0,05 M en NaCl y 2 mM en ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) de pH=6,5, se añaden 1,3 mg de SNPP (descrito en la página 36 de **WO 2004/016801**) en disolución en 186 μL de DMA bajo agitación magnética. Después de 4 h a TA, la disolución del anticuerpo modificado se fracciona en 4 y se purifica por filtración en gel en 4 columnas Sephadex G25 (Columna PD-10 GE) previamente equilibradas en un tampón acuoso de concentración 0,05 M en ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 0,05 M en NaCl y 2 mM en ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) de pH=8. Después de mezclar y homogeneizar los 4 filtrados así obtenidos, el anticuerpo modificado se dosifica por espectrofotometría utilizando los coeficientes de extinción de nitro-piridina tiol ($e_{280\text{ nm}} = 3.344\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y $e_{325\text{ nm}} = 10.964\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), y de hu2H11R35R74 ($e_{280\text{ nm}} = 219.528\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$): se ha determinado una media de 4,47 grupos ditio-nitropiridina por molécula de anticuerpo a la concentración de 6,27 mg/mL.

A 87 mg de anticuerpo modificado anterior en 23,24 mL de un tampón acuoso de concentración 0,05 M en ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 0,05 M en NaCl y 2 mM en ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) de pH=8, se añaden 4,38 mL de DMA y 17,73 mg de 4-{2-[[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]-(2-metil-2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi}-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro pirrolo[2,1c][1,4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina en disolución en 1,43 mL de dimetilacetamida (DMA) bajo agitación magnética. Después de 17 h a 30°C, la mezcla se filtra sobre Steriflip^R 0,45 μM (PVDF Durapore Millipore) y se purifica en 3 inyecciones en una columna SuperdexTM 200 grado prep (Columna HiloadTM 26/60 GE) previamente equilibrada en un tampón fosfato salino que contiene 20% de N-metilpirrolidona (NMP). Las fracciones de interés se reúnen y se concentran sobre Amicon Ultra-

15 (Ultracel 50k Millipore) y se filtran sobre Sephadex G-25 (Columna HiPrep 26/10 desaladora, GE) previamente equilibrada en un tampón acuoso a pH=6,5, de concentración 10mM en histidina que contiene 10% de sacarosa y 5% de NMP.

5 El conjugado obtenido (28 mL) se dosifica por espectrofotometría utilizando el coeficiente de extinción $e_{280\text{ nm}} = 219.528\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para hu2H11R35R74 : se ha determinado una media de 3,13 dímeros de tomamicina (4-{2-[[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]-(2-metil-(2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina) por molécula de anticuerpo a la concentración de 1,99 mg/mL.

Ejemplo 10: preparación de un conjugado hu2H11R35R74 modificado por SPDB con 4-{2-[[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]-(2-metil-(2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4] benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina

15 Preparado como para el ej. 8, a partir de hu2H11R35R74 : se ha determinado una media de 2,92 dímeros de tomamicina (4-{2-[[2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etil]-(2-metil-(2-metil-2-mercapto-propil)-amino]-etoxi]-2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridina) por molécula de anticuerpo.

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

25 A una disolución de 1,59 mg de hu2H11R35R74 en 150 µL de un tampón acuoso de concentración 0,043 M en fosfato de potasio de pH=6,6 se añaden sucesivamente 6µL de una disolución acuosa 1M de HEPES, seguidos de 267µL de un tampón acuoso de concentración 0,05 M en ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 0,05 M en NaCl y 2 mM en ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) de pH=8, 100µL de DMA y 83 µg de 4-([2-(2,6-bis-[(S)-2-et-(E)-iliden-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidropirrolo[2,1c][1,4]benzo diazepin-5-ona-8-iloximetil]-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionil)-amino]-butanoato de N-hidroxi succinimidilo en disolución en 5 µL de DMA. Después de 4 h a 30°C, la mezcla se filtra sobre Sephadex G-25 (Columnas NAP-5 GE) previamente equilibrada en un tampón acuoso de pH=6,5, de concentración 10 mM en histidina, que contiene 10% de sacarosa y 5% de NMP.

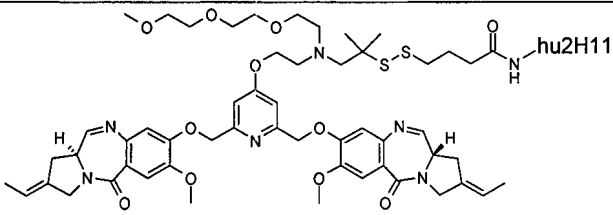
El conjugado obtenido (1 mL) se dosifica por espectrofotometría utilizando los coeficientes de extinción de 4-([2-(2,6-bis-hidroxiometil-piridin-4-iloxi)-etil]-(3-{2-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-

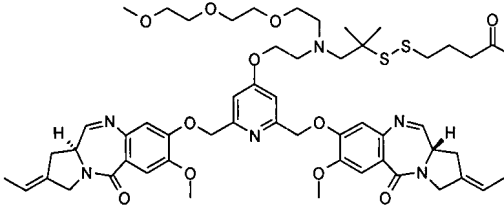
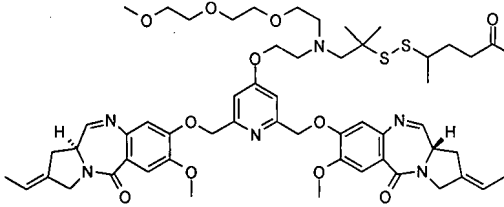
propionil)-amino]-butanoato de etilo ($\epsilon_{322\text{ nm}} = 7.971\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 5.219\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$): se ha determinado una media de 4,18 dímeros de tomaimicina por molécula de anticuerpo a la concentración de 1,14 mg/mL.

Evaluación de la inhibición de la proliferación de las líneas celulares MDA-MB-231 por los conjugados hu2H11 (respectivamente hu2H11R35R74)-citotóxico

Las células MDA-MB-231 en su fase de crecimiento exponencial se tripsinizan 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 pocillos Cytostar (GE Healthcare Europe, #RPNQ0163) en el medio de cultivo completo que contiene suero con una densidad de 5.000 células/pocillo. Después de 4 h de incubación, se añaden a los pocillos 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 4º día, se añaden a cada pocillo 10 µL de una disolución de timidina ¹⁴C (0,1 µCi/pocillo, Perkin Elmer #NEC56825000). La incorporación de timidina ¹⁴C se mide 96 h después del principio del experimento con un contador radioactivo microbeta (Perkin Elmer). Los datos se expresan en la forma de % de supervivencia calculando la relación entre el recuento obtenido con las células tratadas con el inmunoconjugado y el obtenido con las células de los pocillos de control (tratados con el medio de cultivo solo). En determinados experimentos mencionados con un asterisco (*), el anticuerpo desnudo hu2H11 (respectivamente hu2H11R35R74) se añadió en los pocillos a una concentración de 1 µM al principio del experimento y se midió la inhibición de la proliferación como se ha descrito anteriormente.

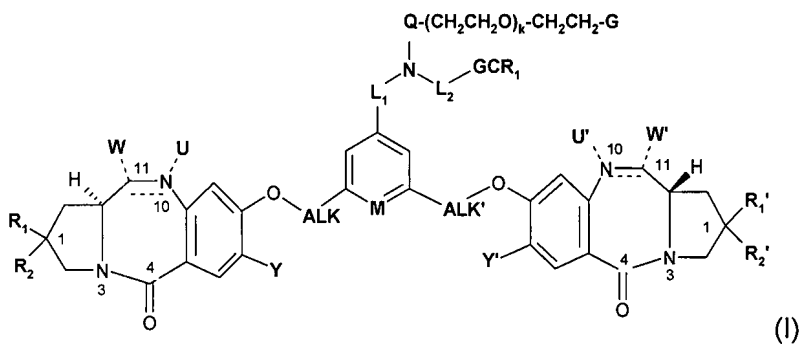
Tabla III

Inhibición de la proliferación (pulso de ¹⁴ C timidina a las 96 h)	CI50 [pM]		
	CI50 media	CI50 media (+Ab desnudo *)	relación entre las CI50
Estructura 	58	760	13

Inhibición de la proliferación (pulso de ¹⁴ C timidina a las 96 h)		CI50 [pM]	
Estructura	CI50 media	CI50 media (+Ab desnudo *)	relación entre las CI50
 hu2H11R35R74	32	502	16
 hu2H11R35R74	72	3.550	49

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



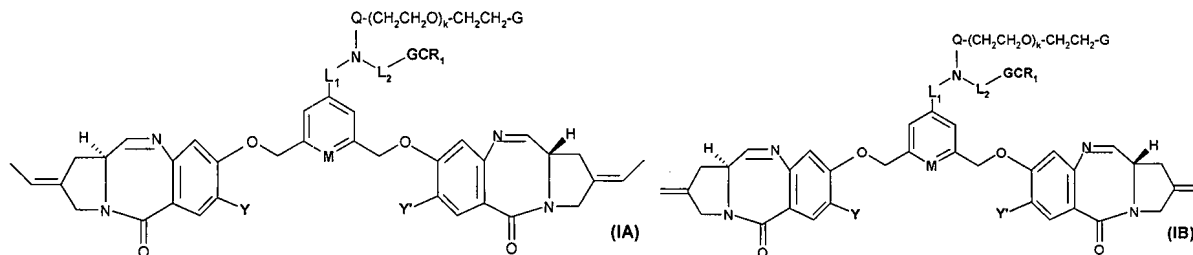
5 en la que:

- --- representa un enlace sencillo o un enlace doble con la condición de que
 - si --- representa un enlace sencillo entonces:
 - ❖ **U** y/o **U'**, idéntico o diferente, representa(n) independientemente el uno del otro, H;
 - ❖ **W** y/o **W'**, idéntico o diferente, representa(n) 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 trialquilfosfonio o triarilfosfonio;
 - si --- representa un enlace doble entonces:
 - ❖ **U** y **U'** están ausentes;
 - ❖ **W** y/o **W'**, idéntico o diferente, representa(n) independientemente el uno del otro H;
- **R₁**, **R₂**, **R₁'**, **R₂'**, idénticos o diferentes, representan independientemente el uno del otro: H, Hal o un grupo alquilo(C₁-C₆) sustituido opcionalmente con uno o varios sustituyentes elegidos entre: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo, S(O)_qR con 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 el uno del otro H u -OR;
- **M** representa CH o N;
- **ALK** y **ALK'** designan un grupo alquileno(C₁-C₆);
- **R** y **R'** representan, independientemente el uno del otro, H o un grupo alquilo(C₁-C₆) o arilo sustituido opcionalmente con uno o varios sustituyentes elegidos entre: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, un grupo arilo o heteroarilo;

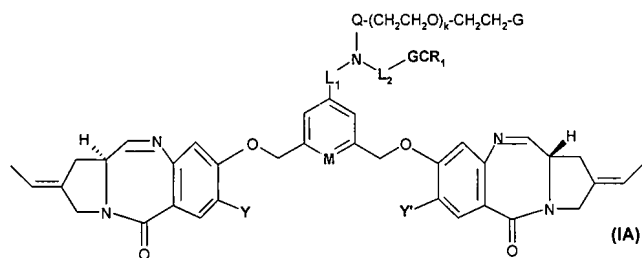
- **L₁** representa:
 - un enlace sencillo;
 -
 - el grupo $-(OCH_2CH_2)_i-$, unido al ciclo fenilo o piridinilo por el átomo de oxígeno, representando *i* un número entero que va de 2 a 40;
 -
 - el grupo $-D-ALK(C_1-C_6)-$ unido al ciclo fenilo o piridinilo por D, en el que D representa $-O-$, $-NH-$ o $-N$ alquilo(C_1-C_4)-;
 - **L₂** representa:
 - un grupo $-ALK(C_1-C_6)-$;
 -
 - el grupo $-(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$, representando *j* un número entero que va de 1 a 40;
 -
 - un grupo $-(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, unido al átomo de nitrógeno por el resto $-(CH_2CH_2O)-$, representando *j* un número entero que va de 1 a 40 y representando **R''** H o un grupo alquilo(C_1-C_4);
 - **Q** representa un enlace sencillo o el grupo $C(=O)$;
 - **k** representa un número entero que va de 0 a 40 ;
 - **G** representa un grupo $-OR$ o $-NRR'$, siendo R y R' tales como se han definido anteriormente o siendo tales que forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un grupo heterocicloalquilo(C_4-C_{10}) que puede comprender en el ciclo otro heteroátomo elegido entre N, O o S y que puede estar sustituido opcionalmente con al menos un sustituyente elegido entre un grupo alquilo(C_1-C_4), un átomo de halógeno o un grupo hidroxil;
 - **GCR1** representa el grupo $-SZ_a$ o $-C(=O)-Z_bR_b$;
 - **Z_a** representa Ac, R_a o SR_a ;
 - **R_a** representa H, o un grupo alquilo(C_1-C_6), cicloalquilo(C_3-C_8), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo(C_4-C_{10}) sustituido opcionalmente con uno o varios sustituyentes elegidos entre: Hal, CN, NRR', CF₃, OR, NO₂, un grupo arilo o heteroarilo;
 - **Z_b** representa un enlace sencillo, $-O-$ o $-NH-$ y representando **R_b** H o un grupo alquilo(C_1-C_6), cicloalquilo(C_3-C_8), arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo(C_4-C_{10}) o bien **Z_b** representa un enlace sencillo y **R_b** representa Hal;
- con la condición de que si **L₁** representa un enlace sencillo entonces GCR1 representa $-SZ_a$.

2. Compuesto según la reivindicación 1 en el que $U=U'$ y/o $W=W'$ y/o $R_1=R_1'$ y/o $R_2=R_2'$ y/o $Y=Y'$ y/o los dos grupos ALK y ALK' unidos al núcleo fenilo o piridinilo son idénticos

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



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



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

6. Compuesto según la reivindicación 1 a 5 en el que M representa N.

7. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 6 en el que si L₁ representa un enlace sencillo, L₂ representa $-(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$ o $-(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$.

8. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 7 en el que G representa un grupo -OH, -Oalquilo(C₁-C₆), -NH₂, -NHalquilo(C₁-C₆) o -N alquilo(C₁-C₆)₂ o G representa un grupo -NRR' en el que R y R' forman junto con el átomo de nitrógeno a los que está unido un grupo heterocicloalquilo(C₄-C₁₀) que pueden comprender en el ciclo otro heteroátomo elegido entre N, O o S y que puede estar sustituido opcionalmente con al menos un sustituyente elegido entre un grupo alquilo(C₁-C₄), un átomo de halógeno o un grupo hidroxilo.

9. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que :

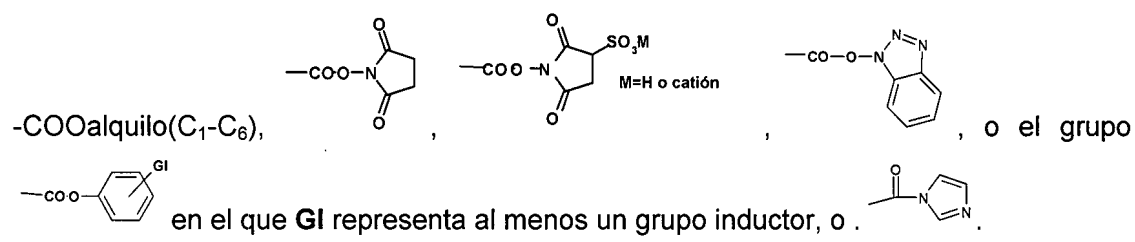
- L₁= -D-ALK(C₁-C₆)- y L₂= -ALK(C₁-C₆)- ; o
- L₁= -(OCH₂CH₂)_i- y L₂= -ALK(C₁-C₆)- ; o

- 5 10. Compuesto según la reivindicación 1 a 8 en el que:

 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q = \text{enlace sencillo}$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-SZ_a$;
 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-SZ_a$;
 - $L_1 = -(OCH_2CH_2)_i-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q = \text{enlace sencillo}$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-SZ_a$;
 - $L_1 = -(OCH_2CH_2)_i-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-SZ_a$;
 - 10 ▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q = \text{enlace sencillo}$, $k=1-10$, $G = NRR'$, $GCR1=-SZ_a$;
 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-SZ_a$;
 - $L_1 = \text{enlace sencillo}$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q = \text{enlace sencillo}$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-SZ_a$;
 - $L_1 = \text{enlace sencillo}$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-SZ_a$;
 - 15 ▪ $L_1 = \text{enlace sencillo}$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q = \text{enlace sencillo}$, $k=0-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-SZ_a$;
 - $L_1 = \text{enlace sencillo}$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=0-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-SZ_a$;
 - 20 ▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q = \text{enlace sencillo}$, $k=0-10$, $G = NRR'$, $GCR1=-SZ_a$;
 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=0-10$, $G = NRR'$, $GCR1=-SZ_a$;
 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q = \text{enlace sencillo}$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-SZ_a$;
 - 25 ▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NR''-ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-SZ_a$;
 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q = \text{enlace sencillo}$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;
 - 30 ▪ $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;
 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q = \text{enlace sencillo}$, $k=1-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;
 - $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;
 - $L_1 = -(OCH_2CH_2)_i-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q = \text{enlace sencillo}$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;
 - 35 ▪ $L_1 = -(OCH_2CH_2)_i-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;
 - $L_1 = -(OCH_2CH_2)_i-$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q = \text{enlace sencillo}$, $k=1-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;

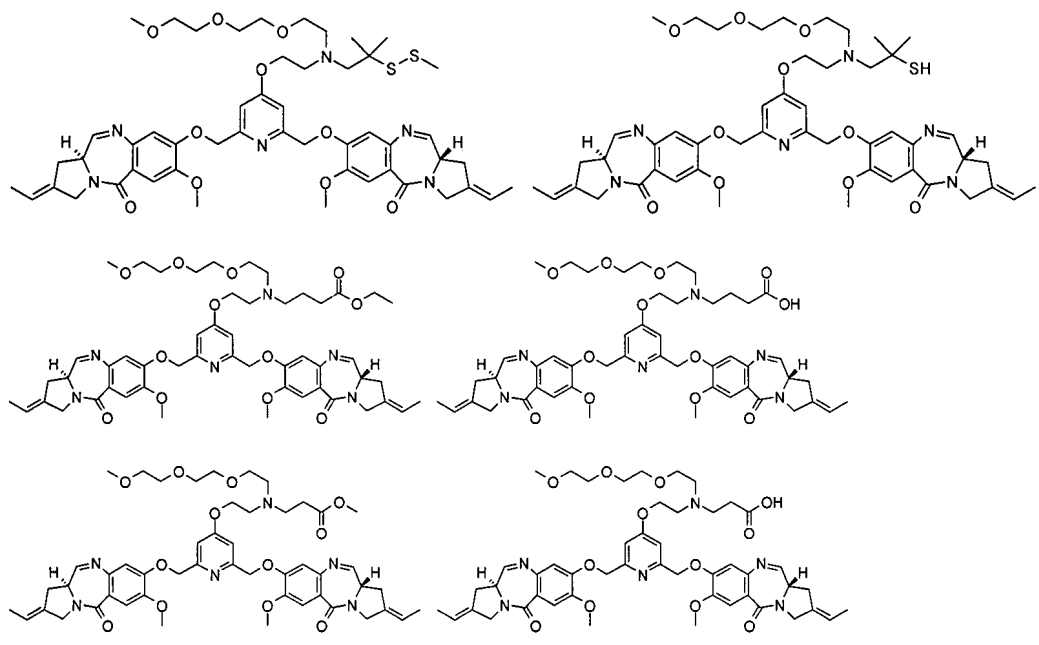
- $L_1 = -(OCH_2CH_2)_i$, $L_2 = -ALK(C_1-C_6)-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;
- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$, $Q=$ enlace sencillo, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;
- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$, $Q=CO$, $k=1-10$, $G=OR$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;
- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$, $Q=$ enlace sencillo, $k=0-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$;
- $L_1 = -D-ALK(C_1-C_6)-$, $L_2 = -(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$, $Q=CO$, $k=0-10$, $G=NRR'$, $GCR1=-C(=O)Z_bR_b$.

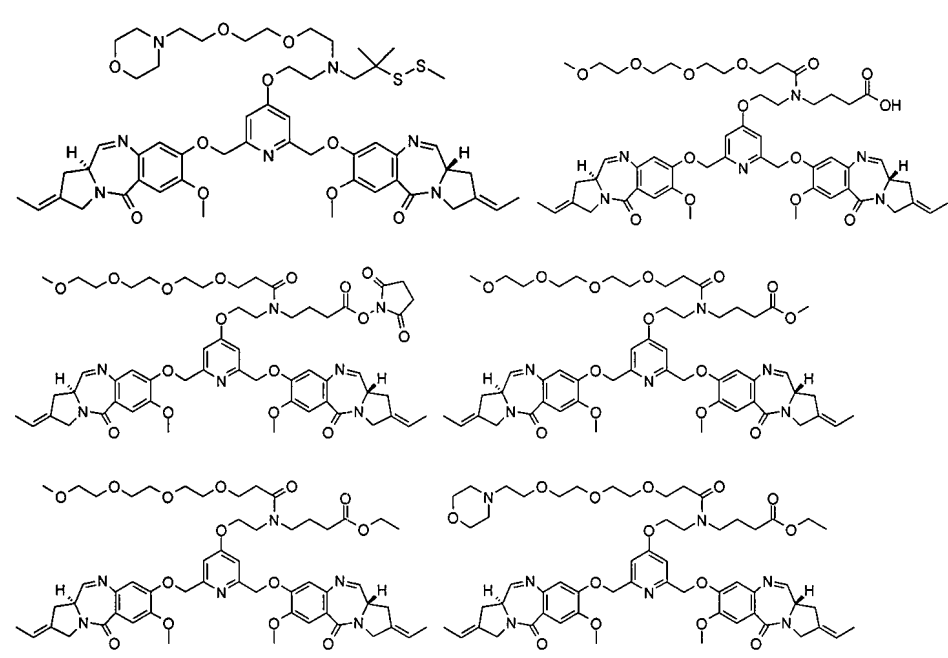
11. Compuesto según la reivindicación 1 a 10 en el que $-COZ_bR_b$ representa $-COOH$,



12. Compuesto según la reivindicación 1 a 10 en el que $-SZ_a$ representa $-SH$ o $-SSalquilo(C_1-C_6)$ o $-SS-heteroarilo$.

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





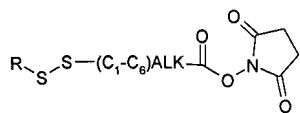
14. Procedimiento de preparación de un conjugado, que consiste en:
 - (i) poner en contacto y dejar reaccionar:
 - una disolución acuosa, opcionalmente tamponada, del agente de selección de la diana, opcionalmente modificado mediante un agente de modificación,
 - y
 - una disolución de un compuesto de fórmula (I) tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 13,
 - siendo el grupo químico GCR1 del compuesto de fórmula (I) reactivo frente a los grupos químicos GCR2 presentes en el agente de selección de la diana principalmente frente a los grupos amino presentes en los anticuerpos, habiéndose introducido dichos grupos químicos GCR2 llegado el caso por el agente de modificación,
 - de forma que se asegure la unión del compuesto de fórmula (I) sobre el agente de selección de la diana por la formación de un enlace covalente;
 - (ii) después separar opcionalmente el conjugado formado en la etapa (i) del compuesto de fórmula (I) y/o del agente de selección de la diana que no haya reaccionado y/o de los agregados que se formarían opcionalmente.
-
15. Procedimiento según la reivindicación 14 en el que:
 - en presencia de un derivado de fórmula (I) que comprende un grupo químico reactivo GCR1 de tipo $-SZ_a$, el agente de selección de la diana comprende:
 - grupos químicos disulfuros en el caso en que GCR1 representa $-SH$;
 - grupos químicos tioles en el caso en que GCR1 representa $-SZ_a$ con $Z_a \neq H$;

- grupos químicos maleimido o haloacetamido en el caso en que GCR1 representa -SH ;

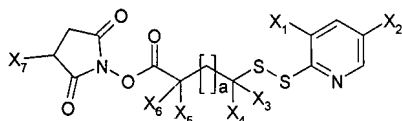
➤ en presencia de un derivado de fórmula (I) que comprende un grupo químico reactivo GCR1 de tipo $-C(=O)-Z_bR_b$, se hace reaccionar el derivado de fórmula (I) con las funciones amino del agente de selección de la diana, principalmente los grupos ϵ -amino portados por las cadenas laterales de los residuos de lisina (Lys) de un anticuerpo.

16. Procedimiento según la reivindicación 14 ó 15 en el que:

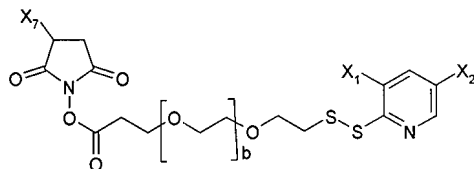
➤ cuando el grupo químico reactivo GCR1 es de tipo -SH, y el agente de selección de la diana presenta funciones amino, principalmente grupos ϵ -amino portados por las cadenas laterales de los residuos de lisina de un anticuerpo, éste se modifica mediante un agente de modificación elegido entre un compuesto de fórmula:



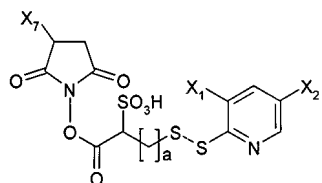
en la que R representa un grupo alquilo(C_1-C_6), arilo, heteroarilo, cicloalquilo(C_3-C_7), heterocicloalquilo(C_4-C_{10});



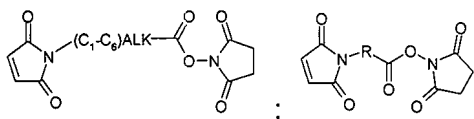
, un análogo pegilado de fórmula :



o un análogo sulfónico de fórmula

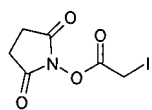
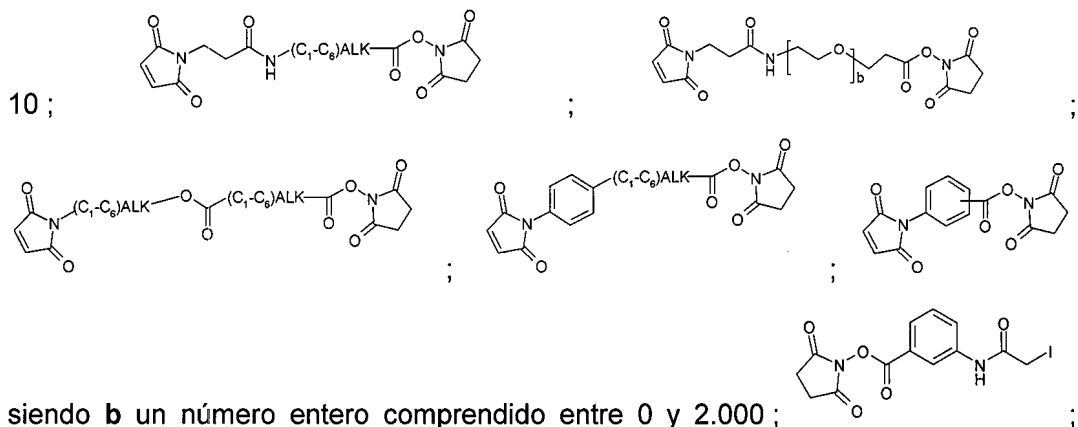


en los cuales X_3 , X_4 , X_5 , X_6 representan H o un grupo alquilo(C_1-C_6), X_1 y X_2 representan -H, $-CONX_8X_9$, $-NO_2$, X_8 y X_9 representan H o un grupo alquilo(C_1-C_6), X_7 representa $-SO_3^-M^+$ o H o bien un grupo amonio cuaternario y a designa un número entero que va de 0 a 4 y b designa un número entero que va de 0 a 2.000 ; o entre 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo; 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo;

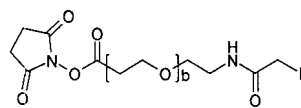


en la que R representa un grupo $-(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_n$ -ciclohexil-, -ciclohexil- $(CH_2)_n-$ y n representa un número entero que va de 1 a

75

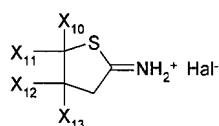


; N-bromoacetato de succinimidilo; 3-(N-bromoacetamido)propionato de



succinimidilo; , siendo **b** un número entero comprendido entre 0 y 2.000.

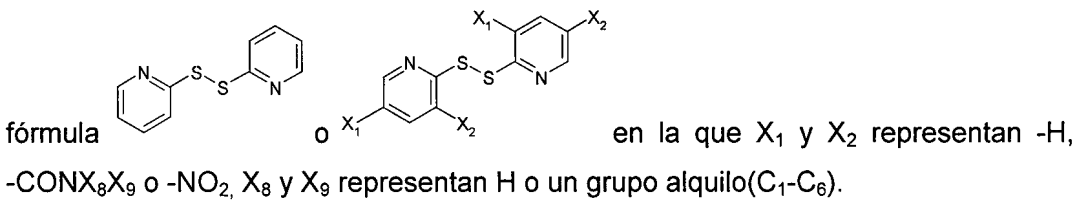
- cuando el grupo químico reactivo GCR1 es de tipo -SZ_a con Z_a≠H, y el agente de selección de la diana presenta funciones amino, principalmente grupos ε-amino portados por las cadenas laterales de los residuos de lisina de un anticuerpo, éste se modifica mediante un agente de modificación elegido entre un compuesto de fórmula



en la que:

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

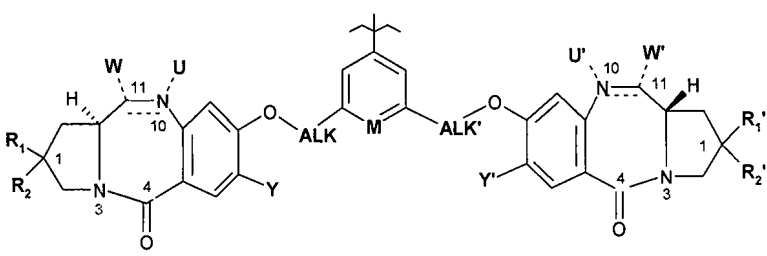
➤ cuando el grupo químico reactivo GCR1 es de tipo -SH, y el agente de selección de la diana presenta funciones tiol, principalmente después de la introducción de cisteínas por mutación o por modificación química de un agente de selección de la diana que presenta funciones amino, el agente de selección de la diana se modifica de forma que sus funciones tiol se transforman en funciones disulfuros, más particularmente mediante un agente de modificación elegido entre un compuesto de



17. Conjugado susceptible de ser obtenido por el procedimiento según una de las reivindicaciones 14 a 16.

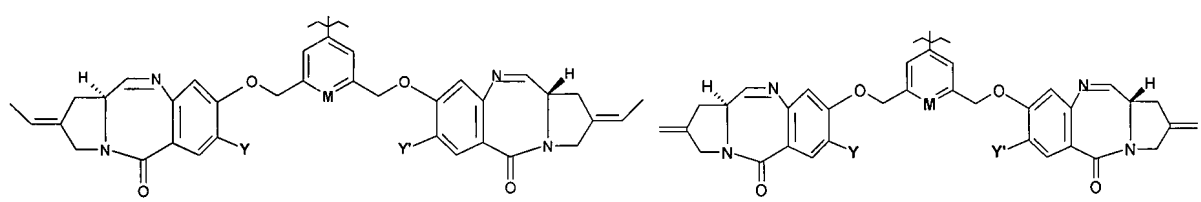
18. Disolución de conjugado susceptible de ser obtenida por el procedimiento según una de las reivindicaciones 14 a 16, o que comprende el conjugado tal como se ha definido en la reivindicación 17.

19. Utilización de un derivado de fórmula (I) según una de las reivindicaciones 1 a 13 para la preparación de un agente de selección de la diana al que esté unido de forma covalente, en la posición para de M, el dímero de fórmula



20. Utilización según la reivindicación 19 en la que el agente de selección de la diana es un anticuerpo.

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



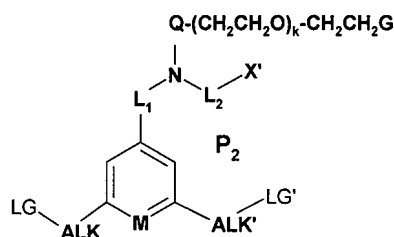
22. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 13 para utilizarlo como agente

anticanceroso.

23. Conjugado según la reivindicación 17 para utilizarlo como agente anticanceroso.

5 24. Disolución de conjugado según la reivindicación 18 para utilizarla como agente anticanceroso.

25. Compuesto de fórmula P_2 :

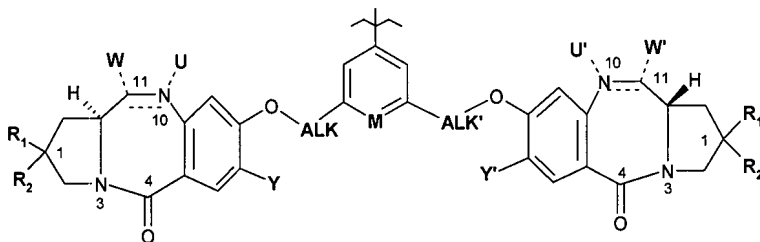


10 en la que :

- L_1 , L_2 , Q , k , ALK , ALK' y G son tales como se han definido en una de las reivindicaciones 1 a 9 ;
- representando LG y LG' un grupo saliente;
- X' representa GCR1.

15 26. Utilización de un compuesto según la reivindicación 25 como compuesto intermedio en la preparación de un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 13.

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



25 después reacción de un compuesto tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 13 con el agente de selección de la diana.

30 28. Agente de selección de la diana según la reivindicación 27 que tiene afinidad por un antígeno o grupo de antígenos localizado en células cancerosas o células estromales asociadas a un tumor.

29. Agente de selección de la diana según la reivindicación 27 a 28 que es un anticuerpo, preferentemente monoclonal.

5

10

15

20

25

30

35

Resumen:

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

5

10

15

20

25

30

35

Figura 1

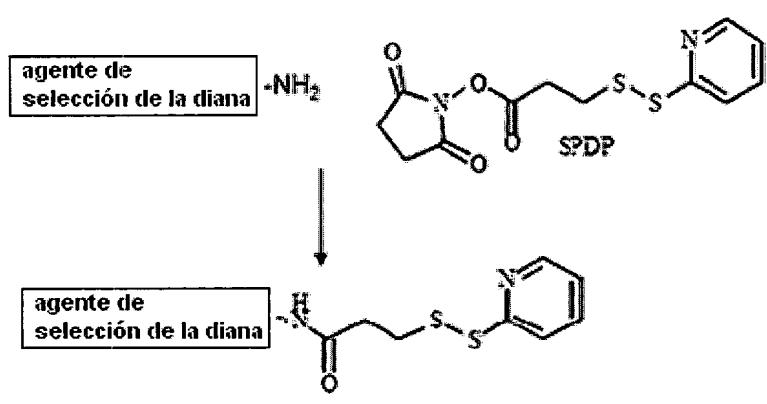


Figura 2

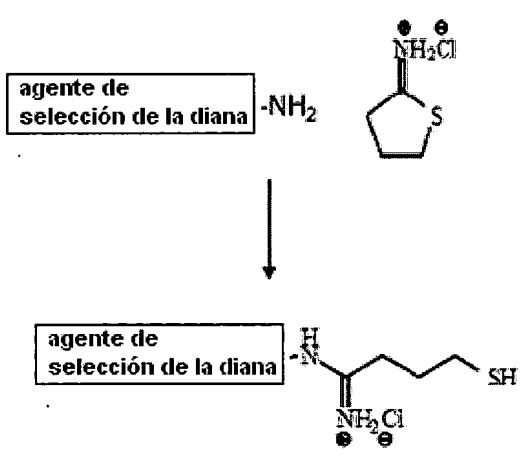


Figura 3: Espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado del ej. 8 después de desglucosilación

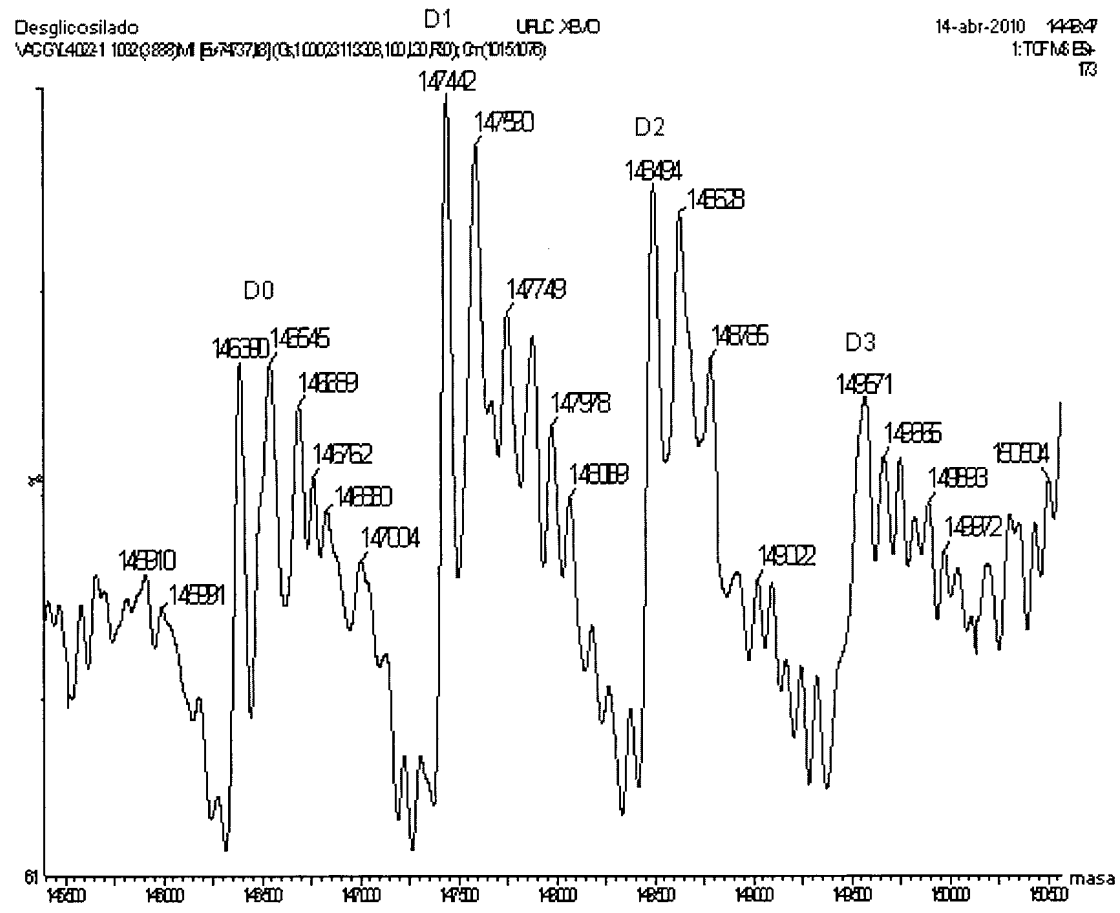


Figura 4 : Espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado del ej. 9 no desglicosilado

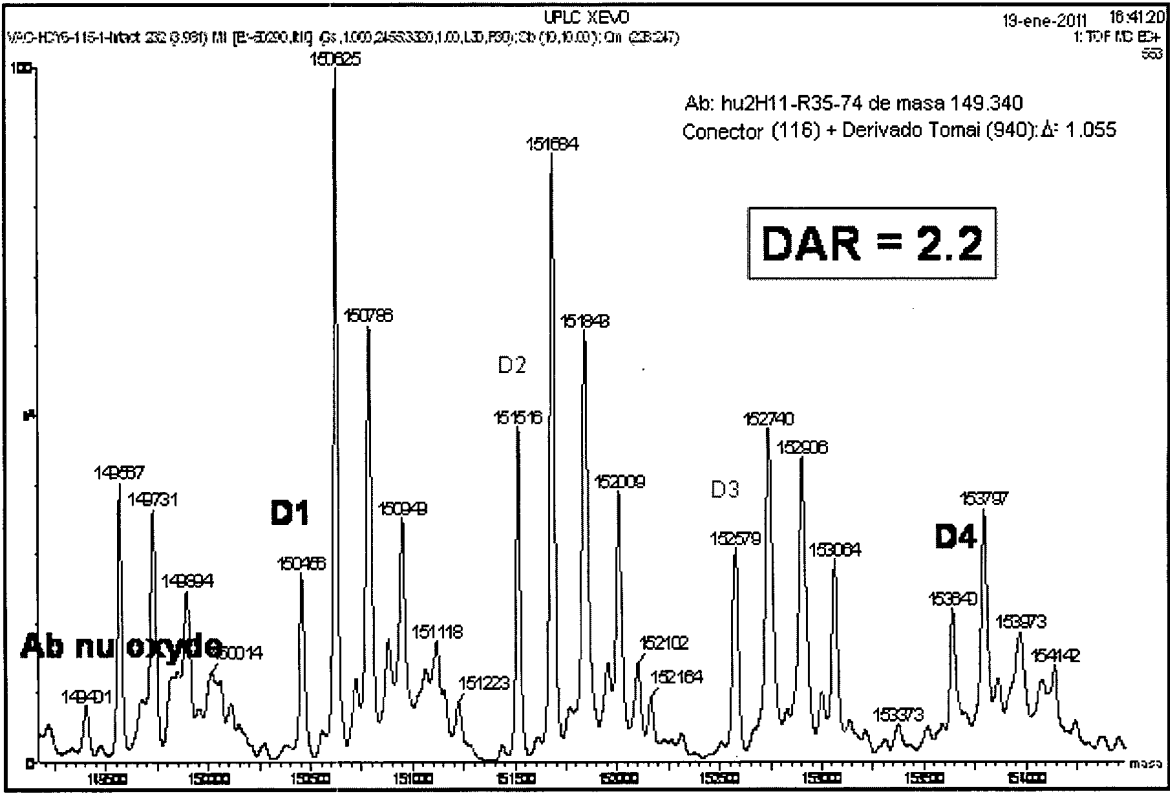


Figura 5: Espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado del ej. 10 no desglicosilado

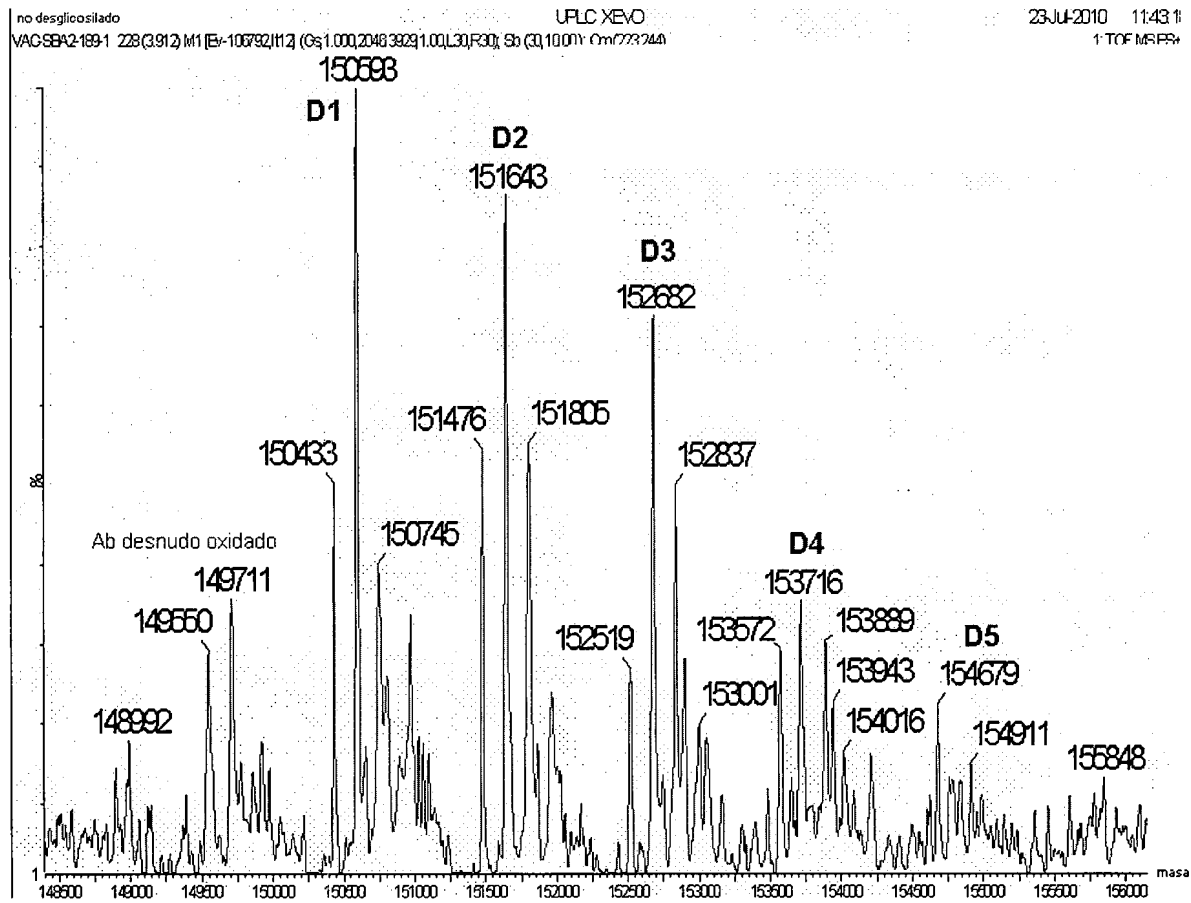
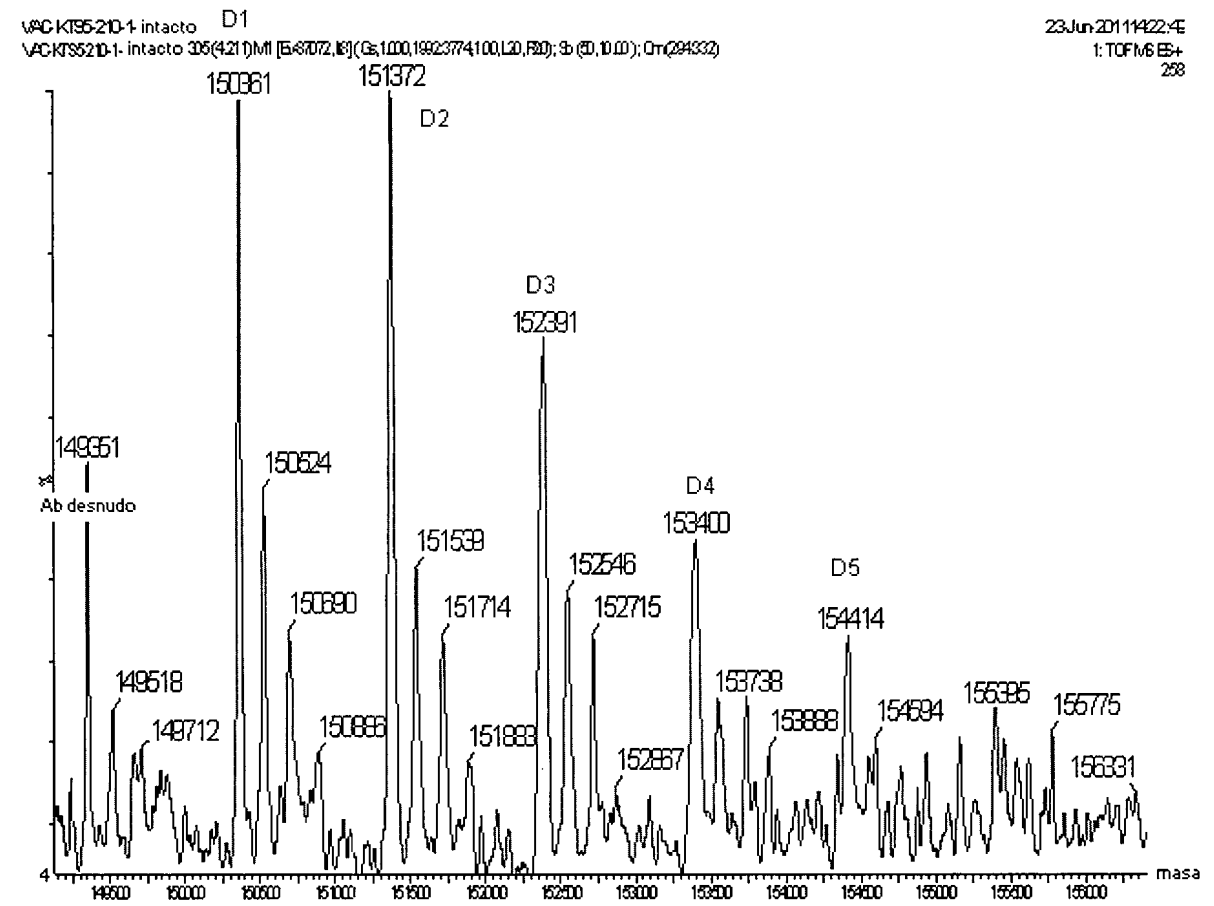


Figura 6: Espectro de masas de alta resolución (HRMS) deconvolucionado del conjugado del ej. 11 no desglicosilado



CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille
para asuntos de patentes.

Representation and Power-of-Attorney with notarial
authentication and Apostille for patent matters.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

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

SANOFI

domiciliado (s) en/of

54 rue La Boétie, 75008 Paris, France

por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; OSCAR CORREA BARBOSA, tpa. 71027 y EDNA SARMIENTO CHARRY, tpa. 65794, domiciliados en la Carrera 4ª No. 72-35, Bogotá, Colombia, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como nuestros representantes en todos los asuntos de patentes con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

do hereby appoint LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; OSCAR CORREA BARBOSA, tpa. 71027 y EDNA SARMIENTO CHARRY, tpa. 65794, domiciled at Carrera 4ª No. 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all patent matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court.

Además, conferimos poder a los abogados arriba nombrados, para que nos representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención; su traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con patentes, acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law to represent us before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in matters concerning the following: a) Obtainment of patents; its assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to patents; actions and suits instituted by us or against us. And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 20th January 2012

en/in Paris

por/by Josiane MERLIER
Director, Patent Administration



Firma

[Signature]

Jc soussigné Me Antoine BAILLY
Notaire à Paris, certifie matériellement
la signature de Mme Josiane MERLIER.

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

Signature

[Signature]

ID: 216727

208 palabras → 1 pág.

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par. Me B. Ailly

3. agissant en qualité de... Notaire

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

Attesté

5. à Paris

6. le... 12 AVR. 2012

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

8. sous n° 26506 Me...

9. Sceau : Jean M. KLIN
"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"

91

Autenticaciones que se hallan a continuación de un documento de representación y poder conferido en inglés y español por **SANOFI**, domiciliada en 54, rue La Boétie, 75008, Paris, Francia, y otorgado a los Doctores LUZ CLEMENCIA DE PAEZ (tpa 23555), OSCAR CORREA BARBOSA (tpa 71027) y EDNA SARMIENTO CHARRY (tpa 65794), todos domiciliados en Carrera 4 No. 72 – 35 Bogotá, Colombia.

Dado y firmado en Paris, el 20 de Enero 2012. Firma ilegible de Josiane MERLIER, Directora Administración Patentes.

Certificación de la firma de Josiane MERLIER por el Señor Antoine BAILLY, Notario en Paris. Firma ilegible del Señor Antoine BAILLY.

Sello: BAILLY POMMERY CAURO – Notarios asociados de una SCP – 30, rue de La Boétie – Paris 8°.

APOSTILLA

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

1. - República Francesa
El presente documento público
2. - ha sido firmado por el Señor BAILLY
3. - obrando en calidad de Notario
4. - con sello de su Despacho

CERTIFICADO

5. - En Paris
- 6.- El 12 de Abril 2012

7. - Por el Fiscal General ante el Tribunal Superior de Paris
8. - Bajo el número **24506**
9. - Sello: Tribunal Superior de Paris – República Francesa
10. - Firma ilegible de Jean MARTIN, funcionario del Ministerio Público.

JJT\JJT\ID-216727\WPCL0751

42
M^e **Antoine BAILLY**
Certifie le présent document
Conforme à l'original
qui lui a été présenté

Sanofi Ref No. FR2010/053

ASSIGNMENT AND AGREEMENT

Effective as of 26 July 2010, for value received and intending to be legally bound, I/we, the undersigned joint inventor(s) (Assignor(s)), sell, assign and transfer to **Sanofi** (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. FR2010/053, and entitled

DÉRIVÉS ANTICANCEREUX, LEUR PRÉPARATION ET LEUR APPLICATION THÉRAPEUTIQUE

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

Priority Application Filing Date: 26 July 2010
Priority Application No.: 1056103

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.

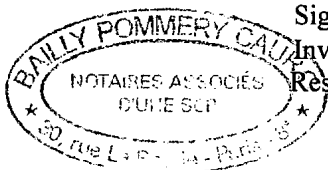
I/we agree that, when requested, I/we will, without charge to said assignee but at its expense, sign all papers, take all rightful oaths, and do all acts which may be necessary, desirable or convenient for securing and maintaining patents for said invention in any and all countries and for vesting title 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 Paris, France on this 29th day of September, 2011.
(City, State and Nation)

Je soussigné Me **Antoine BAILLY**
Notaire à Paris, certifie matériellement
la signature de M. **Alain COMMERÇON**.

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

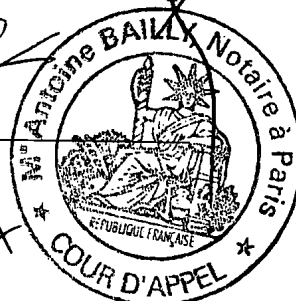


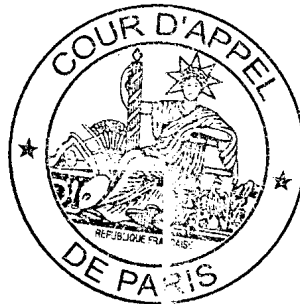
Signature: [Signature]
Inventor's Name: **COMMERÇON Alain**
Residential Address: c/o Sanofi,
Département Brevets,
174 avenue de France,
75013 PARIS, FRANCE

Witnessed by:

[Signature]
Laurie DELARBRE

[Signature]
Hervé MINOUX





APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par... *M^e BAILEY*

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

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

.....

Attesté

5. à Paris

6. le... **07 DEC. 2012**

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

.....

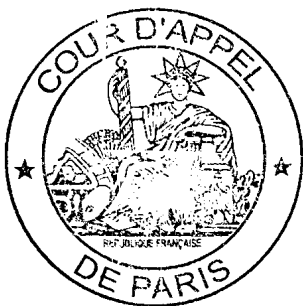
8. sous n°... **81375**

9. Sceau : **Michel LERNOUT**

.....

10. Signature : **Avocat Général**

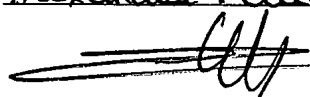
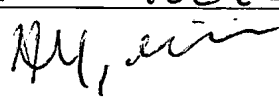
"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"



Signed at Vitry / Seine on this 28 day of September, 2011.
(City, State and Nation)

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

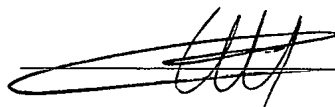
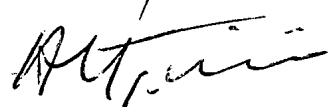
Witnessed by:

Alexandre Ferrer ANTONIO UGOLINI
 

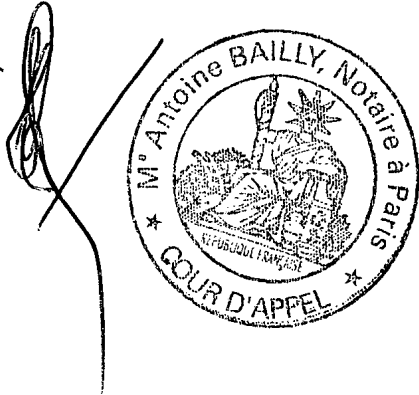
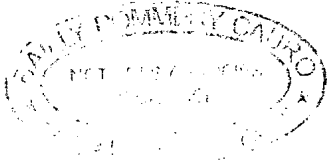
Signed at Vitry-sur-Seine on this 28 day of September, 2011.
(City, State and Nation)

Signature: 
Inventor's Name: **HUBERT Philippe**
Residential Address: c/o Sanofi,
Département Brevets,
174 avenue de France,
75013 PARIS, FRANCE

Witnessed by:

Alexandre Ferrer ANTONIO UGOLINI
 

Je soussigné Me **Antoine BAILLY**
Notaire à Paris, certifie matériellement
la signature de M. **Philippe HUBERT**
et Mme **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 SIMPLE REALIZADA POR SHARON BENREY PACHECO DEL SIGUIENTE DOCUMENTO, ESCRITO ORIGINALMENTE EN INGLÉS.

Sello en tinta:

El Señor Antoine BAILLY certifica que el presente documento está conforme con el original que tuvo a la vista. Firma ilegible del Notario.

Sello seco:

Antoine BAILLY, Notario Asociado en Paris – República Francesa.

Sanofi Ref No. FR2010/053

CESIÓN Y ACUERDO

Efectivo a partir del 26 de julio de 2010, por remuneración recibida y con la intención de que este acuerdo sea legalmente vinculante, yo/nosotros, el o los suscrito(s) inventor(es) conjunto(s) (Cedente(s)), vendo, cedo y transfiero a **Sanofi** (Cesionario), domiciliado en 174 avenue de France, 75013 PARIS, FRANCIA, y sus sucesores, cesionarios y representantes legales, la totalidad de los derechos, títulos e intereses relacionados en y sobre mi/nuestro invento y cualquier mejora al mismo para todos los países del mundo, en relación y sobre la solicitud de Cartas Patente, con el asignado expediente de abogado No. FR2010/053, y titulada

DERIVADOS ANTICANCERÍGENOS, SU PREPARACIÓN Y SU APLICACIÓN TERAPÉUTICA

y para todas las solicitudes patente que reivindiquen prioridad o se deriven de dichas solicitudes de prioridad:

Fecha de presentación de solicitud de prioridad: 26 de julio de 2010

Solicitud de prioridad No.: 1056103

y todos los derechos y privilegios, incluyendo todos y cualquiera de los beneficios de acuerdo a la Convención Internacional para la Protección de la Propiedad Industrial, incluyendo el

derecho a reivindicar prioridad basado en las solicitudes anteriores y bajo todas las Cartas Patente que sean concedidas como resultado de las mismas, y todos los derechos, títulos e intereses en y sobre cada solicitud de patente presentada o por presentar sobre dicha invención en cualquier otro país u organización de patentes, incluyendo continuaciones, divisiones, renovaciones, prórrogas, y cualquier solicitud de sustitución de la misma, y todas y cualquiera de las patentes que sean emitidas a partir de las mismas, así como todas las reemisiones, patentes transitorias o extensiones y derechos de exclusividad gubernamental sobre las mismas.

Yo/nosotros autorizamos y solicitamos a las autoridades competentes conceder y expedir todas y cualquiera de las patentes de dicha invención a dicho cesionario o su sucesor, cesionario y representantes legales, o a aquellas personas que dicho cedente pueda designar.

Yo/nosotros acordamos, a solicitud, y sin cargo a dicho cesionario pero a sus expensas, firmar todos los documentos, prestar todos los juramentos correspondientes, y realizar todos los actos necesarios, deseables o convenientes para asegurar y mantener las patentes de dicha invención en todos o cualquiera de los países y conferir plena titularidad sobre las mismas a dicho cesionario, sus sucesores, cesionarios, representantes legales o personas designadas.

Yo/nosotros acordamos con dicho cesionario, sus sucesores, cesionarios y representantes legales, que los derechos y propiedad aquí transferidas están libre de todo gravamen, y que yo/nosotros estoy en todo mi derecho a transferir los mismos de la manera aquí expresada.

Firmado en PARÍS, FRANCIA el día 29 de septiembre de 2011.

(Ciudad, Estado y Nación)

Sello en tinta:

Yo, el abajo firmante Sr. Antoine BAILLY

Notario en París, certifico materialmente la firma del señor Alain COMMERÇON que aparece en el presente documento. Esta certificación no tiene ninguna verificación de la exactitud de los hechos y actos mencionados en el presente documento

Firma: (*Firma ilegible*)

Nombre del inventor: COMMERÇON Alain

Dirección de residencia: c/o Sanofi,

Departamento patentes,

174 avenue de France

75013 PARIS, FRANCIA

Sello en tinta:

BAILLY POMMERY CAURO

NOTARIOS ASOCIADOS DE UNA SCP

30, rue de la Boétie – París 8°.

Atestiguado por:

(*Firma ilegible*)

Nombre ilegible

(*Firma ilegible*)

Hervé MINOUX

(*Firma ilegible*)

Sello en tinta:

Antoine BAILLY, Notario en París

Tribunal de apelación

Firmado en Vitry / Seine el día 28 de septiembre de 2011.

(Ciudad, Estado y Nación)

Firma: (*Firma ilegible*)

Nombre del inventor: GAUZY-LAZO Laurence

Dirección de residencia: c/o Sanofi,

Departamento patentes,

174 avenue de France

75013 PARIS, FRANCIA

Atestiguado por:

Alexandra Ferrier

(*Firma ilegible*)

ANTONIO UGOLINI

(*Firma ilegible*)

Firmado en Vitry – sur - Seine el día 28 de septiembre de 2011.

(Ciudad, Estado y Nación)

Firma: (*Firma ilegible*)

Nombre del inventor: HUBERT Philippe

Dirección de residencia: c/o Sanofi,

Departamento patentes,

174 avenue de France

75013 PARIS, FRANCIA

Atestiguado por:

Alexandra Ferrier

(*Firma ilegible*)

ANTONIO UGOLINI

(*Firma ilegible*)

Sello en tinta:

Yo, el abajo firmante Sr. Antoine BAILLY

Notario en París, certifico materialmente la firma del señor Philippe HUBERT y la señora Laurence GAUZY-LAZO que aparecen en el presente documento. Esta certificación no tiene ninguna verificación de la exactitud de los hechos y actos mencionados en el presente

documento

(*Firma ilegible*)

Sello en tinta:

BAILLY POMMERY CAURO

NOTARIOS ASOCIADOS DE UNA SCP

30, rue de la Boétie – París 8°.

Sello en tinta:

Antoine BAILLY, Notario en París

Tribunal de apelación

APOSTILLA

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

1. - República Francesa

El presente documento público

2. - ha sido firmado por el señor BAILLY

3. - obrando en calidad de **NOTARIO**

4. - con sello de **SU DESPACHO**

Certificado

5. - En París

6. - El 07 de diciembre de 2012

7. - Por el *Fiscal General del Tribunal Superior de Paris*

8. - Bajo el número 81575

9. - Sello: Tribunal Superior de Paris – República Francesa.

10. - Firma: Sello en tinta de la firma ilegible del Señor Michel LERNOUT, funcionario del Ministerio Público.

“La apostilla sólo confirma la autenticidad de la firma, sello o estampilla de este documento. Bajo ninguna circunstancia confirma que el contenido del documento es correcto o que la República Francesa aprueba su contenido”.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 004205

Bogotá D.C., Enero 16 de 2013 - 07:52:08

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	495400006	15/01/2013	25.579.000.00
--------------	-----------------	-----------	-----------	------------	---------------

*** Conceptos Pagados ***

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
-----------------	----------	--------------	-------------

1 50005-05	SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-013434- -00000-0000

Fecha: 2013-01-24 16:49:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 99

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

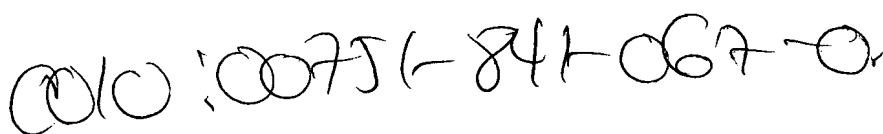
Folios: 99

0010:00751-841-067-0

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

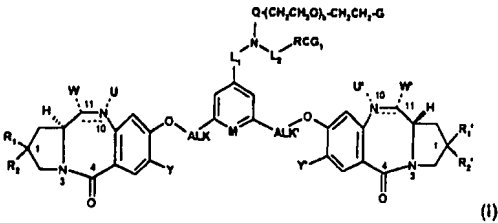
. Enero 16 de 2013 - 07:52:26

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 13 - 006545	
				Bogotá D.C., Enero 22 de 2013 - 16:27:53	
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	495399866	22/01/2013	25.446.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO	
19 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	570.000.00	
				=====	
				\$570.000.00	
SON: **QUINIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: 					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-013434- -00000-0000 Fecha: 2013-01-24 16:49:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 99					
					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240 Enero 23 de 2013 - 07:34:05					

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07D 487/004	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) SANOFI	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 1056103	(32) Fecha 2010/07/26	(33) País FR
		(72) Inventor(es) ALAIN COMMERÇON Y OTROS	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2013/02/26		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 2012/02/02	
Fecha de presentación de la solicitud: 2011/07/25		N° publicación: WO 2012/014147 A1	
No. de solicitud PCT/IB2011/053310			
(54) Titulo: DERIVADOS ANTICANCEROSOS, SU PREPARACIÓN Y SU APLICACIÓN TERAPÉUTICA			

Resumen:

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



PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐
☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒
☒
☐
☒

Indicación que se solicita una PCT

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

PIN2-FPA (2009-11-18)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-013434-00000-0000

Fecha: 2013-01-24 16:49:34
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION
Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve. 378 FASENACIONALI
Folios: 99