Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

CSA220157

Organizacion y Digitalizacion CSA Ltda

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO INVENTARIO

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 08-77425

54. **TÍTULO** AGENTES CITOTOXICOS QUE COMPRENDEN NUEVOS DERIVADOS DE TOMAIMICINA Y SU USO TERAPEUTICO

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** SANOFI-AVENTIS

DOMICILIO PARIS, FRANCIA

74. **APODERADO** EMILIO FERRERO
C.C. 438.019 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D. C.,**

(FORMA P-10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-077425- -00000-0000
Fecha: 2008-07-25 16:07:00 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 331

ción

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1 ☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **SANOFI-AVENTIS**
sociedad constituida y existente bajo las leyes de Francia

Dirección: 174 Avenue de France,
75013 Paris,
Francia

Domicilio: Paris,
Francia

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ____
Número ____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ____
Número 438.019 T.P 31.929

4 INVENTOR (ES) (72)

1. **Laurence GAUZY**
c/o Sanofi-Aventis,
174 Avenue de France,
75013 Paris,
Francia

2. **Robert ZHAO**
128 Sidney Street,
Cambridge,
Massachusetts 02139,
Estados Unidos de América

3. **Yonghong DENG**
128 Sidney Street,
Cambridge,
Massachusetts 02139,
Estados Unidos de América

4. **Wei LI**
128 Sidney Street,
Cambridge,
Massachusetts 02139,
Estados Unidos de América

5. **Hervé BOUCHARD**
c/o Sanofi-Aventis,
174 Avenue de France,
75013 Paris,
Francia

6. **Ravi V. J. CHARI**
128 Sidney Street,
Cambridge,
Massachusetts 02139,
Estados Unidos de América

7. **Alain COMMERÇON**
c/o Sanofi-Aventis,
174 Avenue de France,
75013 Paris,
Francia

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2007/000142 Fecha: 22 de enero de 2007
Publicación Internacional No. WO 2007/085930 A1 Fecha: 2 de agosto de 2007

6 Título (54)

AGENTES CITOTOXICOS QUE COMPRENDEN NUEVOS DERIVADOS DE TOMAIMICINA Y SU USO TERAPEUTICO

7 **Clasificación Internacional (51)** C07D 487/004

8 **Prioridad** SI☒ NO☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	EP	25 de enero de 2006	06290154.1

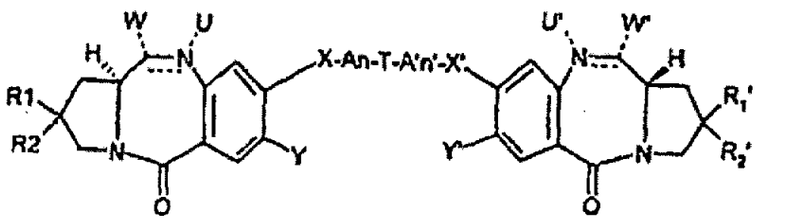
9 **Comprobante de pago No.:** 08-52,337 **Fecha:** 1 de julio de 2008

10 **Anexos:**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 501.000.oo.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



(I)

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : _____

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

NNJ

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2007/085930 A1

   Descripción:

   Páginas 145 en el idioma original

   Páginas 135 en español

   Reivindicaciones: Número (s) 41

   Figuras: Número (s) 3

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

3. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la Inscripción del Cambio de las direcciones de **Laurence GAUZY, Hervé BOUCHARD** y **Alain COMMERÇON.**

4. ☒ Extracto de publicación.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

ME-43

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 9 - COLOMBIA

179

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of- Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

14475
7804

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

domiciliado (s) en/of **174, avenue de France**
F-75013 Paris, Francia, hereby ratify the patent application No. 05.057.645 filed by EMILIO FERRERO on June 14, 2005 and

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative-contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, 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 these rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit

COPIA AUTENTICA QUE SE EXPIDE EN 25 AÑO SUSTRACCION DE LOS INTERESADOS DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA PRESENTE FOTOCOPIA CORRESPONDE AL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
25 JUN. 2008
PABLO ANTONIO [illegible]
NOTARIO (E)

© CAVELIER ABOGADOS

6

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.

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 _____

en/in _____

por/by _____

Firma / Signature

Sanofi-Aventis Dr. Markus Jacobi

Vu pour certification matérielle de la signature de M. Markus Jacobi apposée ci-dessus.

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. - République Française
   Le présent acte public
2. - a été signé par Me KOENIG
3. - agissant en qualité de NOTAIRES
4. - est revêtu du sceau de Lausanne

ATTESTE

5. - à Paris le 21 JUIN 2005
6. - Par le Procureur Gal près la Cour d'Appel
7. - Sous N° 81902/2005
8. - Sceau
9. - Le signature

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

26 JUN 2008

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

© CAVELIER ABOGADOS

7

K. L. ASSOCIÉS
Notaires
20, rue de la Paix
75002 PARIS
Tél. 01 55 04 70 00 - Fax 01 40 20 42 43

CERTIFICAT NOTARIE (SOCIETE)

Le Notaire soussigné certifie : que la signature qui précède de :
Markus JACOBI

Est authentique et que le signataire occupe actuellement le poste de Directeur Operations Brevets Europe
De la société sanofi-aventis,
et que ladite société fonctionne et est régie par le droit français
que la société est sise174 avenue de France, 75013 PARIS, France
et que le signataire est habilité à octroyer le présent pouvoir.

Tous les faits susmentionnés sont connus du Notaire qui a examiné les documents correspondants et les certifie.

Etabli et signé à Paris
Le 20/06/05

Le Notaire
(signature – cachet)

Alain KOENIG
NOTAIRE
29, rue de la Paix - 75002 PARIS Cedex 02

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Pays :
   Le présent acte public
2. a été signé par
3. agissant en qualité de
4. est revêtu du sceau/cachet de/du

Attesté

5. à
6. le
7. par
8. N°
9. Sceau/cachet :
10. Signature :

COTEJO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
26 JUN 2008
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

26 JUN 2008

PABLO MENDEZ BARRAJAS
NOTARIO (E)

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. - République Française
Le présent acte public
2. - a été signé par Mme KAMIL
3. - agissant en qualité de Notaire
4. - est revêtu du sceau de Association
ATTESTE
5. - à Paris le 21 JUIN 2005
7. - Par le Procureur Gal près la Cour d'Appel
8. - Sous N° 2103
9. - Sceau
Le
signature

7

Traducción Oficial No. 20050708 de un documento escrito en Francés y en INGLES, el cual, para su identificación se sella con el sello de María Eugenia Sanint Traductora Oficial según Resolución 1448 del Ministerio de Justicia.

LEGALIZACIONES

Escritas en FRANCES, al pie de un PODER escrito en ESPAÑOL, otorgado por **SANOFI- AVENTIS**, a favor de EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA PAEZ Y GERMAN CAVELIER (por el cual se ratifica la solicitud de patente NO. 05.057.645 presentada por EMILIO FERRERO el 14 de junio de 2005.)

(Firma Ilegible)
Dr. Markus Jacobi
Sanofi-Aventis

Visto para la certificación material de la firma del Sr. Markus Jacobi, puesta anteriormente.
(Firma Ilegible)
.L. ASSOCIES
Notarios
20, rue de la Paix
75002 PARIS

Sello del Notario

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)
El Notario suscrito certifica que la firma puesta anteriormente de

CONSUL NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL HE TENIDO A LA VISTA
26 JUN 2008
NOTARIO(A)

Marcus Jacobi

es auténtica, y que el signatario ocupa actualmente el cargo de Director de Operaciones Patentes Europa, de la sociedad Sanofi-Aventis, y que la dicha sociedad funciona y está regida por el derecho francés; que la sociedad tiene su sede en el 174, avenue de France, 75013, PARIS, Francia, y que el signatario está habilitado para otorgar el presente poder.

Todos los hechos mencionados anteriormente son de conocimiento del Notario, quien examinó los documentos correspondientes y los certifica.

Dado y firmado en París, hoy, 20 de junio de 2005.

El Notario
(Firma – sello)

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 1448 DEL
5 DE SEPTIEMBRE DE 1990
del Ministerio de Justicia

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 1448 DEL
5 DE SEPTIEMBRE DE 1990
del Ministerio de Justicia

(Ilegible)
Alain Koenig
NOTARIO
20, rue de la Paix, París

APOSTILLA
(Convenio de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: República Francesa

   El presente Documento Público

2. Fue firmado por el Abogado Koenig

3. Quien actúa en calidad de NOTARIO

4. Lleva el sello de SU DESPACHO

Certifica

5. En París 6. El 21 de junio de 2005

7. Por el Procurador General ante el Tribunal de Primera Instancia

8. Bajo el Número 81903

9. Sello/Estampilla:

   Sello del Tribunal de Primera Instancia de París.

   10- Firma: (Ilegible)

EL SUSCRITO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
26 JUN 2008
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA.
Traductora : Maria Eugenia Sanint
Bogotá, 8 de julio de 2005

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCIÓN No. 1771 DEL
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SAN [illegible] DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIR
MA(S) PUESTA(S) POR

María Eugenia Sanmt

QUIEN(ES) IDENTIFICADO(S) CON C.C. No.(s)

Y TP No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA 12 JUL 2005

NOTARIA SEXTA
PABLO MENDEZ
BARAJAS
Notario Sexto Encargado

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 JUL 12 P 1:28

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

4 4 9 2 4 3

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

20 JUN 2008

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
2 August 2007 (02.08.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/085930 A1

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

(21) International Application Number:
PCT/IB2007/000142

(22) International Filing Date: 22 January 2007 (22.01.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
06290154.1 25 January 2006 (25.01.2006) EP

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **GAUZY, Laurence** [FR/FR]; 13, Quai Jules Guesde, F-94400 Vitry Sur Seine (FR). **ZHAO, Robert** [US/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **DENG, Yonghong** [CN/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **LI, Wei** [CN/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **BOUCHARD, Hervé** [FR/FR]; 13, Quai Jules Guesde, F-94400 Vitry Sur Seine (FR). **CHARI, Ravi, V.J.** [US/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **COMMERCON, Alain** [FR/FR]; 13, Quai Jules Guesde, F-94400 Vitry Sur Seine (FR).

(74) Agents: **COLOMBET, Alain** et al.; CABINET LAVOIX, 2, Place D'estienne D'orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).

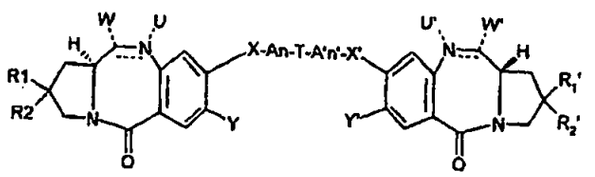
(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CYTOTOXIC AGENTS COMPRISING NEW TOMAYMYCIN DERIVATIVES AND THEIR THERAPEUTIC USE



(I)

(57) Abstract: The present invention is related to new tomaymycin of formula (I) derivatives, their process of preparation and their therapeutic uses .

WO 2007/085930 A1

CYTOTOXIC AGENTS COMPRISING NEW TOMAYMYCIN DERIVATIVES AND THEIR THERAPEUTIC USE

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to novel cytotoxic agents and their therapeutic use. More specifically, the invention relates to novel cytotoxic agents comprising tomaymycin derivatives and their therapeutic use. These novel cytotoxic agents have therapeutic use as a result of delivering the tomaymycin derivatives to a specific cell population in a targeted fashion by chemically linking the tomaymycin derivative to a cell binding agent.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Many reports have appeared on the attempted specific targeting of tumor cells with monoclonal antibody-drug conjugates (Sela et al, in *Immuno-conjugates,* 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al, in *Targeted Drugs* 1-22 (E. Goldberg, ed. 1983); Diener et al, in *Antibody mediated delivery systems,* 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al, in *Antibody mediated delivery systems,* 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol et al, in *Antibody mediated delivery systems,* 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988); G.A. Pietersz & K. Krauer, 2, *J. Drug Targeting*, 183-215 (1994); R. V. J. Chari, 31 *Adv. Drug Delivery Revs.*, 89-104 (1998); W.A. Blattler & R.V.J. Chari, in *Anticancer Agents, Frontiers in Cancer Chemotherapy*, 317-338, ACS Symposium Series 796; and I. Ojima et al eds, *American Chemical Society* 2001}. All references and patents cited herein are incorporated by reference.

Cytotoxic drugs such as methotrexate, daunorubicin, doxorubicin, vincristine, vinblastine, melphalan, mitomycin C, and chlorambucil have been conjugated to a variety of murine monoclonal antibodies. In some cases, the drug molecules were linked to the antibody molecules through an intermediary carrier molecule such as serum albumin (Garnett et al, 46, *Cancer Res.* 2407-2412 (1986); Ohkawa et al 23, *Cancer Immunol. Immunother.* 81-86 (1986); Endo et al, 47 *Cancer Res.* 1076-1080 (1980)), dextran (Hurwitz et al, 2 *Appl. Biochem.* 25-35 (1980); Manabi et al, 34 *Biochem. Pharmacol.* 289-291 (1985);

Dillman et al, 46 *Cancer Res.*, 4886-4891 (1986); Shoval et al , 85, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 8276-8280 (1988)), or polyglutamic acid (Tsukada et al, 73, *J. Natl. Canc. Inst.*, 721-729 (1984); Kato et al 27 *J. Med. Chem.*, 1602-1607 (1984); Tsukada et al, 52, *Br. J. Cancer*, 111-116 (1985)).

A wide array of linker technologies has been employed for the preparation of such immunoconjugates and both cleavable and non-cleavable linkers have been investigated. In most cases, the full cytotoxic potential of the drugs could only be observed, however, if the drug molecules could be released from the conjugates in unmodified form at the target site.

One of the cleavable linkers that has been employed for the preparation of antibody-drug conjugates is an acid-labile linker based on *cis*-aconitic acid that takes advantage of the acidic environment of different intracellular compartments such as the endosomes encountered during receptor mediated endocytosis and the lysosomes. Shen and Ryser introduced this method for the preparation of conjugates of daunorubicin with macromolecular carriers (102 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1048-1054 (1981)). Yang and Reisfeld used the same technique to conjugate daunorubicin to an anti-melanoma antibody (80 *J. Natl. Canc. Inst.* 1154-1159 (1988)). Dillman et al. also used an acid-labile linker in a similar fashion to prepare conjugates of daunorubicin with an anti-T cell antibody (48 *Cancer Res.* 6097-6102 (1988)).

An alternative approach, explored by Trouet et al, involved linking daunorubicin to an antibody via a peptide spacer arm.(79 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 626-629 (1982)). This was done under the premise that free drug could be released from such a conjugate by the action of lysosomal peptidases.

In vitro cytotoxicity tests, however, have revealed that antibody-drug conjugates rarely achieved the same cytotoxic potency as the free unconjugated drugs. This suggested that mechanisms by which drug molecules are released from the antibodies could be very inefficient. In the area of immunotoxins, conjugates formed via disulfide bridges between monoclonal antibodies and catalytically active protein toxins were shown to be more cytotoxic than conjugates containing other linkers. *See*, Lambert et al, 260 *J. Biol. Chem.* 12035-12041 (1985); Lambert et al, in *Immunotoxins* 175-209 (A.

Frankel, ed. 1988); Ghetie et al, 48, *Cancer Res.* 2610-2617 (1988). This was attributed to the high intracellular concentration of glutathione contributing to the efficient cleavage of the disulfide bond between an antibody molecule and a toxin. Despite this, there are only a few reported examples of the use of disulfide bridges for the preparation of conjugates between drugs and macromolecules. Shen et al (260, *J. Biol. Chem.* 10905-10908 (1985)) described the conversion of methotrexate into a mercaptoethylamide derivative followed by conjugation with poly-D-lysine via a disulfide bond. Another report described the preparation of a conjugate of the trisulfide containing toxic drug calicheamycin with an antibody (Hinman et al., 53 *Cancer Res.* 3336-3342 (1993)).

One reason for the lack of disulfide linked antibody-drug conjugates is the unavailability of cytotoxic drugs possessing a sulfur atom containing moiety that can be readily used to link the drug to an antibody via a disulfide bridge. Furthermore, chemical modification of existing drugs is difficult without diminishing their cytotoxic potential.

Another major drawback with existing antibody-drug conjugates is their inability to deliver a sufficient concentration of drug to the target site because of the limited number of targeted antigens and the relatively moderate cytotoxicity of cancerostatic drugs like methotrexate, daunorubicin, and vincristine. In order to achieve significant cytotoxicity, linkage of a large number of drug molecules, either directly to the antibody or through a polymeric carrier molecule, becomes necessary. However, such heavily modified antibodies often display impaired binding to the target antigen and fast *in vivo* clearance from the blood stream.

In spite of the above-described difficulties, useful cytotoxic agents comprising cell binding moieties and the group of cytotoxic drugs known as maytansinoids have been reported (USP 5,208,020, USP 5,416,064, and R. V. J. Chari, 31 *Advanced Drug Delivery Reviews* 89-104 (1998)). Similarly, useful cytotoxic agents comprising cell binding moieties and analogues and derivatives of the potent antitumor antibotic CC-1065 have also been reported (USP 5,475,092, USP 5,585,499 and USP 6,756,397).

Tomaymycin derivatives are pyrrolo[1,4]benzodiazepines (PBDs), a known class of compounds exerting their biological properties by covalently binding to the N2 of guanine in the minor groove of DNA. PBDs include a number of minor groove binders such as anthramycin, neothramycin and DC-81. Tomaymycin antitumor activity is however limited because of its non-specific toxicity towards normal cells. Thus there is a need to increase the therapeutic activity, and diminish the non-specific toxic effects of tomaymycin compounds. The present inventors have shown that this need can be met by targeted delivery of tomaymcin compounds by linking them to cell binding agents. Additionally, there is a need to develop tomaymycin derivatives that are soluble and stable in aqueous solutions. Further, tomaymycin is not sufficiently potent to be used in conjugates of cell binding agents.

Recently, a few new PBD derivatives and their anti-tumour activity in preclinical models have been disclosed (WO 00/12508 and WO2005/085260). However, initial clinical trials in humans indicate that compounds of this class are severely toxic, based on the very low dose that can be administered to humans (I. Puzanov, Proc. AACR-NCI-EORTC International Conference, Philadelphia, USA 2005, Abstract #B117). Thus, it is desired to provide alternative derivatives that are more potent and/or may be bonded to cell binding agents.

Accordingly, a method of treating diseases with tomaymycin derivatives wherein their side effects are reduced without compromising their cytotoxicity is greatly needed.

SUMMARY OF THE INVENTION

As disclosed in a first embodiment, one object of the present invention is to provide tomaymycin derivatives that are highly toxic and that can still be effectively used in the treatment of many diseases.

Another object of the present invention is to provide novel tomaymycin derivatives, optionally linkable or linked to a cell binding agent.

In a second embodiment, the present invention provides a therapeutic composition comprising:

(A) an effective amount of one or more tomaymycin derivatives optionally linkable or linked to a cell binding agent, and

(B) a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or excipient

In a third embodiment, the present invention provides a method of killing selected cell populations comprising contacting target cells or tissue containing target cells, with a cytotoxic amount of a cytotoxic agent comprising one or more tomaymycin derivatives, optionally linkable or linked to a cell binding agent.

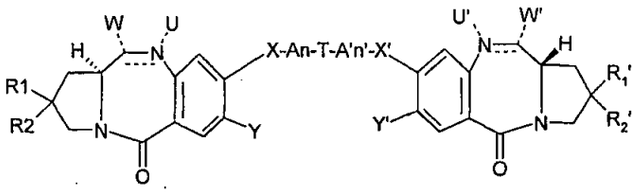
DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

This invention is based on the synthesis of novel tomaymycin derivatives that retain high cytotoxicity and that can be effectively linked to cell binding agents. It has previously been shown that the linkage of highly cytotoxic drugs to antibodies using a cleavable link, such as a disulfide bond, ensures the release of fully active drugs inside the cell, and such conjugates are cytotoxic in an antigen specific manner (US 6,340,701; US 6,372,738; US 6,436,931). However, the art reveals that it is extremely difficult to modify existing drugs without diminishing their cytotoxic potential. The disclosed invention overcomes this problem by modifying the disclosed tomaymycin derivatives with chemical moieties. As a result, the disclosed novel tomaymycin derivatives preserve, and in some cases could even enhance the cytotoxic potency of tomaymycin derivatives. The cell binding agent-tomaymycin derivative complexes permit the full measure of the cytotoxic action of the tomaymycin derivatives to be applied in a targeted fashion against unwanted cells only, therefore, avoiding side effects due to damage to non-targeted healthy cells. Thus, the invention provides useful agents for the elimination of diseased or abnormal cells that are to be killed or lysed such as tumor cells (particularly solid tumor cells).

The cytotoxic agent according to the present invention comprises one or more tomaymycin derivatives, optionally linkable or linked to a cell binding agent via a linking group. The linking group is part of a chemical moiety that is covalently bound to a tomaymycin derivative through conventional methods. In

a preferred embodiment, the chemical moiety can be covalently bound to the tomaymycin derivative via a disulfide bond.

The tomaymycin derivatives useful in the present invention have the formula (I) shown below:



(I)

wherein

---- represents an optional single bond;

 represents either a single bond or a double bond ;

provided that when  represents a single bond, U and U', the same or different, independently represent H, and W and W', the same or different, are independently selected from the group consisting of OH, an ether such as -OR, an ester (e.g. an acetate), such as -OCOR, a carbonate such as -OCOOR, a carbamate such as –OCONRR', a cyclic carbamate, such that N10 and C11 are a part of the cycle, a urea such as –NRCONRR', a thiocarbamate such as -OCSNHR, a cyclic thiocarbamate such that N10 and C11 are a part of the cycle, -SH, a sulfide such as -SR, a sulphoxide such as -SOR, a sulfone such as -SOOR, a sulphonate such as $-SO_3^-$, a sulfonamide such as -NRSOOR, an amine such as –NRR', optionally cyclic amine such that N10 and C11 are a part of the cycle, a hydroxylamine derivative such as -NROR', an amide such as –NRCOR, an azido such as $-N_3$, a cyano, a halo, a trialkyl or triarylphosphonium, an aminoacid-derived group; Preferably W and W' are the same or different and are OH, OMe, OEt, $NHCONH_2$, SMe;

and when  represents a double bond, U and U' are absent and W and W' represent H;

- R1, R2, R1', R2' are the same or different and independently chosen from Halide or Alkyl optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR,

Aryl, Het, $S(O)_qR$, or R1 and R2 and R1' and R2' form together a double bond containing group =B and =B' respectively.
Preferably, R1 and R2 and R1' and R2' form together a double bond containing group =B and =B' respectively.

- B and B' are the same or different and independently chosen from Alkenyl being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Aryl, Het, $S(O)_qR$ or B and B' represent an oxygen atom.
  Preferably, B=B'.
  More preferably, B=B'= $=CH_2$ or $=CH-CH_3$,

- X, X' are the same or different and independently chosen from one or more –O-, -NR-, -(C=O)-, $-S(O)_q-$.
  Preferably, X=X'.
  More preferably, X=X'=O.

- A, A' are the same or different and independently chosen from Alkyl or Alkenyl optionally containing an oxygen, a nitrogen or a sulfur atom, each being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$, Aryl, Het, Alkyl, Alkenyl.
  Preferably, A=A'.
  More preferably, A=A'=linear unsubstituted alkyl.

- Y, Y' are the same or different and independently chosen from H, OR;
  Preferably, Y=Y'.
  More preferably, Y=Y'=OAlkyl, more preferably OMethyl.

- T is -NR-, -O-, $-S(O)_q-$, or a 4 to 10-membered aryl, cycloalkyl, heterocyclic or heteroaryl, each being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, and/or linker(s), or a branched Alkyl, optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$ and/or linker(s), or a linear

Alkyl substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$ and/or linker(s).

Preferably, T is a 4 to 10-membered aryl or heteroaryl, more preferably phenyl or pyridyl, optionally substituted by one or more linker(s).

Said linker comprises a linking group. Suitable linking groups are well known in the art and include thiol, sulfide, disulfide groups, thioether groups, acid labile groups, photolabile groups, peptidase labile groups and esterase labile groups. Preferred are disulfide groups and thioether groups.

When the linking group is a thiol-, sulfide (or so-called thioether –S-) or disulfide (-S-S-) -containing group, the side chain carrying the thiol, the sulfide or disulfide group can be linear or branched, aromatic or heterocyclic. One of ordinary skill in the art can readily identify suitable side chains.

Preferably, said linker is of formula:

–G-D-(Z)p-S-Z'

where

G is a single or double bond, –O-, -S- or –NR-;

D is a single bond or –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- ;

where E and F are the same or different and are independently chosen from linear or branched $–(OCH_2CH_2)_i$Alkyl$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alkyl$(OCH_2CH_2)_i$-Alkyl-, -$(OCH_2CH_2)_i$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Cycloalkyl$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Heterocyclic$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Aryl$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Heteroaryl$(OCH_2CH_2)_j$-, –Alkyl-$(OCH_2CH_2)_i$Alkyl$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alkyl-$(OCH_2CH_2)_i$-, -Alkyl-$(OCH_2CH_2)_i$Cycloalkyl$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alkyl$(OCH_2CH_2)_i$Heterocyclic$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alkyl-$(OCH_2CH_2)_i$Aryl$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alkyl$(OCH_2CH_2)_i$Heteroaryl$(OCH_2CH_2)_j$-, -Cycloalkyl-Alkyl-, -Alkyl-Cycloalkyl-, -Heterocyclic-Alkyl-, -Alkyl-Heterocyclic-, -Alkyl-Aryl-, -Aryl-Alkyl-, -Alkyl-Heteroaryl- , -Heteroaryl-Alkyl-;

where i and j, identical or different are integers and independently chosen from 0, 1 to 2000;

Z is linear or branched -Alkyl-;

p is 0 or 1;

Z' represents H, a thiol protecting group such as COR, R_{20} or SR_{20}, wherein R_{20} represents H, methyl, Alkyl, optionally substituted Cycloalkyl, aryl, heteroaryl or heterocyclic, provided that when Z' is H, said compound is in equilibrium with the corresponding compound formed by intramolecular cyclisation resulting from addition of the thiol group –SH on the imine bond –NH= of one of the PBD moieties.

- n, n', equal or different are 0 or 1.

- q is 0, 1 or 2.

- R, R' are equal or different and independently chosen from H, Alkyl, Aryl, each being optionally substituted by Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, Aryl, Het;

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

The present invention refers to following preferred embodiments or any combination of any of them:

- G is a single bond or –O- or –NR-;
- G is –O-;
- D is a single bond or –E-, -E-NR-CO-, -ECO-, -CO-E-;
- D is –E-, -E-NR-CO-;.
- D is -E-NR-CO-;
- E is linear or branched –Alkyl-, $-(OCH_2CH_2)_l-$ or –Alkyl-heterocyclic;
- E is linear or branched –Alkyl-;

- Z is $-(CH_2)_2-C(CH_3)_2-$;
- p is 0 or 1;
- Z' is H or SR_{20}, wherein R_{20} represents Alkyl, aryl, heterocyclic or heteroaryl;
- Z' is H or SR_{20}, wherein R_{20} represents Alkyl.

Specific examples of the thiol-, sulfide- or disulfide-containing linkers include

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_y(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_y SZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(OCO)(R_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CONR_{19})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-phenyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-furyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-thiazolyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-thienyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-morpholino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$piperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-N-methylpiperazin--$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-phenyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-furyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolyl-QSZ',

$-(CR_{13}R_{14})_t$-thiazolyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-thienyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-morpholino-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-QSZ',

$-(CR_{13}R_{14})_t$-N-methylpiperazino-QSZ', or

$-O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-O(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-O(CR_{13}R_{14})_t (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t (OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-O-phenyl-QSZ', -O-furyl-QSZ', -O-oxazolyl-QSZ', -O-thiazolyl-QSZ',

-O-thienyl-QSZ', -O-imidazolyl-QSZ', -O-morpholino-QSZ', -O-piperazino-QSZ',

-O-N-methylpiperazino-QSZ',

$-OCO(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)_v(CR_{15}R_{16})_u (OCH_2CH_2)_y SZ'$,

$-OCO-(CR_{13}R_{14})_t (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-OCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u (OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-OCO-phenyl-QSZ', -OCO-furyl-QSZ', -OCO-oxazolyl-QSZ', -OCO-thiazolyl-QSZ', -OCO-thienyl-QSZ', -OCO-imidazolyl-QSZ', -OCO-morpholino-QSZ', -OCO-piperazino-QSZ', -OCO-N-methylpiperazino-QSZ', or

$-CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_y SZ'$,
$-CO-(CR_{13}R_{14})_t (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-CO-phenyl-QSZ', -CO-furyl-QSZ', -CO-oxazolyl-QSZ', -CO-thiazolyl-QSZ', -CO-thienyl-QSZ', -CO-imidazolyl-QSZ', -CO-morpholino-QSZ', -CO-piperazino-QSZ', -CO-piperidino-QSZ', -CO-N-methylpiperazino-QSZ',

$-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO\ NR_{12}\ (CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO$-phenyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-furyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-oxazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-thiazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-thienyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-imidazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-morpholino-QSZ', $-NR_{19}CO$-piperazino-QSZ', $-NR_{19}CO$-piperidino-QSZ', $-NR_{19}CO$-N-methylpiperazino-QSZ',
$-NR_{19}$-phenyl-QSZ', $-NR_{19}$-furyl-QSZ', $-NR_{19}$-oxazolyl-QSZ', $-NR_{19}$-thiazolyl-QSZ', $-NR_{19}$-thienyl-QSZ', $-NR_{19}$-imidazolyl-QSZ', $-NR_{19}$-morpholino-QSZ', $-NR_{19}$-piperazino-QSZ', $-NR_{19}$-piperidino-QSZ', $-NR_{19}$-N-methylpiperazino-QSZ',
$-NR_{19}CO-NR_{12}$-phenyl-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-oxazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-thiazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-thienyl-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-piperidino-QSZ',

$-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-SCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u (OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-SCO-morpholino-QSZ', -SCO-piperazino-QSZ', -SCO-piperidino-QSZ', and -SCO-N-methylpiperazino-QSZ', wherein:

Z' is H, a thiol protecting group such as COR, R_{20}' or SR_{20}' wherein R_{20}' represents H, alkyl, aryl, heterocyclic or heteroaryl,

wherein Q is a direct link or a linear alkyl or branched alkyl having from 1-10 carbon atoms or a polyethylene glycol spacer with 2 to 20 repeating ethylene oxy units;

R_{19} and R_{12} are the same or different and are linear alkyl, branched alkyl or cyclic alkyl having from 1 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic, and R_{12} can in addition be H,

R_{13}, R_{14}, R_{15} and R_{16} are the same or different and are H or a linear or branched alkyl having from 1 to 4 carbon atoms,

R_{17} and R_{18} are H or alkyl,

u is an integer from 1 to 10 and can also be 0,

t is an integer from 1 to 10 and can also be 0,

y is an integer from 1 to 20 and can also be 0.

When compound of formula (I) is in the form of a ion (eg. sulphonate), the counter ion may be present (eg. Na^+ or K^+).

According to a preferred aspect, compounds of the invention are those of formula (I) where T= aryl optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, and/or linker(s) and A, A', X, X', U, U', W, W', m, m', n, n', ----, ---- are defined as above.

According to another preferred aspect, compounds of the invention are selected from the group consisting in:

8,8'-[1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-methoxy-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[1,4-butanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[3-methyl-1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[2,6-pyridinediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[4-(3-tert-butoxycarbonylaminopropyloxy)-2,6-pyridinediylbis-(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(3-aminopropyloxy)-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyl)-1,3-benzenediylbis-(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-{5-[3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)propyloxy]-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)}-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-acetylthiomethyl-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-methylene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

bis-{2-[(S)-2-methylene-7-methoxy-5-oxo-1,3,,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yloxy]-ethyl}-carbamic acid tert-butyl ester

8,8'-[3-(2-acetylthioethyl)-1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-methylene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimethylbutanoyl)amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)-amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-mercapto-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-methyl)-pentanamido-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-butoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-

bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(2-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(3-[methyl-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

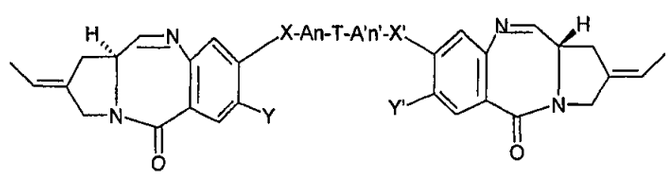
8,8'-[(4-(3-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

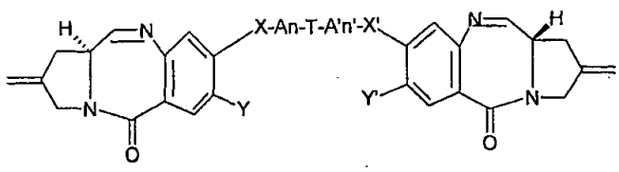
8,8'-[(1-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

as well as the corresponding mercapto derivatives,

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

Preferred compounds are those of formula:





or

where X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' are defined as above.

As used hereabove or hereafter:

Alk represents alkyl, alkene or alkyne.

"Alkyl" means an aliphatic hydrocarbon group which may be straight or branched having 1 to 20 carbon atoms in the chain or cyclic having 3 to 10 carbon atom. Preferred alkyl groups have 1 to 12 carbon atoms in the chain. "Branched" means that one or more lower alkyl groups such as methyl, ethyl or propyl are attached to a linear alkyl chain. Exemplary alkyl groups include methyl, ethyl, *n*-propyl, *i*-propyl, *n*-butyl, *t*-butyl, *n*-pentyl, 3-pentyl, octyl, nonyl, decyl, cyclopentyl and cyclohexyl.

"Alkene" means an aliphatic hydrocarbon group containing a carbon-carbon double bond and which may be straight or branched having 2 to 15 carbon atoms in the chain. Preferred alkenyl groups have 2 to 12 carbon atoms in the chain; and more preferably about 2 to 4 carbon atoms in the chain. Exemplary alkenyl groups include ethenyl, propenyl, *n*-butenyl, *i*-butenyl, 3-methylbut-2-enyl, *n*-pentenyl, heptenyl, octenyl, nonenyl, decenyl.

"Alkyne" means an aliphatic hydrocarbon group containing a carbon-carbon triple bond and which may be straight or branched having 2 to 15 carbon atoms in the chain. Preferred alkynyl groups have 2 to12 carbon atoms in the chain; and more preferably 2 to 4 carbon atoms in the chain. Exemplary alkynyl groups include ethynyl, propynyl, *n*-butynyl, 2-butynyl, 3-methylbutynyl, *n*-pentynyl, heptynyl, octynyl and decynyl.

"Halogen atom" refers to fluorine, chlorine, bromine or iodine atom; preferably fluorine and chlorine atom.

"Aryl" means an aromatic monocyclic or multicyclic hydrocarbon ring system of 6 to 14 carbon atoms, preferably of 6 to 10 carbon atoms. Exemplary aryl groups include phenyl or naphthyl.

"Het" means heterocycle or heteroaryl.

As used herein, the terms "heterocycle" or "heterocyclic" refer to a saturated, partially unsaturated or unsaturated, non aromatic stable 3 to 14, preferably 5 to 10 membered mono, bi or multicyclic rings wherein at least one member of the ring is a hetero atom. Typically, heteroatoms include, but are not limited to, oxygen, nitrogen, sulfur, selenium, and phosphorus atoms. Preferable heteroatoms are oxygen, nitrogen and sulfur.

Suitable heterocycles are also disclosed in *The Handbook of Chemistry and Physics*, 76th Edition, CRC Press, Inc., 1995-1996, p. 2-25 to 2-26, the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

Preferred non aromatic heterocyclic include, but are not limited to pyrrolidinyl, pyrazolidinyl, imidazolidinyl, oxiranyl, tetrahydrofuranyl, dioxolanyl, tetrahydro-pyranyl, dioxanyl, dioxolanyl, piperidyl, piperazinyl, morpholinyl, pyranyl, imidazolinyl, pyrrolinyl, pyrazolinyl, thiazolidinyl, tetrahydrothiopyranyl, dithianyl, thiomorpholinyl, dihydro-pyranyl, tetrahydropyranyl, dihydropyranyl, tetrahydro-pyridyl, dihydropyridyl, tetrahydropyrinidinyl, dihydrothiopyranyl, azepanyl, as well as the fused systems resulting from the condensation with a phenyl group.

As used herein, the term "heteroaryl" or aromatic heterocycles refers to a 5 to 14, preferably 5 to 10 membered aromatic hetero, mono-, bi- or multicyclic ring. Examples include pyrrolyl, pyridyl, pyrazolyl, thienyl, pyrimidinyl, pyrazinyl, tetrazolyl, indolyl, quinolinyl, purinyl, imidazolyl, thienyl, thiazolyl, benzothiazolyl, furanyl, benzofuranyl, 1,2,4-thiadiazolyl, isothiazolyl, triazoyl, tetrazolyl, isoquinolyl, benzothienyl, isobenzofuryl, pyrazolyl, carbazolyl, benzimidazolyl, isoxazolyl, pyridyl-N-oxide, as well as the fused systems resulting from the condensation with a phenyl group.

"Alkyl", "cycloalkyl", "alkenyl", "alkynyl", "aryl", "heteroaryl", "heterocycle" and the like refer also to the corresponding "alkylene", "cycloalkylene", "alkenylene", "alkynylene", "arylene", "heteroarylene", "heterocyclene" and the likes which are formed by the removal of two hydrogen atoms.

As used therein, the expression "linkable to a cell binding agent" refers to the tomaymycin derivatives comprising at least one linking group, or a precursor thereof, suitable to bond said derivatives to a cell binding agent; preferred linking groups are thiol, sulfide or disulfide bonds, or precursors thereof.

As used therein, the expression "linked to a cell binding agent" refers to the conjugate molecule comprising at least one tomaymycin derivative bound to a cell binding agent via a suitable linking group, or a precursor thereof; preferred linking groups are thiol or disulfide bonds, or precursors thereof.

As used therein, "precursor" of a given group refers to any group which may lead to that group by any deprotection, chemical modification, or coupling reaction.

As used herein, the term "patient" refers to either an animal, such as a valuable animal for breeding, company or preservation purposes, or preferably a human or a human child, which is afflicted with, or has the potential to be afflicted with one or more diseases and conditions described herein.

As used herein, a "therapeutically effective amount" refers to an amount of a compound of the present invention which is effective in preventing, reducing, eliminating, treating or controlling the symptoms of the herein-described diseases and conditions. The term "controlling" is intended to refer to all processes wherein there may be a slowing, interrupting, arresting, or stopping of the progression of the diseases and conditions described herein, but does not necessarily indicate a total elimination of all disease and condition symptoms, and is intended to include prophylactic treatment.

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable" refers to those compounds, materials, excipients, compositions or dosage forms which are, within the scope of sound medical judgment, suitable for contact with the tissues of human beings and animals without excessive toxicity, irritation, allergic response or other problem complications commensurate with a reasonable benefit/risk ratio.

As used herein, "pharmaceutically acceptable salts" refer to derivatives of the disclosed compounds wherein the parent compound is modified by making acid or base salts thereof. The pharmaceutically acceptable salts include the conventional non-toxic salts or the quaternary ammonium salts of the parent compound formed, for example, from non-toxic inorganic or organic acids. For example, such conventional non-toxic salts include those derived from inorganic acids such as hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, sulfamic, phosphoric, nitric and the like; and the salts prepared from organic acids such as acetic, propionic,

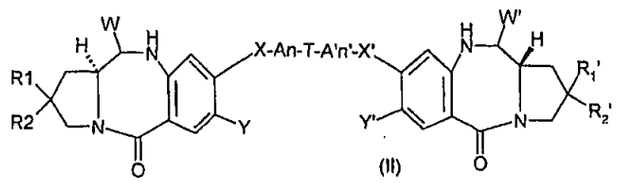
succinic, tartaric, citric, methanesulfonic, benzenesulfonic, glucoronic, glutamic, benzoic, salicylic, toluenesulfonic, oxalic, fumaric, maleic, lactic and the like. Further addition salts include ammonium salts such as tromethamine, meglumine, epolamine, etc., metal salts such as sodium, potassium, calcium, zinc or magnesium.

The pharmaceutically acceptable salts of the present invention can be synthesized from the parent compound which contains a basic or acidic moiety by conventional chemical methods. Generally, such salts can be prepared by reacting the free acid or base forms of these compounds with a stoichiometric amount of the appropriate base or acid in water or in an organic solvent, or in a mixture of the two. Generally, non-aqueous media like ether, ethyl acetate, ethanol, isopropanol, or acetonitrile are preferred. Lists of suitable salts are found in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418, the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

The compounds of the general formula (I) having geometrical and stereoisomers are also a part of the invention.

The N-10, C-11 double bond of tomaymycin derivatives of formula (I) is known to be readily convertible in a reversible manner to corresponding imine adducts in the presence of water, an alcohol, a thiol, a primary or secondary amine, urea and other nucleophiles. This process is reversible and can easily regenerate the corresponding tomaymycin derivatives in the presence of a dehydrating agent, in a non-protic organic solvant, in vacuum or at high temperatures (Z. Tozuka, 36, *J. Antibiotics*, 276 (1983).

Thus, this invention provides also for reversible derivatives of tomaymycin derivatives of general formula (II):



(II)

where A, X, Y, n, T, A', X', Y', n', R1, R2, R1', R2' are defined as in formula (I) and W , W' are the same or different and are selected from the group consisting of OH, an ether such as -OR, an ester (e.g. an acetate), such as -OCOR, -COOR, a

carbonate such as -OCOOR, a carbamate such as –OCONRR', a cyclic carbamate, such that N10 and C11 are a part of the cycle, a urea such as –NRCONRR', a thiocarbamate such as -OCSNHR, a cyclic thiocarbamate such that N10 and C11 are a part of the cycle, -SH, a sulfide such as -SR, a sulphoxide such as -SOR, a sulfone such as -SOOR, a sulphonate such as $–SO_3^-$, a sulfonamide such as -NRSOOR, an amine such as –NRR', optionally cyclic amine such that N10 and C11 are a part of the cycle, a hydroxylamine derivative such as -NROR', an amide such as –NRCOR, -NRCONRR', an azido such as $–N_3$, a cyano, a halo, a trialkyl or triarylphosphonium, an aminoacid-derived group. Preferably, W and W' are the same or different and are OH, OMe, OEt, $NHCONH_2$, SMe.

Compounds of formula (II) may thus be considered as solvates, including water when the solvent is water; these solvates can be particularly useful.

According to a still further object, the present invention is also concerned with the process of preparation of the compounds of formula (I).

The compounds and process of the present invention may be prepared in a number of ways well known to those skilled in the art. The compounds can be synthesized, for example, by application or adaptation of the methods described below, or variations thereon as appreciated by the skilled artisan. The appropriate modifications and substitutions will be readily apparent and well known or readily obtainable from the scientific literature to those skilled in the art.

In particular, such methods can be found in R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH Publishers, 1999.

It will be appreciated that the compounds of the present invention may contain one or more asymmetrically substituted carbon atoms, and may be isolated in optically active or racemic forms. Thus, all chiral, diastereomeric, racemic forms and all geometric isomeric forms of a structure are intended, unless the specific stereochemistry or isomeric form is specifically indicated. It is well known in the art how to prepare and isolate such optically active forms. For example, mixtures of stereoisomers may be separated by standard techniques including, but not limited to, resolution of racemic forms, normal, reverse-phase, and chiral chromatography, preferential salt formation, recrystallization, and the like, or by chiral synthesis

either from chiral starting materials or by deliberate synthesis of target chiral centers.

Compounds of the present invention may be prepared by a variety of synthetic routes. The reagents and starting materials are commercially available, or readily synthesized by well-known techniques by one of ordinary skill in the arts. All substituents, unless otherwise indicated, are as previously defined.

In the reactions described hereinafter, it may be necessary to protect reactive functional groups, for example hydroxy, amino, imino, thio or carboxy groups, where these are desired in the final product, to avoid their unwanted participation in the reactions. Conventional protecting groups may be used in accordance with standard practice, for examples see T.W. Greene and P. G. M. Wuts in *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3rd ed., John Wiley and Sons, 1999; J. F. W. McOmie in *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, 1973.

Some reactions may be carried out in the presence of a base. There is no particular restriction on the nature of the base to be used in this reaction, and any base conventionally used in reactions of this type may equally be used here, provided that it has no adverse effect on other parts of the molecule. Examples of suitable bases include: sodium hydroxide, potassium carbonate, triethylamine, alkali metal hydrides, such as sodium hydride and potassium hydride; alkyllithium compounds, such as methyllithium and butyllithium; and alkali metal alkoxides, such as sodium methoxide and sodium ethoxide.

Usually, reactions are carried out in a suitable solvent. A variety of solvents may be used, provided that it has no adverse effect on the reaction or on the reagents involved. Examples of suitable solvents include: hydrocarbons, which may be aromatic, aliphatic or cycloaliphatic hydrocarbons, such as hexane, cyclohexane, benzene, toluene and xylene; amides, such as dimethylformamide; alcohols such as ethanol and methanol and ethers, such as diethyl ether and tetrahydrofuran.

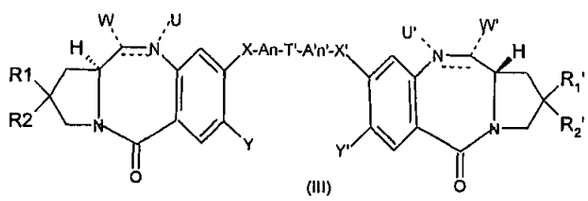
The reactions can take place over a wide range of temperatures. In general, we find it convenient to carry out the reaction at a temperature of from -20°C to 150°C (more preferably from about room temperature to 100°C). The time required for the reaction may also vary widely, depending on many factors, notably the

reaction temperature and the nature of the reagents. However, provided that the reaction is effected under the preferred conditions outlined above, a period of from 3 hours to 20 hours will usually suffice.

The compound thus prepared may be recovered from the reaction mixture by conventional means. For example, the compounds may be recovered by distilling off the solvent from the reaction mixture or, if necessary after distilling off the solvent from the reaction mixture, pouring the residue into water followed by extraction with a water-immiscible organic solvent and distilling off the solvent from the extract. Additionally, the product can, if desired, be further purified by various well known techniques, such as recrystallization, reprecipitation or the various chromatography techniques, notably column chromatography or preparative thin layer chromatography.

The process of preparation of a compound of formula (I) of the invention is a further object of the present invention.

According to a first aspect, the process of preparation of the compounds of formula (I) comprises the step of deprotecting corresponding compounds of formula (III):

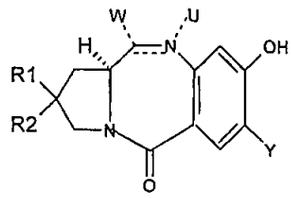


(III)

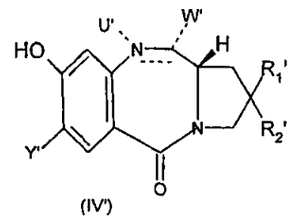
where Y, Y', X, A, A', X', n, n', W, W', U, U', ----, R1, R2, R1', R2', ⎯⎯ are defined as in formula (I) and T' corresponds to T where the functional group(s) has(ve) been protected.

Preferably, the SH function is protected and preferably the protecting group is acetyl, benzoyl, methanesulfonyl, methylthio, pyridylthio, nitropyridylthio, triisopropylsilyl (TIPS). Generally, the deprotection step is carried out using classical conditions such a base to remove the acetyl, benzoyl and methanesulfonyl protective groups, a reducing agent such as dithiothreitol or tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) to cleave a methylthio protective group or known by reacting the compounds with an ammonium fluoride to remove the TIPS.

The compounds of formula (II) may be obtained from coupling corresponding compounds of formulae (IV), (IV') and (V):



(IV)



(IV')

Lg-An-T'-A'n'-Lg

(V)

where Y, Y', A, A', n, n', T', W, W', U, U', ---, ——, R1, R2, R1', R2' are defined as in formula (III), and Lg is a leaving group such as a halogen, OMs, OTs or $OPPh_3^+$ (intermediate formed in a Mitsunobu reaction)

The compounds of formula (IV) and (IV') are generally known, as disclosed for instance in patent applications WO 00/12508, WW00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260,or commercially available, and/or are available by total synthesis (M. Mori et al, 42 *Tetrahedron*, 3793-3806, 1986) or produced by Streptomyces species, in particular, following French patent Fr. 1,516,743 pocedure or may be prepared by application or adaptation of the illustrative procedures given in the examples.

The compounds of formula (V) may be obtained from corresponding compounds of formula (VI) :

HO-An-T'-A'n'-OH (VI)

where A, A', n, n', T' are defined as in formula (III).

This reaction is generally carried out in the presence of PPh_3 and $CHal_4$ or by reaction with a chlorosulfonate in the presence of a base such a triethylamine or potassium hydroxide, preferably triethylamine.

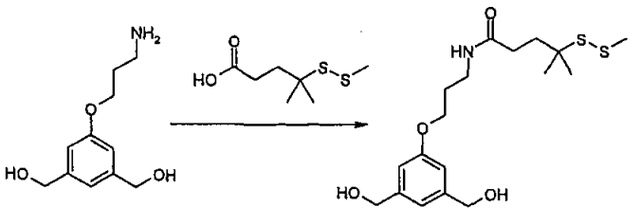
The compounds of formula (VI) may be obtained from corresponding compounds of formula (VII):

HO-An-T''-A'n'-OH (VII)

where A, A', n, n' are defined as in formula (III) and T'' is a precursor group of T. A precursor group of T refers to any group which may lead to T by any deprotection, chemical modification, or coupling. Preferably, T is obtained by

coupling T' with the complementary portion, where T' and the complementary portion comprise functions which are reactive to each other, eg. T' comprising an amine function and the complementary portion comprising an acid function.

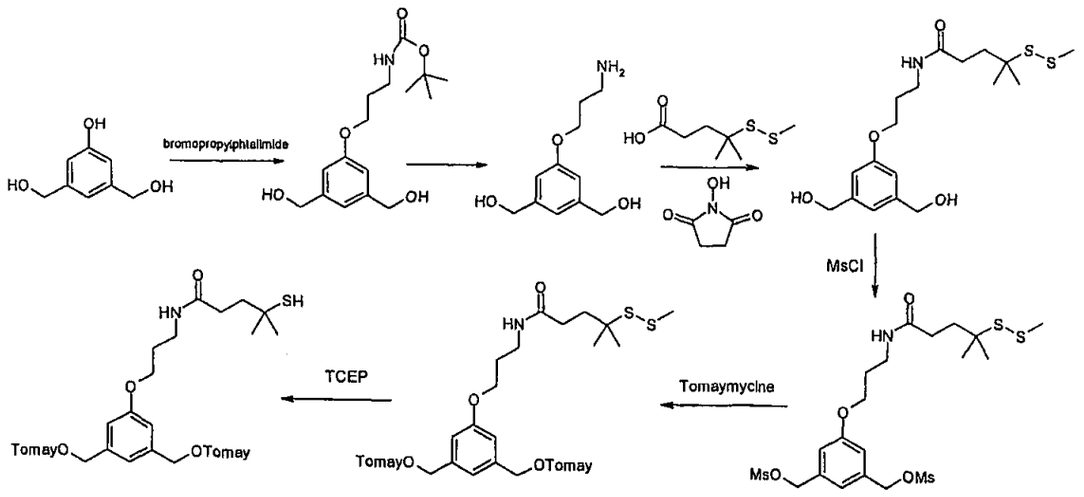
A representative example for this reaction is:



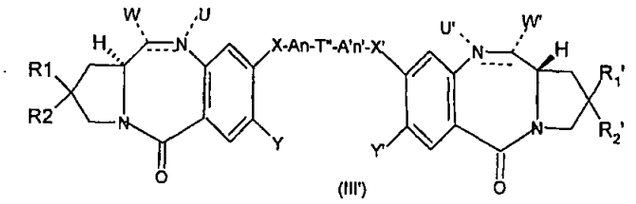
Generally, this reaction is carried out in the presence of N-hydroxysuccinimide and HOBT.

The compounds of formula (VII) may be commercially available or made by adaptation or application of known methods or according to the examples.

Exemplary non-limiting scheme for this embodiment of the process of the invention is given below:



According to a second aspect, the compound of formula (I) may be obtained from the corresponding compound of formula (III'):



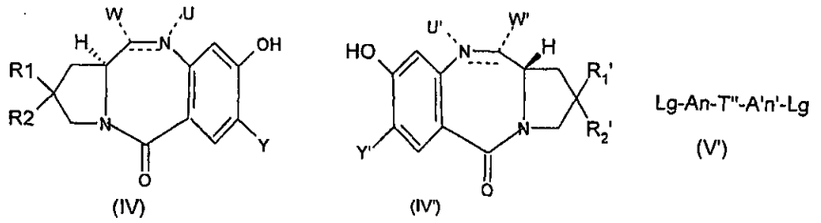
(III')

where Y, Y', X, A, A', X', n, n', W, W', U, U', ---, ---- , R1, R2, R1', R2' are defined as in formula (I) and T'' is an optionally protected precursor group of T.

A precursor group of T refers to any group which may lead to T by chemical modification, or coupling. Preferably, T is obtained by coupling T' with the corresponding complementary portion, where T' and the complementary portion comprise functions which are reactive to each other, eg. T' comprising an amine function and the complementary portion comprising an acid function.

Generally, this reaction is carried out in the presence of: N-hydroxysuccinimide and HOBT.

The compound of formula (III') may be obtained from coupling the corresponding compound of formulae (IV), (IV') and (V'):



(IV) (IV') (V')

where Y, Y', A, A', n, n', W, W', U, U', ---, ---- , R1, R2, R1', R2' are defined as in formula (III'), T'' is an optionally protected precursor group of T and Lg is a leaving group, such as halogen or OMs, OTs or PPh_3^+ (intermediate formed in a Mitsunobu reaction).

The compounds of formula (IV) and (IV') are generally known and are available by total synthesis (M. Mori et al, 42 *Tetrahedron*, 3793-3806, 1986) or produced by Streptomyces species, in particular, following French patent Fr. 1,516,743 procedure.

The compounds of formula (V') may be obtained from corresponding compounds of formula (VII):

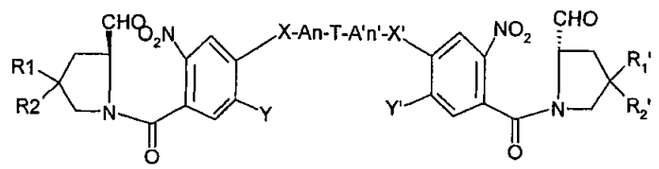
HO-An-T''-A'n'-OH (VII)

where A, A', n, n' are defined as in formula (I), T'' is an optionally protected precursor group of T'.

This reaction is generally carried out in the presence of PPh_3 and $CHal_4$.

The compounds of formula (VII) may be commercially available or made by adaptation or application of known methods or according to the examples.

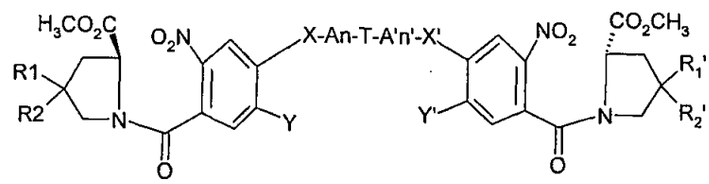
According to a third aspect, the process of preparation of the compound of formula (I) comprises the step of cyclizing the corresponding compound of formula (VIII):



(VIII)

where Y, Y', X, A, A', X', n, n', R1, R2, R1', R2', T are defined as in formula (I). Generally, this reaction is carried out in the presence of a reagent such as sodium hydrosulfite ($Na_2S_2O_4$), in an appropriate solvent such as a mixture of THF and water, followed by addition of methanol and AcCl.

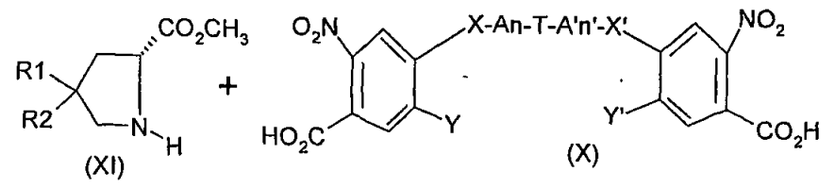
The compound of formula (VIII) may be obtained from the corresponding compound of formula (IX):



(IX)

where Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T are defined as in formula (I). Generally, this reaction is carried out in the presence of a reagent such as DIBAL-H in an appropriate solvent, such as toluene.

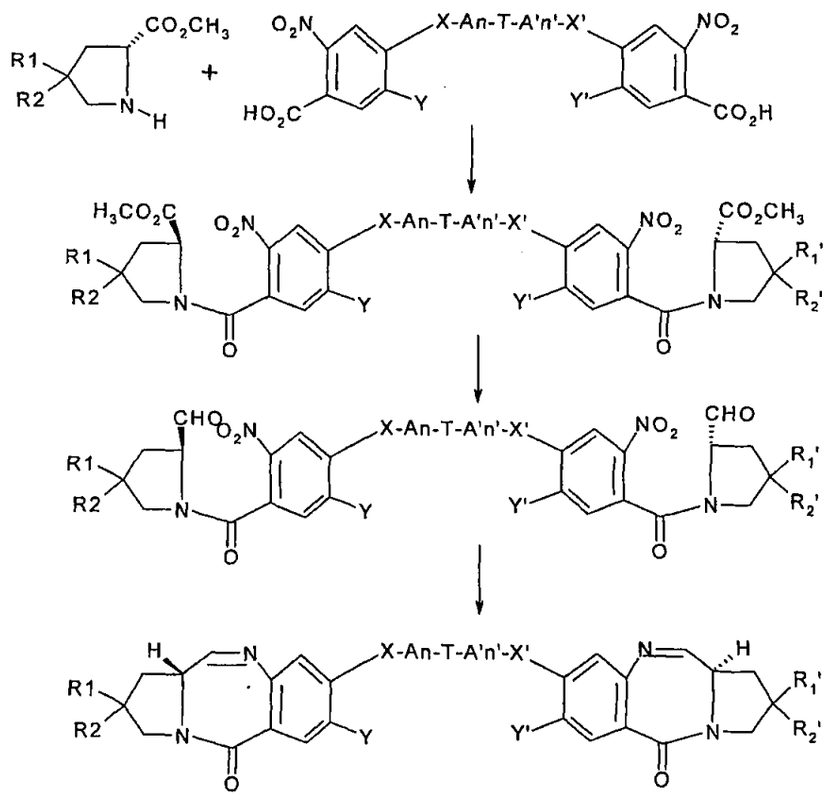
The compound of formula (IX) may be obtained from coupling the corresponding compounds of formula (X) and (XI):



where Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T are defined as in formula (I).

Generally, this reaction is carried out by adding to (X) a reagent such as oxalyl chloride in an appropriate solvent, such as DMF, followed by adding (XI) in an appropriate solvent, such as THF.

A representative scheme is given below:



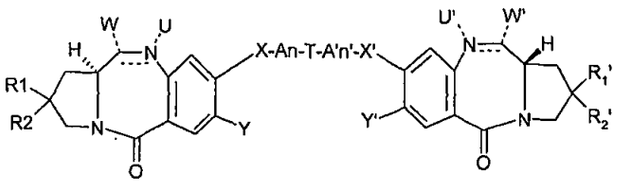
The above reactions can be carried out by the skilled person by applying or adapting the methods illustrated in the examples hereinafter.

Further, the process of the invention may also comprise the additional step of isolating the compound of formula (I) and (II). This can be done by the skilled person by any of the known conventional means, such as the recovery methods described above.

The starting products are commercially available or may be obtained by applying or adapting any known methods or those described in the examples.

The synthesis may also be carried out in one pot as a multicomponent reaction.

According to a further object, the present invention concerns a conjugate molecule comprising at least one tomaymycin derivative covalently bonded to a cell binding agent through a linking group. Said conjugate comprises one or more tomaymycin derivative according to the invention exhibiting a linker comprising a linking group, such as –S- or –S-S-. Said linking group covalently links the cell binding agent with the linker of the tomaymycin derivative According to a preferred aspect, said tomaymycin derivative is of formula (I'):



(I')

where

---- represents an optional single bond;

---- represents either a single bond or a double bond ;

provided that when ---- represents a single bond, U and U', the same or different, independently represent H, and W and W', the same or different, are independently selected from the group consisting of OH, an ether such as -OR, an ester (e.g. an acetate), such as -OCOR, a carbonate such as -OCOOR, a carbamate such as –OCONRR', a cyclic carbamate, such that N10 and C11 are a part of the cycle, a urea such as –NRCONRR', a thiocarbamate such as -OCSNHR, a cyclic thiocarbamate such that N10 and C11 are a part of the cycle, -SH, a sulfide such as -SR, a sulphoxide such as -SOR, a sulfone such as -SOOR, a sulphonate such as $-SO_3^-$, a sulfonamide such as -NRSOOR, an amine such as –NRR', optionally cyclic amine such that N10 and C11 are a part of the cycle, a hydroxylamine derivative such as -NROR', an amide such as –NRCOR, an azido such as $-N_3$, a cyano, a halo, a trialkyl or triarylphosphonium, an aminoacid-

derived group; Preferably W and W' are the same or different and are OH, OMe, OEt, $NHCONH_2$, SMe;

and when ---- represents a double bond, U and U' are absent and W and W' represent H;

- R1, R2, R1', R2' are the same or different and independently chosen from Halide or Alkyl optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Aryl, Het, $S(O)_qR$, or R1 and R2 and R1' and R2' form together a double bond containing group =B and =B' respectively.

Preferably, R1 and R2 and R1' and R2' form together a double bond containing group =B and =B' respectively.

- B and B' are the same or different and independently chosen from Alkenyl being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Aryl, Het, $S(O)_qR$ or B and B' represent an oxygen atom.

Preferably, B=B'.

More preferably, B=B'= $=CH_2$ or $=CH-CH_3$,

- X, X' are the same or different and independently chosen from one or more –O-, -NR-, -(C=O)-, $-S(O)_q-$.

Preferably, X=X'.

More preferably, X=X'=O.

- A, A' are the same or different and independently chosen from Alkyl or Alkenyl, each being optionally containing an oxygen, a nitrogen or a sulfur atom and optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$, Aryl, Het, Alkyl, Alkenyl.

Preferably, A=A'.

More preferably, A=A'=linear unsubstituted alkyl.

- Y, Y' are the same or different and independently chosen from H, OR;

Preferably, Y=Y'.

More preferably, Y=Y'=OAlkyl, more preferably OMethyl.

- T is –Alkyl-, -NR-, -O-, -$S(O)_q$-, or a 4 to 10-membered aryl, cycloalkyl, heterocyclic or heteroaryl, each being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, and substituted by one or more linker.

Preferably, T is a 4 to 10-membered aryl or heteroaryl, more preferably phenyl or pyridyl substituted by one or more linker(s).

Said linker comprises a linking group. Suitable linking groups are well known in the art and include thiol, sulfide, disulfide groups, thioether groups, acid labile groups, photolabile groups, peptidase labile groups and esterase labile groups. Preferred are disulfide groups and thioether groups.

When the linking group is a thiol-, sulfide or disulfide-containing group, the side chain carrying the thiol or disulfide group can be linear or branched, aromatic or heterocyclic. One of ordinary skill in the art can readily identify suitable side chains. Preferably, said linker is of formula:

–G-D-(Z)p-S-Z'

where

G is a single or double bond, –O-, -S- or –NR-;

D is a single bond or –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- ;

where E and F are the same or different and are independently chosen from linear or branched –$(OCH_2CH_2)_i$Alkyl$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alkyl$(OCH_2CH_2)_i$-Alkyl-, -$(OCH_2CH_2)_i$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Cycloalkyl$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Heterocyclic$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Aryl$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Heteroaryl$(OCH_2CH_2)_j$-, –Alkyl-$(OCH_2CH_2)_i$Alkyl$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alkyl-$(OCH_2CH_2)_i$-, -Alkyl-$(OCH_2CH_2)_i$Cycloalkyl$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alkyl$(OCH_2CH_2)_i$Heterocyclic$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alkyl-$(OCH_2CH_2)_i$Aryl$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alkyl$(OCH_2CH_2)_i$Heteroaryl$(OCH_2CH_2)_j$-, -Cycloalkyl-Alkyl-, -Alkyl-Cycloalkyl-, -Heterocyclic-Alkyl-, -Alkyl-Heterocyclic-, -Alkyl-Aryl-, -Aryl-Alkyl-, -Alkyl-Heteroaryl- , -Heteroaryl-Alkyl-;

where i and j, identical or different are integers and independently chosen from 0, 1 to 2000;

Z is linear or branched -Alkyl-;

p is 0 or 1;

Z' represents H, a thiol protecting group such as COR, R_{20} or SR_{20}, wherein R_{20} represents H, methyl, Alkyl, optionally substituted Cycloalkyl, aryl, heteroaryl or heterocyclic, provided that when Z' is H, said compound is in equilibrium with the corresponding compound formed by intramolecular cyclisation resulting from addition of the thiol group –SH on the imine bond –NH= of one of the PBD moieties.

- n, n', equal or different are 0 or 1, with m=m' and n=n'.

- q is 0, 1 or 2.

- R, R' are equal or different and independently chosen from H, Alkyl, Aryl, each being optionally substituted by Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, Aryl, Het;

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers,

said derivative being covalently bonded to a cell binding agent through said linker.

Preferably, the linker is linked to the cell binding agent via a function reactive towards thiol, sulfide or disulfide bond.

The present invention refers to following preferred embodiments or any combination of any of them:

- G is a single bond or –O- or –NR-;
- G is –O-;
- D is a single bond or –E-, -E-NR-, -E-NR-CO-, -E-CO-, -CO-E-;.
- D is –E-, -E-NR-CO-, -CO-E-, -E-CO-;.
- D is -E-NR-CO-;
- E is linear or branched –Alkyl-, $-(OCH_2CH_2)_i-$ or –Alkyl-heterocyclic;
- E is linear or branched –Alkyl-;
- Z is $–(CH_2)_2-C(CH_3)_2-$;
- p is 0 or 1;
- Z' is H or SR_{20}, wherein R_{20} represents Alkyl, aryl, heterocyclic or heteroaryl;
- Z' is H or SR_{20}, wherein R_{20} represents Alkyl.

Specific examples of the thiol-, sulfide- or disulfide-containing linkers include

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_y(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_y\ SZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(OCO)(R_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CONR_{19})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-phenyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-furyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-thiazolyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-thienyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-morpholino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$piperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-N-methylpiperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-phenyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-furyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolyl-QSZ',

$-(CR_{13}R_{14})_t$-thiazolyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-thienyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-morpholino-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-QSZ',

$-(CR_{13}R_{14})_t$-N-methylpiperazino-QSZ', or

$-O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-O(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-O(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-O-phenyl-QSZ', -O-furyl-QSZ', -O-oxazolyl-QSZ', -O-thiazolyl-QSZ', -O-thienyl-QSZ', -O-imidazolyl-QSZ', -O-morpholino-QSZ', -O-piperazino-QSZ', -O-N-methylpiperazino-QSZ',

$-OCO(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)_v(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_y\ SZ'$,
$-OCO-(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-OCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-OCO-phenyl-QSZ', -OCO-furyl-QSZ', -OCO-oxazolyl-QSZ', -OCO-thiazolyl-QSZ', -OCO-thienyl-QSZ', -OCO-imidazolyl-QSZ', -OCO-morpholino-QSZ', -OCO-piperazino-QSZ', -OCO-N-methylpiperazino-QSZ', or

$-CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_y\ SZ'$,
$-CO-(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-CO-phenyl-QSZ', -CO-furyl-QSZ', -CO-oxazolyl-QSZ', -CO-thiazolyl-QSZ', -CO-thienyl-QSZ', -CO-imidazolyl-QSZ', -CO-morpholino-QSZ', -CO-piperazino-QSZ', -CO-piperidino-QSZ', -CO-N-methylpiperazino-QSZ',

$-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-\ NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO\ NR_{12}\ (CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}$CO-phenyl-QSZ', $-NR_{19}$CO-furyl-QSZ', $-NR_{19}$CO-oxazolyl-QSZ', $-NR_{19}$CO-thiazolyl-QSZ', $-NR_{19}$CO-thienyl-QSZ', $-NR_{19}$CO-imidazolyl-QSZ', $-NR_{19}$CO-morpholino-QSZ', $-NR_{19}$CO-piperazino-QSZ', $-NR_{19}$CO-piperidino-QSZ', $-NR_{19}$CO-N-methylpiperazino-QSZ',

-NR_{19}-phenyl-QSZ', -NR_{19}-furyl-QSZ', -NR_{19}-oxazolyl-QSZ', -NR_{19}-thiazolyl-QSZ', -NR_{19}-thienyl-QSZ', -NR_{19}-imidazolyl-QSZ', -NR_{19}-morpholino-QSZ', -NR_{19}-piperazino-QSZ', -NR_{19}-piperidino-QSZ', -NR_{19}-N-methylpiperazino-QSZ',
-$NR_{19}CO$-NR_{12}-phenyl-QSZ', -$NR_{19}CO$-NR_{12}-oxazolyl-QSZ', -$NR_{19}CO$-NR_{12}-thiazolyl-QSZ', -$NR_{19}CO$-NR_{12}-thienyl-QSZ', -$NR_{19}CO$-NR_{12}-piperidino-QSZ',

-$S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-$S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-$SCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-SCO-morpholino-QSZ', -SCO-piperazino-QSZ', -SCO-piperidino-QSZ', and -SCO-N-methylpiperazino-QSZ', wherein:

Z' is H, a thiol protecting group such as COR, R_{20}' or SR_{20}' wherein R_{20}' represents alkyl, aryl, heterocyclic, or heteroaryl;

wherein Q is a direct link or a linear alkyl or branched alkyl having from 1-10 carbon atoms or a polyethylene glycol spacer with 2 to 20 repeating ethylene oxy units;

R_{19} and R_{12} are the same or different and are linear alkyl, branched alkyl or cyclic alkyl having from 1 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic, and R_{12} can in addition be H,

R_{13}, R_{14}, R_{15} and R_{16} are the same or different and are H or a linear or branched alkyl having from 1 to 4 carbon atoms,

R_{17}, and R_{18} are H or alkyl,

u is an integer from 1 to 10 and can also be 0,

t is an integer from 1 to 10 and can also be 0,

y is an integer from 1 to 20 and can also be 0.

According to this object, representative compounds of formula (I') are:

8,8'-{5-[3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)propyloxy]-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)}-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-acetylthiomethyl-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-methylene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[3-(2-acetylthioethyl)-1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-methylene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimethylbutanoyl)amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)-amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-mercapto-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-methyl)-pentanamido-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-butoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(2-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(3-[methyl-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(3-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

as well as the corresponding mercapto derivatives,

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

Cell binding agents may be of any kind and include peptides and non-peptides. Generally, these can be antibodies (especially monoclonal antibodies) or a fragment of an antibody that contains at least one binding site, lymphokines, hormones, growth factors, nutrient-transport molecules (such as transferrin), or any other cell binding molecule or substance. More specific examples of cell binding agents that can be used include: monoclonal antibodies; chimeric antibodies; humanized antibodies; fully human antibodies; single chain antibodies; fragments of antibodies such as Fab, Fab', $F(ab')_2$ and F_v {Parham, 131 *J. Immunol.* 2895-2902 (1983); Spring et al, 113 *J. Immunol.* 470-478 (1974); Nisonoff et al, 89 *Arch. Biochem. Biophys.* 230-244 (1960)}; interferons; peptides; lymphokines such as IL-2, IL-3, IL-4, IL-6; hormones such as insulin, TRH (thyrotropin releasing hormones), MSH (melanocyte-stimulating hormone), steroid hormones, such as androgens and estrogens; growth factors and colony-stimulating factors such as EGF, TGFα, insulin like growth factor (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF and GM-CSF {Burgess, 5 *Immunology Today* 155-158 (1984)}; vitamins, such as folate and transferrin {O'Keefe et al, 260 *J. Biol. Chem.* 932-937 (1985)}.

The expression "cell binding agent" included herein also includes modified cell binding agents, wherein said cell binding agent is modified by a modifying agent to improve the reactivity of said cell binding agent towards the linking group of the linker of the tomaymycin derivative. Said modifying agents include N-sulfosuccinimidyl-4-(5-nitro-2-pyridyldithio)butanoate (SSNPB), Succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), 4-(2-pyridyldithio)butanoic acid N-hydroxysuccinimide ester (SPDB), and so on as discussed below.

Monoclonal antibody technology permits the production of extremely selective cell binding agents in the form of specific monoclonal antibodies. Particularly well known in the art are techniques for creating monoclonal antibodies produced by immunizing mice, rats, hamsters or any other mammal

with the antigen of interest such as the intact target cell, antigens isolated from the target cell, whole virus, attenuated whole virus, and viral proteins such as viral coat proteins.

Selection of the appropriate cell binding agent is a matter of choice that depends upon the particular cell population that is to be targeted, but in general monoclonal antibodies are preferred if an appropriate one is available.

For example, the monoclonal antibody MY9 is a murine IgG_1 antibody that binds specifically to the CD33 Antigen {J.D. Griffin et al 8 *Leukemia Res.*, 521 (1984)} and can be used if the target cells express CD33 as in the disease of acute myelogenous leukemia (AML). Similarly, the monoclonal antibody anti-B4 is a murine IgG_1, that binds to the CD19 antigen on B cells {Nadler et al, 131 *J. Immunol.* 244-250 (1983)} and can be used if the target cells are B cells or diseased cells that express this antigen such as in non-Hodgkin's lymphoma or chronic lymphoblastic leukemia. As stated above, the MY9 and anti-B4 antibodies may be murine, chimeric, humanized or fully human.

Additionally, GM-CSF which binds to myeloid cells can be used as a cell binding agent to diseased cells from acute myelogenous leukemia. IL-2, which binds to activated T-cells, can be used for prevention of transplant graft rejection, for therapy and prevention of graft-versus-host disease, and for the treatment of acute T-cell leukemia. MSH, which binds to melanocytes, can be used for the treatment of melanoma.

The conjugate molecules of the invention may be formed using any techniques. The tomaymycin derivatives of the invention may be linked to an antibody or other cell binding agent via an acid labile linker, or by a photolabile linker. The derivatives can be condensed with a peptide having a suitable sequence and subsequently linked to a cell binding agent to produce a peptidase labile linker. The conjugates can be prepared to contain a primary hydroxyl group, which can be succinylated and linked to a cell binding agent to produce a conjugate that can be cleaved by intracellular esterases to liberate free derivative. Preferably, the derivatives are synthesized to contain a free or protected thiol group, and then one or more disulfide or thiol-containing

derivatives are each covalently linked to the cell binding agent via a disulfide bond or a thioether link.

Numerous methods of conjugation are taught in USP 5,416,064 and USP 5,475,092. The tomaymycin derivatives can be modified to yield a free amino group and then linked to an antibody or other cell binding agent *via* an acid labile linker or a photolabile linker. The tomaymycin derivatives with a free amino or carboxyl group can be condensed with a peptide and subsequently linked to a cell binding agent to produce a peptidase labile linker. The tomaymycin derivatives with a free hydroxyl group on the linker can be succinylated and linked to a cell binding agent to produce a conjugate that can be cleaved by intracellular esterases to liberate free drug. Most preferably, the tomaymycin derivatives are treated to create a free or protected thiol group, and then the disulfide- or thiol-containing tomaymycin dimers are linked to the cell binding agent via disulfide bonds.

Representative conjugates of the invention are antibody-tomaymycin derivative, antibody fragment-tomaymycin derivative epidermal growth factor (EGF)-tomaymycin derivative, melanocyte stimulating hormone (MSH)-tomaymycin derivative, thyroid stimulating hormone (TSH)-tomaymycin derivative, estrogen-tomaymycin derivative, estrogen analogue-tomaymycin derivative, androgen-tomaymycin derivative, androgen analogue-tomaymycin derivative, and folate-tomaymycin derivative.

Tomaymycin derivative conjugates of antibodies, antibody fragments, protein or peptide hormones, protein or peptide growth factors and other proteins are made in the same way by known methods. For example, peptides and antibodies can be modified with cross linking reagents such as *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, *N*-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate (SPP), 4-succinimidyl-oxycarbonyl-α-methyl-α-(2-pyridyl dithio)-toluene (SMPT), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) butyrate (SDPB), succinimidyl pyridyl-dithiopropionate (SPDP), 4-(2-pyridyldithio)butanoic acid N-hydrosuccinimide ester (SPDB), succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-caboxylate (SMCC), N-sulfosuccinimidyl-3-(2-(5-nitro-pyridyldithio) butyrate (SSNPB), 2-iminothiolane, or *S*-acetylsuccinic anhydride by known methods. *See*, Carlsson

et al, 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978); Blattler et al, 24 *Biochem.* 1517-1524 (1985); Lambert et al, 22 *Biochem.* 3913-3920 (1983); Klotz et al, 96 *Arch. Biochem. Biophys.* 605 (1962); and Liu et al, 18 *Biochem.* 690 (1979), Blakey and Thorpe, 1 *Antibody, Immunoconjugates & Radio-pharmaceuticals*, 1-16 (1988), Worrell et al 1 *Anti-Cancer Drug Design* 179-184 (1986). The free or protected thiol-containing cell binding agent thus derived is then reacted with a disulfide- or thiol-containing tomaymycin derivative to produce conjugates. The conjugates can be purified by HPLC or by gel filtration.

Preferably, monoclonal antibody- or cell binding agent-tomaymycin derivative conjugates are those that are joined via a disulfide bond, as discussed above, that are capable of delivering tomaymycin derivatives. Such cell binding conjugates are prepared by known methods such as by modifying monoclonal antibodies with succinimidyl pyridyl-dithiopropionate (SPDP) (Carlsson et al, 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978)). The resulting thiopyridyl group is then displaced by treatment with thiol-containing tomaymycin derivatives to produce disulfide linked conjugates. Alternatively, in the case of the aryldithio- tomaymycin derivatives, the formation of the cell binding conjugate is effected by direct displacement of the aryl-thiol of the tomaymycin derivative by sulfhydryl groups previously introduced into antibody molecules. Conjugates containing 1 to 10 tomaymycin derivative drugs linked via a disulfide bridge are readily prepared by either method.

More specifically, a solution of the dithio-nitropyridyl modified antibody at a concentration of 2.5 mg/ml in 0.05 M potassium phosphate buffer, at pH 7.5 containing 2 mM EDTA is treated with the thiol-containing tomaymycin derivative (1.3 molar eq./dithiopyridyl group). The release of thio-nitropyridine from the modified antibody is monitored spectrophotometrically at 325 nm and is complete in about 16 hours. The antibody-tomaymycin derivative conjugate is purified and freed of unreacted drug and other low molecular weight material by gel filtration through a column of Sephadex G-25 or Sephacryl S300. The number of tomaymycin derivative moieties bound per antibody molecule can be determined by measuring the ratio of the absorbance at 230 nm and 275 nm. An average of 1-

10 tomaymycin derivative molecules/antibody molecule can be linked via disulfide bonds by this method.

The effect of conjugation on binding affinity towards the antigen-expressing cells can be determined using the methods previously described by Liu et al., 93 Proc. Natl. Acad. Sci 8618-8623 (1996). Cytotoxicity of the tomaymycin derivatives and their antibody conjugates to cell lines can be measured by back-extrapolation of cell proliferation curves as described in Goldmacher et al, 135 *J. Immunol.* 3648-3651 (1985). Cytotoxicity of these compounds to adherent cell lines can be determined by clonogenic assays as described in Goldmacher et al, 102 *J. Cell Biol.* 1312-1319 (1986).

Representative conjugates of the invention are conjugates of tomaymycin derivatives with antibodies, antibody fragments, epidermal growth factor (EGF), melanocyte stimulating hormone (MSH), thyroid stimulating hormone (TSH), estrogen, estrogen analogs, androgen, and androgen analogs.

Representative examples of the preparation of various conjugates of derivatives and cell binding agents are described below.

Disulfide linkers: For example, the monoclonal antibody MY9 is a murine IgG_1 antibody that binds specifically to the CD33 Antigen {J.D. Griffin et al 8 Leukemia Res., 521 (1984)} and can be used if the target cells express CD33 as in the disease of acute myelogenous leukemia (AML). Similarly, the monoclonal antibody anti-B4 is a murine IgG_1, that binds to the CD19 antigen on B cells {Nadler et al, 131 J. Immunol. 244-250 (1983)} and can be used if the target cells are B cells or diseased cells that express this antigen such as in non-Hodgkin's lymphoma or chronic lymphoblastic leukemia.

Additionally, GM-CSF which binds to myeloid cells can be used as a cell binding agent to diseased cells from acute myelogenous leukemia. IL-2, which binds to activated T-cells, can be used for prevention of transplant graft rejection, for therapy and prevention of graft-versus-host disease, and for the treatment of acute T-cell leukemia. MSH, which binds to melanocytes, can be used for the treatment of melanoma.

The antibody or other cell binding agent is modified with N-succinimidyl-3-pyridyldithio propionate as previously described {J. Carlsson, H. Drevin & R. Axen, *Biochem. J.*, 173:723 (1978)} to introduce, on the average, 4 pyridyldithio groups per antibody molecule. The modified antibody is reacted with the thiol-containing derivative to produce a disulfide-linked conjugate.

Alternatively, the conjugates may be prepared by application and/or adaptation of the method disclosed in WO2004/103272, whose teaching is included herein by reference.

Thioether linkers: Thiol-containing derivatives of the present invention can be linked to antibodies and other cell binding agents via a thioether link as previously described (U.S. Pat No. 5,208,020). The antibody or other cell binding agent can be modified with the commercially available compound such as *N*-succinimidyl 4-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate (SMCC), *N*-succinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxy-(6-amido-caproate), which is a "long chain" analog of SMCC (LC-SMCC), These crosslinking reagents form non-cleavable linkers derived from maleimido-based moieties.

Crosslinking reagents comprising a haloacetyl-based moiety include *N*-succinimidyl-4-(iodoacetyl)-aminobenzoate (SIAB), *N*-succinimidyl iodoacetate (SIA), *N*-succinimidyl bromoacetate (SBA) and *N*-succinimidyl 3-(bromo-acetamido)propionate (SBAP). These crosslinking reagents form non-cleavable linkers derived from haloacetyl-based moieties.

Acid-Labile Linkers: Amino group-containing derivatives of the present invention can be linked to antibodies and other cell binding agents via an acid labile linker as previously described {W. A. Blattler et al, *Biochemistry* 24, 1517-1524 (1985); U.S. Pat. N° 4,542,225, 4,569,789, 4,618,492, 4,764,368}.

Similarly, an hydrazido group-containing derivative of the present invention can be linked to the carbohydrate portion of antibodies and other cell binding agents via an acid labile hydrazone linker {for examples of hydrazone

linkers see B. C. Laguzza et al, *J. Med. Chem.*, 32, 548-555 (1989); R. S. Greenfield et al, *Cancer Res.*, 50, 6600-6607 (1990)}.

Photo-Labile Linkers: Amine group containing derivatives of the present invention may be linked to antibodies and other cell binding agents via a photolabile linker as previously described {P. Senter et al, *Photochemistry and Photobiology*, 42, 231-237 (1985); U.S. Pat. No. 4,625,014}.

Peptidase-Labile Linkers: Amine group containing derivatives of the present invention may also be linked to cell binding agents via peptide spacers. It has been previously shown that short peptide spacers between drugs and macromolecular protein carriers are stable in serum but are readily hydrolyzed by intracellular peptidases {A. Trouet et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 626-629 (1982)}. The amino group containing containing derivatives may be condensed with peptides using condensing agents such as 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide-HCl (EDC-HCl) to give a peptide derivative that can be linked to cell binding agents.

Esterase-Labile Linkers: Derivatives of the present invention bearing a hydroxy alkyl group may be succinylated with succinic anhydride and then linked to a cell binding agent to produce a conjugate that can be cleaved by intracellular esterases to liberate free drug. {For examples see E. Aboud-Pirak et al, *Biochem Pharmacol.*, 38, 641-648 (1989)}.

The conjugates made by the above methods can be purified by standard chromatography techniques such as size-exclusion, adsorption chromatography including, but not limited to, ion exchange, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, chromatography on ceramic hydroxyapatite or on Porapak, or by HPLC. Purification by dialysis or diafiltration may also be used.

Preferably, conjugates between monoclonal antibodies or cell binding agents and derivatives of the present invention are those that are joined via a disulfide bond, as discussed above. Such cell binding conjugates are prepared

by known methods such as modifying monoclonal antibodies with succinimidyl pyridyl-dithiopropionate (SPDP) {Carlsson et al, 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978)}. The resulting thiopyridyl group is then displaced by treatment with thiol containing derivative to produce disulfide linked conjugates. Conjugates containing 1 to 10 derivatives linked via a disulfide bridge are readily prepared by this method. Conjugation by this method is fully described in U.S. Patent 5,585,499, which is incorporated by reference.

According to a preferred aspect, the cell binding agent is an antibody, in particular a monoclonal antibody.

According to another preferred aspect, the cell binding agent is an antigen specific antibody fragment, such as sFV, Fab, Fab', or $F(ab')_2$.

According to a further object, the present invention also concerns pharmaceutical compositions comprising a conjugate molecule of the invention or a compound of formula (I) as defined above together with a pharmaceutically acceptable carrier.

According to a further object, the present invention also concerns a method of killing or inhibiting growth of cells, preferably selected cell populations comprising contacting target cells or tissue containing target cells with an effective amount of the pharmaceutical composition according to the invention.

The selected cell population are those cancerous and/or proliferative cells.

According to a further object, the present invention also concerns a method for treatment, preferably selective treatment, of cancer comprising administering an effective amount of the pharmaceutical composition according to the invention to a patient in need thereof.

According to the present invention, "selective treatment of cancer" refers to killing cancerous and/or proliverative cells substantially without killing normal and/or non-proliferative cells.

According to a further object, the present invention also concerns the use of a conjugate molecule of the invention or a compound of formula (I) as defined above for the preparation of a medicament for treating cancer.

The method for inhibiting the growth of selected cell populations can be practiced *in vitro*, *in vivo*, or *ex vivo*.

Examples of *in vitro* uses include treatments of cell cultures in order to kill all cells except for desired variants that do not express the target antigen; or to kill variants that express undesired antigen.

The conditions of non-clinical *in vitro* use are readily determined by the skilled artisan.

Examples of *ex vivo* uses include treatments of autologous bone marrow prior to their transplant into the same patient in order to kill diseased or malignant cells: treatments of bone marrow prior to their transplantation in order to kill competent T cells and prevent graft-versus-host-disease (GVHD).

Clinical *ex vivo* treatment to remove tumor cells or lymphoid cells from bone marrow prior to autologous transplantation in cancer treatment or in treatment of autoimmune disease, or to remove T cells and other lymphoid cells from allogeneic bone marrow or tissue prior to transplant in order to prevent GVHD, can be carried out as follows. Bone marrow is harvested from the patient or other individual and then incubated in medium containing serum to which is added the cytotoxic agent of the invention, concentrations range from about 10 μM to 1 pM, for about 30 minutes to about 48 hours at about 37 °C. The exact conditions of concentration and time of incubation (=dose) are readily determined by the skilled artisan. After incubation the bone marrow cells are washed with medium containing serum and returned to the patient by i.v. infusion according to known methods. In circumstances where the patient receives other treatment such as a course of ablative chemotherapy or total-body irradiation between the time of harvest of the marrow and reinfusion of the treated cells, the treated marrow cells are stored frozen in liquid nitrogen using standard medical equipment.

For clinical *in vivo* use, the cytotoxic agent of the invention will be supplied as solutions that are tested for sterility and for endotoxin levels or as a lyophilized solid that can be redisolved in sterile water for injection. Examples of suitable protocols of conjugate administration are as follows. Conjugates are given weekly for 6 weeks as an i.v. bolus. Bolus doses are given in 50 to 400 ml

of normal saline to which human serum albumin (e.g. 0.5 to 1 mL of a concentrated solution of human serum albumin, 100 mg/mL) can be added. Dosages will be about 50 μg to 10 mg/kg of body weight per week, i.v. (range of 10 μg to 100 mg/kg per injection). Six weeks after treatment, the patient may receive a second course of treatment. Specific clinical protocols with regard to route of administration, excipients, diluents, dosages, times, etc., can be determined by the skilled artisan as the clinical situation warrants.

Examples of medical conditions that can be treated according to the *in vivo* or *ex vivo* methods of killing selected cell populations include malignancy of any type including, for example, cancer of the lung, breast, colon, prostate, kidney, pancreas, ovary, and lymphatic organs; melanomas; autoimmune diseases, such as systemic lupus, rheumatoid arthritis, and multiple sclerosis; graft rejections, such as renal transplant rejection, liver transplant rejection, lung transplant rejection, cardiac transplant rejection, and bone marrow transplant rejection; graft versus host disease; viral infections, such as CMV infection, HIV infection, AIDS, etc.; bacterial infection; and parasite infections, such as giardiasis, amoebiasis, schistosomiasis, and others as determined by one skilled in the art.

The identification of those subjects who are in need of treatment of herein-described diseases and conditions is well within the ability and knowledge of one skilled in the art. A veterinarian or a physician skilled in the art can readily identify, by the use of clinical tests, physical examination, medical/family history or biological and diagnostic tests, those subjects who are in need of such treatment.

A therapeutically effective amount can be readily determined by the attending diagnostician, as one skilled in the art, by the use of conventional techniques and by observing results obtained under analogous circumstances. In determining the therapeutically effective amount, a number of factors are considered by the attending diagnostician, including, but not limited to: the species of subject; its size, age, and general health; the specific disease involved; the degree of involvement or the severity of the disease; the response of the individual subject; the particular compound administered; the mode of administration; the bioavailability

characteristic of the preparation administered; the dose regimen selected; the use of concomitant medication; and other relevant circumstances.

The amount of a compound of formula (I) or conjugate, which is required to achieve the desired biological effect, will vary depending upon a number of factors, including the chemical characteristics (e.g. hydrophobicity) of the compounds employed, the potency of the compounds, the type of disease, the species to which the patient belongs, the diseased state of the patient, the route of administration, the bioavailability of the compound by the chosen route, all factors which dictate the required dose amounts, delivery and regimen to be administered.

"Pharmaceutically" or "pharmaceutically acceptable" refer to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to an animal, or a human, as appropriate.

As used herein, "pharmaceutically acceptable excipient" includes any carriers, diluents, adjuvants, or vehicles, such as preserving or antioxidant agents, fillers, disintegrating agents, wetting agents, emulsifying agents, suspending agents, solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions as suitable therapeutic combinations.

In the context of the invention, the term "treating" or "treatment", as used herein, means reversing, alleviating, inhibiting the progress of, or preventing the disorder or condition to which such term applies, or one or more symptoms of such disorder or condition.

"Therapeutically effective amount" means an amount of a compound/ medicament according to the present invention effective in preventing or treating the herein referred pathological condition.

According to the invention, the term "patient", or "patient in need thereof", is intended for an animal or a human being affected or likely to be affected with the herein referred pathological condition. Preferably, the patient is human.

In general terms, the compounds of this invention may be provided in an aqueous physiological buffer solution containing 0.1 to 10 % w/v compound for parenteral administration. Typical dose ranges are from 1 μg/kg to 0.1 g/kg of body weight per day; a preferred dose range is from 0.01 mg/kg to 10 mg/kg of body weight per day or an equivalent dose in a human child. The preferred dosage of drug to be administered is likely to depend on such variables as the type and extent of progression of the disease or disorder, the overall health status of the particular patient, the relative biological efficacy of the compound selected, the formulation of the compound, the route of administration (intravenous, intramuscular, or other), the pharmacokinetic properties of the compound by the chosen delivery route, and the speed (bolus or continuous infusion) and schedule of administrations (number of repetitions in a given period of time).

The compounds of the present invention are also capable of being administered in unit dose forms, wherein the term "unit dose" means a single dose which is capable of being administered to a patient, and which can be readily handled and packaged, remaining as a physically and chemically stable unit dose comprising either the active compound itself, or as a pharmaceutically acceptable composition, as described hereinafter. As such, typical total daily dose ranges are from 0.01 to 100 mg/kg of body weight. By way of general guidance, unit doses for humans range from 1 mg to 3000 mg per day. Preferably the unit dose range is from 1 to 500 mg administered one to six times a day, and even more preferably from 10 mg to 500 mg, once a day. Compounds provided herein can be formulated into pharmaceutical compositions by admixture with one or more pharmaceutically acceptable excipients. Such unit dose compositions may be prepared for use by oral administration, particularly in the form of tablets, simple capsules or soft gel capsules; or intranasally, particularly in the form of powders, nasal drops, or aerosols; or dermally, for example, topically in ointments, creams, lotions, gels or sprays, or via trans-dermal patches.

The compositions may conveniently be administered in unit dosage form and may be prepared by any of the methods well known in the pharmaceutical art, for example, as described in *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th ed.; Gennaro, A. R., Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000.

Preferred formulations include pharmaceutical compositions in which a compound of the present invention is formulated for oral or parenteral administration.

For oral administration, tablets, pills, powders, capsules, troches and the like can contain one or more of any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, or gum tragacanth; a diluent such as starch or lactose; a disintegrant such as starch and cellulose derivatives; a lubricant such as magnesium stearate; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, or methyl salicylate. Capsules can be in the form of a hard capsule or soft capsule, which are generally made from gelatin blends optionally blended with plasticizers, as well as a starch capsule. In addition, dosage unit forms can contain various other materials that modify the physical form of the dosage unit, for example, coatings of sugar, shellac, or enteric agents. Other oral dosage forms syrup or elixir may contain sweetening agents, preservatives, dyes, colorings, and flavorings. In addition, the active compounds may be incorporated into fast dissolve, modified-release or sustained-release preparations and formulations, and wherein such sustained-release formulations are preferably bi-modal. Preferred tablets contain lactose, cornstarch, magnesium silicate, croscarmellose sodium, povidone, magnesium stearate, or talc in any combination.

Liquid preparations for parenteral administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. The liquid compositions may also include binders, buffers, preservatives, chelating agents, sweetening, flavoring and coloring agents, and the like. Non-aqueous solvents include alcohols, propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils such as olive oil, and organic esters such as ethyl oleate. Aqueous carriers include mixtures of alcohols and water, buffered media, and saline. In particular, biocompatible, biodegradable lactide polymer, lactide/glycolide copolymer, or polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymers may be useful excipients to control the release of the active compounds. Intravenous vehicles can include fluid and nutrient replenishers, electrolyte replenishers, such as those based on Ringer's dextrose, and the like.

Other potentially useful parenteral delivery systems for these active compounds include ethylene-vinyl acetate copolymer particles, osmotic pumps, implantable infusion systems, and liposomes.

Alternative modes of administration include formulations for inhalation, which include such means as dry powder, aerosol, or drops. They may be aqueous solutions containing, for example, polyoxyethylene-9-lauryl ether, glycocholate and deoxycholate, or oily solutions for administration in the form of nasal drops, or as a gel to be applied intranasally. Formulations for buccal administration include, for example, lozenges or pastilles and may also include a flavored base, such as sucrose or acacia, and other excipients such as glycocholate. Formulations suitable for rectal administration are preferably presented as unit-dose suppositories, with a solid based carrier, such as cocoa butter, and may include a salicylate. Formulations for topical application to the skin preferably take the form of an ointment, cream, lotion, paste, gel, spray, aerosol, or oil. Carriers which can be used include petroleum jelly, lanolin, polyethylene glycols, alcohols, or their combinations. Formulations suitable for transdermal administration can be presented as discrete patches and can be lipophilic emulsions or buffered, aqueous solutions, dissolved and/or dispersed in a polymer or an adhesive.

FIGURES

Figure 1a represents *in vitro* potency of huB4-SPDB - compound of example 16 towards antigen positive BJAB cells and antigen negative MOLT-4 cells.

Figure 1b represents *in vitro* potency of huB4-SMCC - compound of example 16 towards antigen positive BJAB cells and antigen negative MOLT-4 cells.

Figure 1c represents *in vitro* potency of free compound of example 16 towards BJAB and MOLT-4 cells.

Figure 2a represents *in vitro* potency of huB4-SPDB - Compound of example 17 towards antigen positive BJAB cells and antigen negative MOLT-4 cells.

Figure 2b represents *in vitro* potency of huB4-SMCC- Compound of example 17 towards antigen positive BJAB cells and antigen negative MOLT-4 cells.

Figure 2c represents *in vitro* potency of free compound of example 17 towards BJAB and MOLT-4 cells.

Figure 3a represents *in vitro* potency of huMy9-6-SPDB- compound of example 16 towards antigen positive HL60/GC cells and antigen negative Ramos cells.

Figure 3b represents *in vitro* potency of free compound of example 16 towards HL60/GC and Ramos cells.

The invention is further illustrated but not restricted by the description in the following examples.

Experimental part

- Method A1: High Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LCMS)

A Micromass MassLynx software is used and the analysis is performed on a Agilent 1100 series HPLC with a THERMO Hypersil Gold C18 3µm column (50 x 3 mm) using gradient elution with a mixture of (A) acetonitrile and (B) water / 0.1% formic acid (gradient : 5% A : 95% B up to 95% A : 5% B over 5 minutes, 95% A : 5% B for 0.5 minutes, 95% A : 5% B down to 5% A : 95% B over 1 minute, 5% A : 95% B for 0.5 minutes) with a 0.8 mL/minute flow rate ; Waters-Micromass Platform I, Platform II or ZQ spectrometer with Electrospray (positive and negative ionisation) ; in line Diode Array (190-490 nm) ; auxiliary detector Sedere (France) Model SEDEX 65 Evaporative Light Scattering (ELS) detector.

- Method A2: High Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LCMS)

A Micromass MassLynx software is used and the analysis is performed on a Waters Alliance HPLC with a WATERS XBridge C18 3,5 µm column (100 x 3 mm) using gradient elution with a mixture of (A) methanol and (B) water / 0.1% formic acid (gradient : 5% A : 95% B up to 95% A : 5% B over 10 minutes, 95% A : 5% B down to 5% A : 95% B over 1 minute, 5% A : 95% B for 2 minutes) with a 1.1 mL/minute flow rate ; Waters-Micromass Platform II spectrometer with Electrospray (positive and negative ionisation) ; in line Diode Array (190-500 nm) ; auxiliary detector Sedere (France) Model SEDEX 85 Evaporative Light Scattering (ELS) detector.

- Method A3: High Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LCMS)

A Micromass MassLynx software is used and the analysis is performed on a Agilent 1100 series HPLC with a XBridge C18 2.5µm column (50 x 3 mm) using gradient elution with a mixture of (A) acetonitrile and (B) water / 0.1% formic acid (gradient : 5% A : 95% B up to 100% A over 5 minutes, 100% A for 0.5 minutes, 100% A down to 5% A : 95% B over 1 minute, 5% A : 95% B for 0.5 minutes) with a 1.1 mL/minute flow rate ; Waters-Micromass ZQ spectrometer with Electrospray ; in line Diode Array (210-254 nm)

- Method B: High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) purification

HPLC purification was performed on a Macherey Nagel Nucleodur C18 Gravity 5µM column (21x100 mm, catalogue number 762101), eluting with a mixture of (A) acetonitrile and (B) water (gradient : 5% A : 95% B for 5 minutes, 5% A : 95% B up to 100% A over 20 minutes, 100% A for 8 minutes, 100% A to 5% A : 95% B over 1 minute, 5% A : 95% B for 11 minutes) with a 15 mL/minute flow rate (Method B1) or 20 mL/minute (Method B2).

- Method C: Electron Ionisation (EI) mass spectra

EI mass spectra were recorded using a Finnigan SSQ 7000 mass spectrometer (EI mode: 70 eV, source temperature = 150°C, direct introduction)

- Method D: Chemical Ionisation (CI) mass spectra

CI mass spectra were recorded using a Finnigan SSQ 7000 mass spectrometer (ammonia)

- Method E: ^1H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra

^1H NMR spectra were recorded on either a Bruker Avance Drx-500, A Bruker Avance Drx-400 or A Bruker Avance DRX-300 spectrometer.

- Method F: High pressure Liquid Chromatography (HPLC) purification

HPLC purification was performed on a Macherey Nagel VP 250/40mm NUCLEODUR GRAVITY 100 - 10 C18 (catalog number 762250), eluting with a mixture of (A) acetonitrile and (B) water / $HCOONH_4$ 0,01M / NH_4OH pH9-10 (gradient : 10% A : 90% B for 3 minutes, 10% A : 90% B up to 95% A : 5%B over 37 minutes, 95% A : 5%B for 8 minutes, 95% A : 5%B to 10% A : 90% B over 1 minute, 10% A : 90% B for 1 minute) with a 70 mL/minute flow rate.

- Method G1: High pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LCMS)

A Micromass MassLynx software is used and the analysis is performed on a Acquity UPLC with a Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm column (2.1x100 mm) using gradient elution with a mixture of (A) acetonitrile and (B) water / 0.1% formic acid (gradient : 5% A : 95% B up to 95% A : 5% B over 4.7 minutes, 95% A : 5% B down to 5% A : 95% B over 0.5 minute, 5% A : 95% B for 0.8 minutes) with a 1.1 mL/minute flow rate ; Quattro Premier spectrometer with Electrospray ; in line Diode Array (210-400 nm).

- Method G2: High pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LCMS)

A Micromass MassLynx software is used and the analysis is performed on a Acquity UPLC with a Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm column (2.1x100 mm) using gradient elution with a mixture of (A) acetonitrile and (B) water / 0.1% formic acid (gradient : 5% A : 95% B up to 95% A : 5% B over 10 minutes, 95%

A : 5% B down to 5% A : 95% B over 1 minutes, 5% A : 95% B for 2 minutes) with a 0.6 mL/minute flow rate ; Quattro Premier spectrometer with Electrospray ; in line Diode Array (210-400 nm).

▪ Method H: High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) purification method HPLC purification was performed on a Varian HPLC using a Kromasil 16 µm C18 column (250 x 21.2 mm, PN A0490-250x212, Lot. No. DT0259, SN 9772196), eluting with a mixture of (A) water and (B) acetonitrile with a 20 mL/minute flow rate. The collection size was 80 seconds. Mass spectra of the compounds were obtained on a Bruker Esquire 3000 instrument. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance spectrometer operating at 400 MHz..

Gradients for eluting the column:

1. Purification of 8,8'-[5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

55% A : 45% B for 8 minutes, 55% A : 45% B to 50% A : 50% B over 14 minutes, 50% A : 50% B to 10% A : 90% B over 4 minutes, 10% A : 90% B for 5 minutes, 10% A : 90% B to 55% A : 45% B over 1 minute, 55% A : 45% B for 3 minutes.

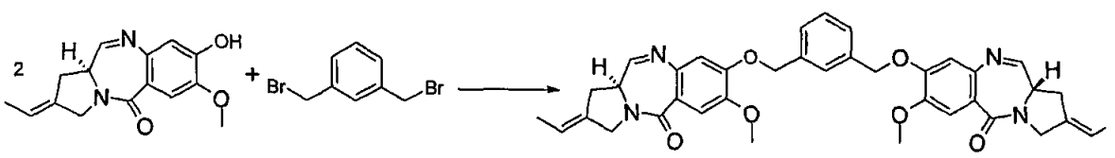
2. Purification of 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimethylbutanoyl)amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

60% A : 40% B for 4 minutes, 60% A : 40% B to 55% A : 45% B over 5 minutes, 55% A : 45% B for 4 minutes, 55% A : 45% B to 50% A : 50% B over 13 minutes, 50% A : 50% B to 10% A : 90% B over 10 seconds, 10% A : 90% B for 5 minutes, 10% A : 90% B to 60% A : 40% B over 10 seconds, 60% A : 40% B for 3 minutes.

3. Purification of 8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
60% A : 40% B for 8 minutes, 60% A : 40% B to 45% A : 55% B over 16 minutes, 45% A : 55% B to 10% A : 90% B over 2 minutes, 10% A : 90% B for 5 minutes, 10% A : 90% B to 60% A : 40% B over 1 minute, 60% A : 40% B for 3 minutes.

4. Purification of 8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-mercapto-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
65% A : 35% B to 60% A : 40% B over 8 minutes, 60% A : 40% B to 50% A : 50% B over 19 minutes, 50% A : 50% B to 10% A : 90% B over 10 seconds, 10% A : 90% B for 5 minutes, 10% A : 90% B to 65% A : 35% B over 10 seconds, 65% A : 35% B for 3 minutes.

- Example 1 : 8,8'-[1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



Potassium carbonate (22.8 mg), α,α'-dibromo-*m*-xylene (7.3 mg) and potassium iodide (9.1 mg) were added to a stirred solution of pre-tomaymycin (15 mg) in dimethylformamide (0.5 mL). The reaction was stirred for 20 h at 30°C.
Solids were filtered off, washed twice with dimethylformamide (0.2 mL) then discarded. Water (0.4 mL) was added to the combined dimethylformamide solution and the resulting solution was injected for HPLC purification according to method B1. The appropriate fractions were combined and concentrated by centrifugal evaporation over a Jouan Model RC10.10. apparatus to afford 8,8'-[1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-

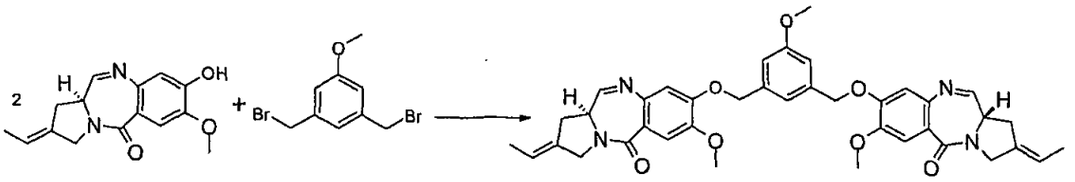
1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] as a white powder (3.33 mg):

LC/MS (Method A1, Platform II) : ES : m/z=647 MH^+

Retention time = 3.53 minutes

^1H N.M.R. (500 MHz, $CDCl_3$-d1, δ in ppm) : 1,75 (d, J = 7,0 Hz, 6H) ; 2,96 (m, 4H) ; 3,89 (m, 2H) ; 3,96 (s, 6H) ; 4,27 (s broad, 4H) ; 5,17 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,23 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,60 (m, 2H) ; 6,85 (s, 2H) ; from 7,36 to 7,43 (m, 3H); 7, 51 (s broad, 1H) ; 7,53 (s, 2H) ; 7,63 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

- Example 2 : 8,8'-[5-methoxy-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



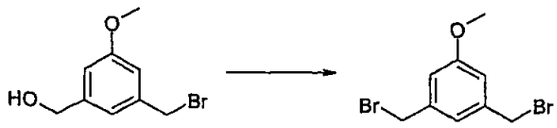
8,8'-[5-methoxy-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (Example 1), starting with 1,3-bis-bromomethyl-5-methoxy-benzene :

LC/MS (Method A1, Platform II) : ES : m/z=677 MH^+

Retention time = 4.17 minutes

^1H N.M.R. (300 MHz, $CDCl_3$-d1, δ in ppm) : 1,75 (d, J = 7,0 Hz, 6H) ; 2,96 (m, 4H) ; 3,81 (s, 3H) ; 3,89 (m, 2H) ; 3,96 (s, 6H) ; 4,26 (s broad, 4H) ; 5,14 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,21 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,60 (m, 2H) ; 6,82 (s, 2H) ; 6,95 (s broad, 2H) ; 7,07 (s broad, 1H) ; 7,53 (s, 2H) ; 7,63 (d, J = 4,5 Hz, 2H) .

1,3-bis-bromomethyl-5-methoxy-benzene may be prepared as follows :



Carbon tetrabromide (663 mg) was added to a stirred solution of 1-bromomethyl-3-hydroxymethyl-5-methoxy-benzene (420 mg) in anhydrous dichloromethane (10 mL) under argon. After cooling the resulting solution at 0°C, a solution of triphenylphosphine (500 mg) in anhydrous dichloromethane (10 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h and then concentrated in vacuo to a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Merck SuperVarioFlash 30g column, Si60 15-40μm, eluted with dichloromethane / heptane, 40:60) to give 1,3-bis-bromomethyl-5-methoxy-benzene (170 mg) :

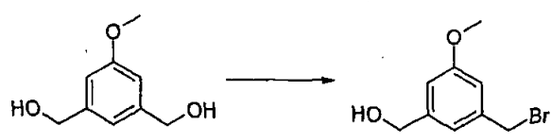
EI (Method C) : m/z=292 $M^{+\cdot}$

m/z=213 $[M - Br]^{+\cdot}$

m/z=134 $[213 - Br]^{+\cdot}$

1H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : 3,77 (s, 3H) ; 4,65 (s, 4H) ; 6,98 (s broad, 2H) ; 7,10 (s broad, 1H)

1-bromomethyl-3-hydroxymethyl-5-methoxy-benzene may be prepared as follows:



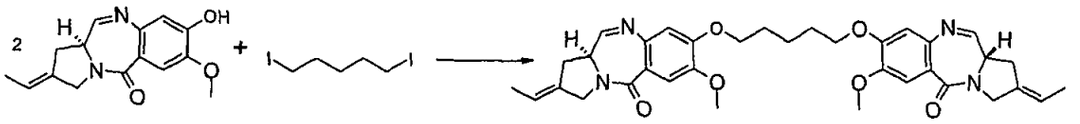
Carbon tetrabromide (3.47 g) was added to a stirred solution of 1,3-dihydroxymethyl-5-methoxy-benzene (800 mg) in anhydrous dichloromethane (16 mL) under argon. After cooling the resulting solution at 0°C, a solution of triphenylphosphine (2.68 g) in anhydrous dichloromethane (16 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h and then concentrated in vacuo to a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Merck SuperVarioPrep 90g column, Si60 15-40μm, eluted with methanol / dichloromethane, 4:96) to give 1-bromomethyl-3-hydroxymethyl-5-methoxy-benzene (420 mg) :

EI (Method C) : m/z=230 $M^{+\cdot}$

m/z=151 $[M - Br]^{+\cdot}$

1H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : 3,75 (s, 3H) ; 4,46 (d broad, J = 5,5 Hz, 2H) ; 4,65 (s, 2H) ; 5,22 (t broad, J = 5,5 Hz, 1H) ; 6,83 (s broad, 1H) ; 6,88 (s broad, 1H) ; 6,97 (s broad, 1H)

• Example 3 : 8,8'-[1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



Potassium carbonate (22.8 mg) and 1,5-diiodopentane (8.2 µL) were added to a stirred solution of pre-tomaymycin (15 mg) in dimethylformamide (0.5 mL). The reaction was stirred for 20 h at room temperature and an additional portion of potassium carbonate (8 mg) was added. The reaction was stirred for another 20 h at room temperature.

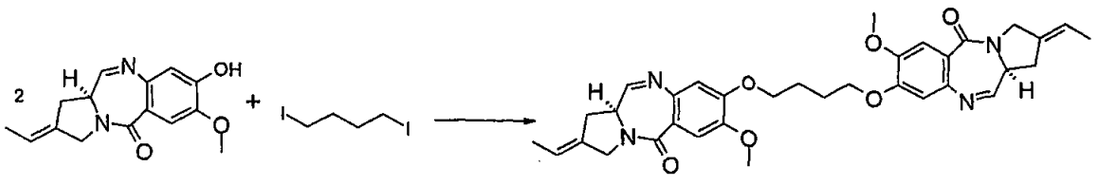
Solids were filtered off and the dimethylformamide solution was injected for HPLC purification according to method B2. The appropriate fractions were combined and concentrated by centrifugal evaporation over a Jouan Model RC10.10. apparatus to afford 8,8'-[1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] as a white powder (4 mg) :

LC/MS (Method A2) : ES : m/z=613 MH^+

Retention time = 9.04 minutes

1H N.M.R. (500 MHz, $CDCl_3$-d1, δ in ppm) : 1,66 (m partially masked, 2H) ; 1,75 (d broad, J = 7,0 Hz, 6H) ; 1,96 (m, 4H) ; 2,97 (d broad, J = 7,0 Hz, 4H) ; 3,89 (m, 2H) ; 3,94 (s, 6H) ; 4,06 (m, 2H) ; 4,13 (m, 2H) ; 4,26 (s broad, 4H) ; 5,60 (m, 2H) ; 6,80 (s, 2H) ; 7,50 (s, 2H) ; 7,66 (d, J = 4,5 Hz, 2H)

• Example 4 : 8,8'-[1,4-butanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



8,8'-[1,4-butanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (Example 3), starting with 1,4-diiodobutane :

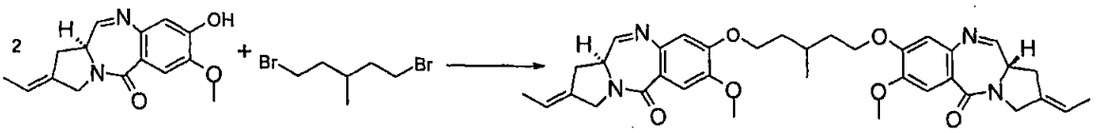
LC/MS (Method A1, Platform II) : ES : m/z=599 MH^+

m/z=318,5 $(M + H + K)^{2+} / 2$

Retention time = 3.23 minutes

^1H N.M.R. (500 MHz, $CDCl_3$-d1, δ in ppm) : 1,75 (d broad, J = 7,0 Hz, 6H) ; 2,10 (m, 4H) ; 2,98 (d broad, J = 7,0 Hz, 4H) ; 3,90 (m, 2H) ; 3,93 (s, 6H) ; 4,11 (m, 2H) ; 4,20 (m, 2H) ; 4,27 (s broad, 4H) ; 5,60 (m, 2H) ; 6,82 (s, 2H) ; 7,50 (s, 2H) ; 7,66 (d, J = 4,5 Hz, 2H)

▪ Example 5 : 8,8'-[3-methyl-1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

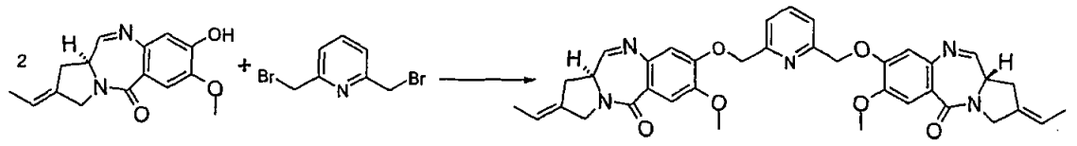


8,8'-[3-methyl-1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (Example 1), starting with 1,5-dibromo-3-methylpentane :

LC/MS (Method A1, Platform II) : ES : m/z=627 MH^+

Retention time = 3.92 minutes

- Example 6 : 8,8'-[2,6-pyridinediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



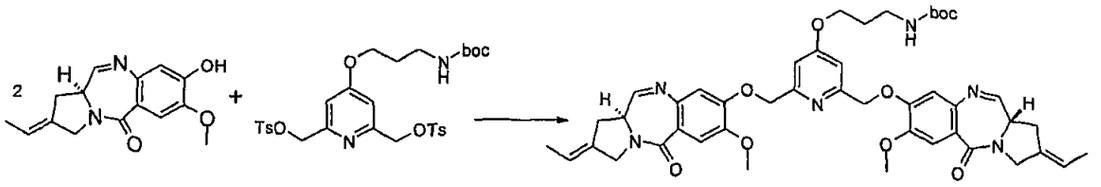
8,8'-[2,6-pyridinediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[1,3-benzene-diylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (Example 1), starting with 2,6-bis-bromomethyl-pyridine :

LC/MS (Method A1, ZQ) : ES : m/z=648 MH^+

Retention time = 3.21 minutes

^1H N.M.R. (400 MHz, $CDCl_3$-d1, δ in ppm) : 1,75 (d broad, J = 6,5 Hz, 6H) ; from 2,94 to 2,99 (m, 4H) ; 3,90 (m, 2H) ; 3,99 (s, 6H) ; 4,27 (s broad, 4H) ; 5,32 (s, 4H) ; 5,60 (m, 2H) ; 6,86 (s, 2H) ; 7,48 (d, J = 8,0 Hz, 2H) ; 7,56 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H) ; 7,74 (t, J = 8,0 Hz, 1H) .

- Example 7 : 8,8'-[4-(3-tert-butoxycarbonylaminopropyloxy)-2,6-pyridine-iylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared as follows :



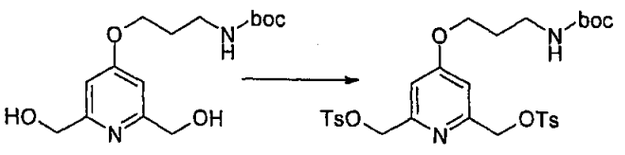
To a stirred solution of pre-tomaymycin (30 mg) in dimethylformamide (0.5 mL), were added potassium carbonate (45.7 mg), a solution of 4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-2,6-bis-(tosyloxymethyl)-pyridine (41 mg) in dimethylformamide (0.5 mL) and potassium iodide (18.3 mg). The reaction was stirred for 20 h at 30°C. Solids were filtered off and washed with dimethylformamide (0.2 mL). Water (0.5 mL) was added to the combined

dimethylformamide solution and formic acid was added until complete dissolution of the precipitate. The resulting solution was injected for HPLC purification according to method B1. The appropriate fractions were combined and concentrated by centrifugal evaporation over a Jouan Model RC10.10. apparatus to afford 8,8'-[4-(3-tert-butoxycarbonylaminopropyloxy)-2,6-pyridine-diylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]
(8.3 mg).

LC/MS (Method A1, Platform I) : ES : m/z=857 $MH^+ + 2\ H_2O$
m/z=839 $MH^+ + H_2O$
m/z=821 MH^+
m/z=721 $[M-C_5O_2H_8] + H^+$
Retention time = 3.67 minutes

^{1}H N.M.R. (500 MHz, CD3CO2D-d4, δ in ppm) : 1,41 (s, 9H) ; 1,71 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 2,08 (m, 2H) ; 2,95 (m, 4H) ; 3,34 (m, 2H) ; 3,90 (s, 6H) ; 4,06 (m, 2H) ; 4,18 (m, 2H) ; from 4,24 to 4,36 (m, 4H) ; 4,43 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 5,50 (s broad, 4H) ; 5,61 (m, 2H) ; from 6,80 to 7,70 (m very broad, 2H) ; 6,95 (s broad, 2H) ; from 7,48 to 7,58 (m, 4H).

4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-2,6-bis-(tosyloxymethyl)-pyridine may be prepared as follows :



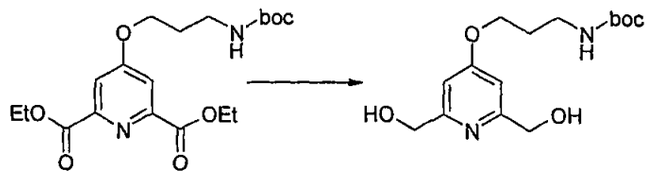
To a precooled (0°C) solution of 4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine (76 mg) in dichloromethane (0.7 mL), was added a solution of potassium hydroxide (30 mg) in water (0.3 mL). Tosyl chloride (93.7 mg) was added, and the resulting heterogenous mixture was shaken vigorously for 1h and then washed into separatory funnel using dichloromethane and water. The layers were separated, and the aqueous layer was extracted three times with dichloromethane. The combined organic solutions were dried over magnesium sulfate, and concentrated in vacuo to a residue. The residue was

purified by silica gel chromatography (Interchrom Puriflash 10g column, SiOH 15-35μm), using gradient elution with a mixture of heptane (A) and ethyl acetate (B) (gradient : 90% A : 10% B up to 50% A : 50% B) to give 4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-2,6-bis-(tosyloxymethyl) pyridine (56 mg) :

LC/MS (Method A1, Platform f) : ES : m/z=621 MH^+

Retention time = 4.90 minutes

4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine may be prepared as follows :



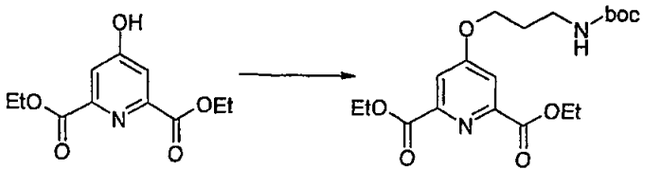
To a solution of 4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester (150 mg) in absolute ethanol (5 mL) was added sodium borohydride (43 mg) and calcium chloride (128 mg). After stirring for 4 h, hydrogen evolution ceased, and reaction was quenched with water. Solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was then washed into separatory funnel using dichloromethane and water. The layers were separated, and the aqueous layer was extracted three times with dichloromethane. The combined organic solutions were dried over magnesium sulphate, and concentrated in vacuo to give 4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl) pyridine (80 mg) :

LC/MS (Method A1, ZQ) : ES m/z=313 MH^+

Retention time = 1.90 minutes

^1H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : 1,37 (s, 9H) ; 1,84 (m, 2H) ; 3,08 (q, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,05 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,45 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,32 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 6,84 (s, 2H) ; 6,90 (t broad, J = 6,5 Hz, 1H) .

4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester may be prepared as follows :

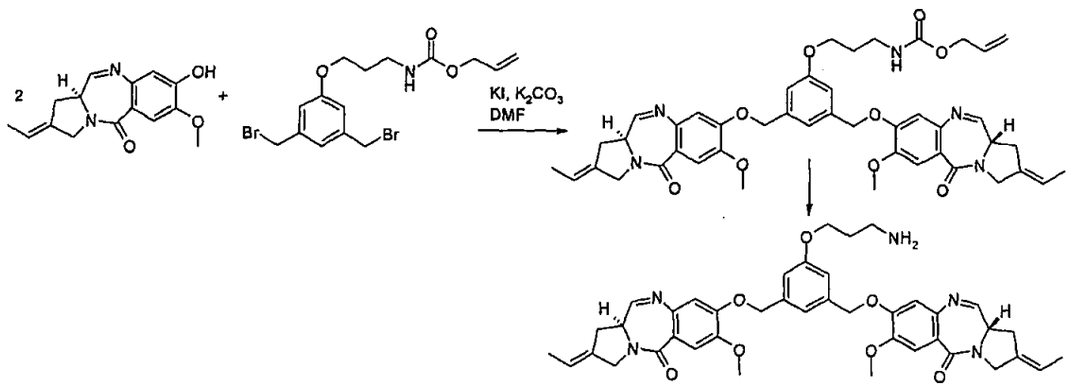


The diethyl ester of chelidamic acid (Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U.; Vendrame, T. *J. Org. Chem.* 1989, *54*, 5988) (150mg) was dissolved in dry dimethylformamide (2 mL). 3-(tert-Butoxy-amino)-propyl bromide (164 mg) and potassium carbonate (130 mg) were added. The resulting mixture was stirred for 15h at 70°C. The reaction was quenched with a saturated ammonium chloride aqueous solution and then washed into separatory funnel using ethyl acetate. The layers were separated, and the aqueous layer was extracted 3 times with ethyl acetate. The combined organic solutions were dried over magnesium sulfate, and concentrated in vacuo to a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Merck SuperVarioFlash 30g column, Si60 15-40µm), using gradient elution with a mixture of heptane (A) and ethyl acetate (B) (gradient : 60% A : 40% B up to 50% A : 50% B) to give 4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester (150 mg) :

CI (Method D) : m/z=397 MH^+

^1H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : 1,34 (t, J = 7,0 Hz, 6H) ; 1,36 (s, 9H) ; 1,86 (m, 2H) ; 3,10 (q, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,21 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,37 (q, J = 7,0 Hz, 4H) ; 6,89 (m broad, 1H) ; 7,71 (s, 2H)

• Example 8 : 8,8'-[5-(3-aminopropyloxy)-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared as follows :

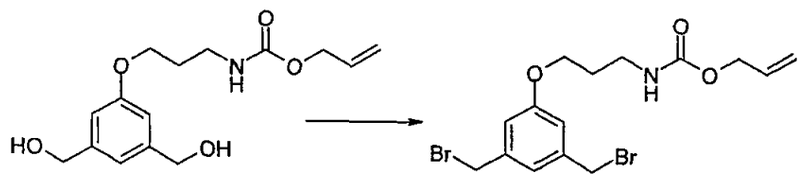


To a stirred solution of pre-tomaymycin (21 mg) in dimethylformamide (0.7 mL), were added potassium carbonate (32 mg), 1-(3-allyloxycarbonylamino-propyloxy)-3,5-bis-(bromomethyl)-benzene (16.2 mg) and potassium iodide (12.8 mg). The reaction was stirred for 20 h at 30°C. Solids were filtered off, washed twice with dimethylformamide (0.2 mL) then discarded. Water (0.5 mL) was added to the combined dimethylformamide solution and the resulting precipitate was filtered off, washed with water and dried by centrifugal evaporation over a Jouan Model RC10.10 apparatus.

To the crude compound (27 mg) dissolved in dimethylformamide (0.8 mL), tetrakis(triphenylphosphine) palladium (2 mg), triphenylphosphine (0.9 mg) and pyrrolidine (5.6 μL) were added. After stirring for 15 h at 30°C, tetrakis(triphenylphosphine) palladium (2 mg), triphenylphosphine (1 mg) and pyrrolidine (2.8 μL) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature for another 15 h. Water (0.4 mL) was added to the dimethylformamide solution and formic acid was added until complete dissolution of the precipitate. The resulting solution was injected for HPLC purification according to method B1. The appropriate fractions were combined and concentrated by centrifugal evaporation over a Jouan Model RC10.10. apparatus to afford 8,8'-[5-(3-aminopropyloxy)-1,3-benzenediylbis-(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (0.2 mg).

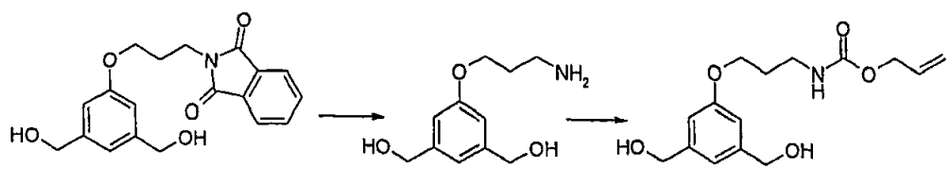
LC/MS (Method A1, Platform II) : ES : m/z=800 MH^+
Retention time = 2.84 minutes

1-(3-allyloxycarbonylamino-propyloxy)-3,5-bis-(bromomethyl)-benzene may be prepared as follows :



To a suspension of 1-(3-allyloxycarbonylamino-propyloxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene (70 mg) in dichloromethane (3 mL) were added carbon tetrabromide (248 mg) and a solution of triphenylphosphine (199 mg) in dichloromethane (2 mL). After refluxing for 3 h, the reaction mixture was purified by silica gel chromatography (Merck SuperVarioFlash 25g column, Si60 15-40μm), eluted with dichloromethane to give 1-(3-allyloxycarbonylamino-propyloxy)-3,5-bis-(bromomethyl)-benzene (52 mg) :
LC/MS (Method A1, Platform II) : ES m/z=420 MH^+
Retention time = 4.50 minutes
^{1}H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : 1,85 (m, 2H) ; 3,15 (q, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,99 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,46 (d broad, J = 5,5 Hz, 2H) ; 4,65 (s, 4H) ; 5,16 (d broad, J = 11,0 Hz, 1H) ; 5,26 (d broad, J = 17,5 Hz, 1H) ; 5,90 (m, 1H) ; 6,96 (d, J = 1,5 Hz, 2H) ; 7,09 (t, J = 1,5 Hz, 1H) ; 7,29 (t broad, J = 6,5 Hz, 1H).

1-(3-allyloxycarbonylamino-propyloxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared as follows :



5-(3-Phtalimido-propyloxy)-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene (1.45 g) was dissolved in a mixture of dichloromethane and ethanol (25 mL, 25 : 75).

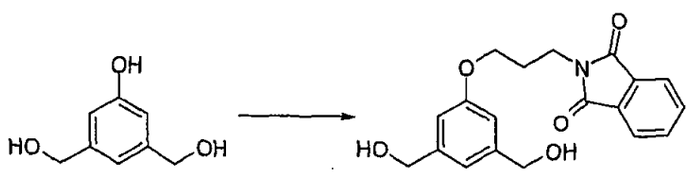
Hydrazine hydrate (0.62 mL) was added and the reaction mixture was refluxed for 1h. The solvent was removed in vacuo and the residue dissolved in dichloromethane. The insoluble residue was filtered off and purified by silica gel chromatography (Merck SuperVarioPrep 70g column, Si60 15-40μm), eluted with methanol / dichloromethane, 20:80 then ammonium hydroxide / methanol / dichloromethane, 0.5:25:75 to give 1-(3-amino-propyloxy)-3,5-bis-(hydroxy-methyl)-benzene (1g) suitable for further transformation.

A sample of 1-(3-amino-propyloxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene (100 mg) was dissolved in methanol (5 mL). To the cooled solution (0°C) was added a solution of sodium carbonate (120 mg) in water (5 mL) and allyl chloroformate (42 μL). After stirring for 30 minutes at 0°C, the reaction mixture was steered at room temperature for another 15 h. Solvent was removed in vacuo The residue was then washed into separatory funnel using ethyl acetate and water. The layers were separated, and the aqueous layer was extracted twice with ethyl acetate. The combined organic solutions were dried over magnesium sulphate, and concentrated in vacuo to give 5-(3-allyloxycarbonylamino-propyloxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl) benzene (75 mg) :

EI (Method C) :	m/z=295	$M^{+\cdot}$
	m/z=142	$(M - C_8H_9O_3)^+$
	m/z=41	$C_3H_5^+$

^{1}H N.M.R. (300 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : 1,85 (m, 2H) ; 3,14 (q, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,96 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; from 4,41 to 4,48 (m, 6H) ; 5,11 (t partially masked, J = 5,5 Hz, 2H) ; 5,16 (qd, J = 1,5 et 10,5 Hz, 1H) ; 5,26 (qd, J = 1,5 et 17,0 Hz, 1H) ; 5,90 (m, 1H) ; 6,72 (s broad, 2H) ; 6,83 (s broad, 1H) ; 7,26 (t broad, J = 6,5 Hz, 1H)

5-(3-phtalimido-propyloxy)-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared as follows :

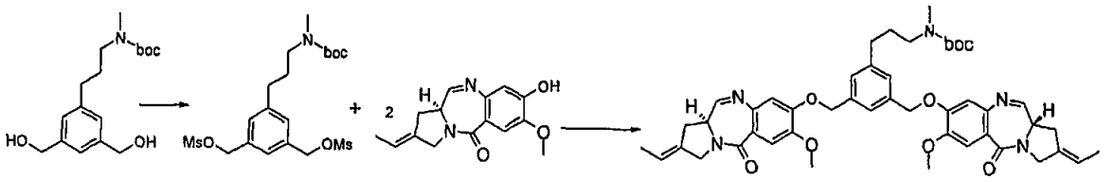


3,5-Bis-hydroxymethylphenol (Felder, D.; Gutiérrez Nava, M.; del Pilar Carreon, M.; Eckert, J.F.; Luccisano, M.; Schall, C.; Masson, P.; Gallani, J.L.; Heinrich, B.; Guillon, D.; Nierengarten, J.F. *Helv. Chimica Acta* 2002, *85*, 288) (2.35 g) , N-(3-bromo-propyl)-phtalimide (4.49 g) and potassium carbonate (10.53 g) were mixed in acetonitrile (25 mL) and refluxed for 12h. The reaction mixture was cooled to room temperature and the solvent removed under reduced pressure. The residue was redissolved in dichloromethane and the insoluble residue filtered off. The filtrate was washed with water, dried over magnesium sulfate, and concentrated in vacuo to a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Merck SuperVarioPrep 90g column, Si60 15-40µm), eluted with methanol / dichloromethane, 4:96 to give 5-(3-phtalimido-propyloxy)-1,3-bis-(hydroxymethyl) benzene (1,45 g) :

LC/MS (Method A1, Platform II) : ES m/z=342 MH^+
m/z=324 $(MH^+ - H_2O)$
Retention time = 2.90 minutes

^{1}H N.M.R. (300 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : 2,05 (m, 2H) ; 3,76 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,99 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,40 (d, J = 5,5 Hz, 4H) ; 5,09 (t, J = 5,5 Hz, 2H) ; 6,59 (s broad, 2H) ; 6,82 (s broad, 1H) ; from 7,80 to 7,90 (m, 4H)

- Example 9 : 8,8'-[5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyl)-1,3-benzene-iylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared as follows :



To a cooled (0°C) solution of 5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyl)-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene (50 mg) and triethylamine (113 µL) in dichloromethane (2 mL), was added methanesulfonyl chloride (26 µL). After 30 minutes, the reaction mixture was washed twice with water and the resulting dichloromethane solution was dried over magnesium sulfate, and concentrated in vacuo to a viscous oil (50.3 mg).

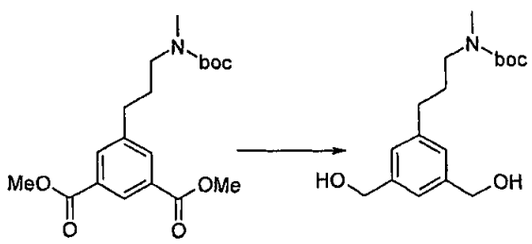
A solution of pre-tomaymycin (15 mg) in dimethylformamide (0.5 mL) was added to a mixture of the crude compound (13 mg), potassium carbonate (23 mg) and potassium iodide (9 mg). The reaction mixture was stirred for 20 h at 30°C. Another sample of the crude compound was added (6 mg), and the reaction mixture was stirred for another 20 h at 30°C. Solids were filtered off, washed with dimethylformamide (0.2 mL) then discarded. Water (0.4 mL), one drop of formic acid and another water (1.5 mL) were added to the combined dimethylformamide solution.

A sample of the resulting suspension (2 mL) was filtered and the resulting solid was dried under vacuo to give 8,8'-[5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonyl-aminopropyl)-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (3.1mg) :

LC/MS (Method A1, Platform II) : ES : m/z=818 MH^+

Retention time = 4.11 minutes

5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyl)-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared as follows :



To a cooled solution (-5°C) of 5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyl)-benzene-1,3-dicarboxylic acid diethyl ester (100 mg) in tetrahydrofuran (2 mL) was slowly added a 1M solution of lithium aluminium hydride in diethyl ether (0.55 mL). 10 minutes after the end of the addition, sodium sulfate decahydrate was added until gas evolution ceased. The solid was filtered off, washed twice with ethyl acetate and the combined organic solutions were concentrated in vacuo to give 5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyl)-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene (66.8 mg) as a viscous oil :

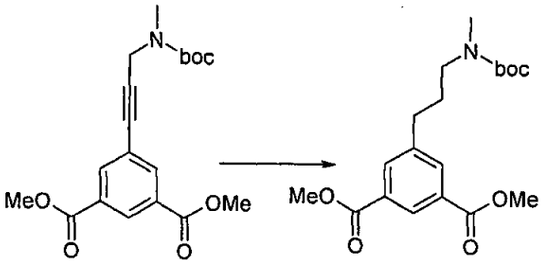
CI (Method D) : m/z=327 MNH_4^+

m/z=310 MH^+

m/z=271 $(MNH_4^+ - C_4H_8)$

^1H N.M.R. (300 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : 1,37 (s broad, 9H) ; 1,75 (m, 2H) ; from 2,45 to 2,54 (m masked, 2H) ; 2,77 (s, 3H) ; 3,18 (t, J = 7,0 Hz, 2H) ; 4,45 (d, J = 5,5 Hz, 4H) ; 5,08 (t, J = 5,5 Hz, 2H) ; 7,00 (s broad, 2H) ; 7,08 (s broad, 1H)

5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyl)-benzene-1,3-dicarboxylic acid diethyl ester may be prepared as follows :



To a solution of 5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyn-1-yl)-benzene-1,3-dicarboxylic acid diethyl ester (890 mg) in methanol (10 mL) was added palladium 10% on carbon (89 mg) and the solution was stirred at room temperature under an hydrogen atmosphere (1bar) for 18h. The solid was filtered off and solvent was removed in vacuo to afford 5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyl)-benzene-1,3-dicarboxylic acid diethyl ester (767mg) as a yellow oil :

EI (Method C) : m/z=365 $M^{+\cdot}$

m/z=309 $(M - C_4H_8)^{+\cdot}$

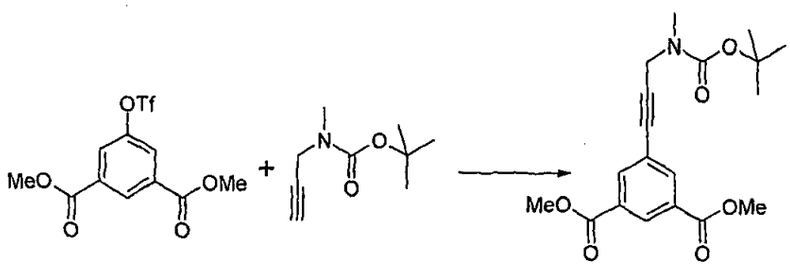
m/z=265 $(m/z=309 - CO_2)^{+\cdot}$

m/z=57 $C_4H_9^+$

m/z=44 $C_2H_6N^+$

^1H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : 1,32 (s broad, 9H) ; 1,79 (m, 2H) ; 2,70 (t, J = 7,0 Hz, 2H) ; 2,76 (s, 3H) ; 3,16 (m, 2H) ; 3,87 (s, 6H) ; 8,06 (d, J = 2,0 Hz, 2H) ; 8,32 (t, J = 2,0 Hz, 1H)

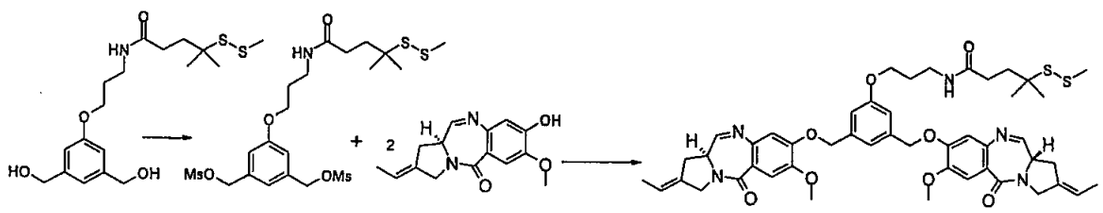
5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyn-1-yl)-benzene-1,3-dicarboxylic acid diethyl ester may be prepared as follows :



5-Trifluoromethanesulfonyloxy-isophthalic acid dimethyl ester (Bodwell, G.J. ; Fleming, J.J. ; Mannion, M.R. ; Miller, D.O. *J. Org. Chem.* 2000, *65 (17)*, 5360) (1g) was dissolved in 2 mL of acetonitrile. N-Methyl-N-tert-butoxycarbonyl-propargylamine (Bradbury, B.J. ; Baumgold, J. ; Jacobsen, K.A. *J. Med. Chem.* 1990, *33 (2)*, 741) (643 mg), bis(triphenylphosphine)palladium chloride (205 mg), copper iodide (56 mg) and triethylamine (591 mg) were added. The resultant mixture was stirred for 15h at room temperature. The solvent was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was then washed into separatory funnel using ethyl acetate and water. The layers were separated, and the aqueous layer was extracted once with ethyl acetate. The combined organic solutions were washed with a saturated sodium chloride aqueous solution, dried over magnesium sulphate, and concentrated in vacuo to a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Biotage FLASH 40+M 100g column, SiOH 32-63µm, eluted with ethyl acetate / heptane, 20:80) to give 5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyn-1-yl)-benzene-1,3-dicarboxylic acid diethyl ester (896 mg) :

^{1}H N.M.R. (300 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : 1,43 (s, 9H) ; 2,90 (s, 3H) ; 3,90 (s, 6H) ; 4,30 (s, 2H) ; 8,16 (d, J = 1,5 Hz, 2H) ; 8,42 (t, J = 1,5 Hz, 1H)

- Example 10 : 8,8'-{5-[3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-propyloxy]-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)}-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared as follows :



To a cooled (0°C) solution of 1-[3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-propyloxy]-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene (45 mg) and triethylamine (49 µL) in dichloromethane (1.5 mL), was added methanesulfonyl chloride (19 µL). After 30 minutes, the reaction mixture was washed twice with water and the resulting dichloromethane solution was dried over magnesium sulfate, and concentrated in vacuo to a viscous oil (39 mg).

To a solution of pre-tomaymycin (26 mg) in dimethylformamide (0.9 mL) was added potassium carbonate (40 mg), potassium iodide (16 mg) and a sample of the crude compound (31 mg). The reaction mixture was stirred for 20 h at 30°C. Another sample of the crude compound was added (6 mg), and the reaction mixture was stirred for another 20 h at 30°C. Solids were filtered off, washed with dimethylformamide (0.3 mL) then discarded. Water (1.6 mL) was added to the combined dimethylformamide solution and the resulting solid was filtered, washed with water and dried in vacuo to give a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Interchrom Puriflash 2g column, SiOH 15-35µm, eluted with dichloromethane / methanol, 95:5) then another purification by silica gel chromatography (Chromabond OH 2g column, 45µm, eluted with dichloromethane to give 8,8'-{5-[3-(4-methyl-4-methyldisulfanylpentanoyl-amino)propyloxy]-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)}-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzo-diazepin-5-one] (0.2 mg) :

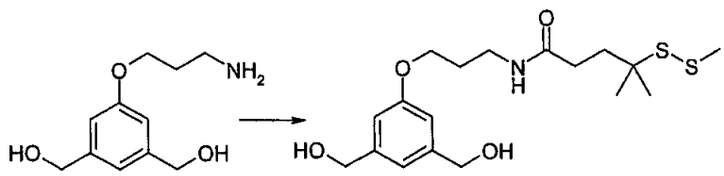
LC/MS (Method A1, Platform I) : ES : m/z=896 MH^+

Retention time = 4.09 minutes

^{1}H N.M.R. (500 MHz, CDCl3-d1, δ in ppm) : 1,29 (s, 6H) ; 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; from 1,92 to 2,03 (m, 4H) ; 2,28 (m, 2H) ; 2,39 (s, 3H) ; 2,97 (m, 4H) ; 3,45 (q, J = 6,0 Hz, 2H) ; 3,89 (q, J = 5,5 Hz, 2H) ; 3,96 (s, 6H) ; 4,04 (t, J = 5,0 Hz, 2H) ; 4,27 (s broad, 4H) ; 5,14 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,20 (d, J = 12,5 Hz,

2H) ; 5,60 (m, 2H) ; 5,84 (t broad, J = 6,0 Hz, 1H) ; 6,83 (s, 2H) ; 6,94 (s, 2H) ; 7,09 (s, 1H) ; 7,53 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 5,0 Hz, 2H) .

1-[3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-propyloxy]-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene



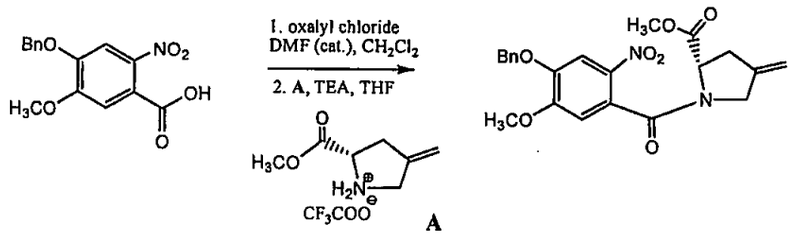
To a solution of 1-(3-amino-propyloxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene (50 mg) in dimethylformamide (1 mL) was added 4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoic acid (44 mg), N,N'-diisopropylcarbodiimide (35 mL) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (5.8 mg). After 15 h at room temperature, water was added to the reaction mixture and the aqueous solution was extracted twice with ethyl acetate. The combined organic solutions were washed with a saturated sodium chloride aqueous solution, dried over magnesium sulfate and concentrated in vacuo to a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Interchrom Puriflash 5g column, SiOH 15-35 μm), eluted with methanol / dichloromethane, 5:95 to give 1-[3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-propyloxy]-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene (48 mg):

LC/MS (Method A1, ZQ) : ES m/z=388 MH^+

Retention time = 3.03 minutes

^{1}H N.M.R. (300 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : 1,24 (s, 6H) ; from 1,76 to 1,87 (m, 4H) ; 2,16 (m, 2H) ; 2,40 (s, 3H) ; 3,19 (q, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,95 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,44 (d broad, J = 5,5 Hz, 4H) ; 5,12 (d, J = 5,5 Hz, 2H) ; 6,73 (s broad, 2H) ; 6,83 (s broad, 1H) ; 7,92 (t broad, J = 5,5 Hz, 1H)

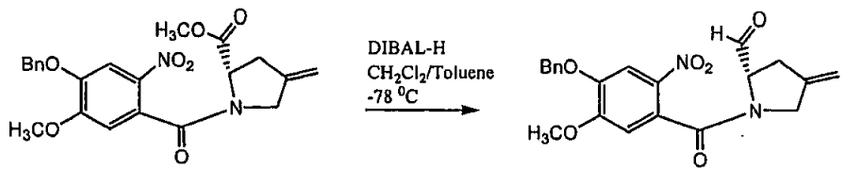
• Example 11 : Preparation of starting products and/or intermediates



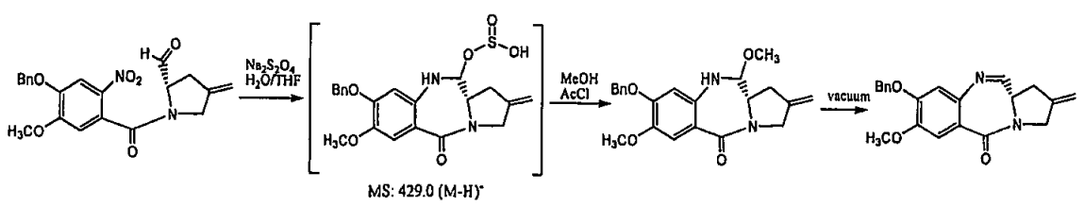
To a solution of 4-benzyloxy-5-methoxy-2-nitrobenzoic acid (4.8 g, 16 mmol) in anhydrous dichloromethane (80 mL) and THF (5 mL) was added oxalyl chloride (2.8 mL, 32 mmol) and DMF (30 µL, 0.38 mmol) at room temperature. Large amounts of bubble formed after the addition of DMF. The mixture was stirred overnight then the solvents were removed by rotary evaporation *in vacuo*. The residue was co-evaporated one more time by addition of anhydrous dichloromethane to give the acetyl chloride as a yellow solid.

To a solution of 4-methylene-*L*-proline methyl ester, compound **A**, (3.95 g, 15.5 mmol) in anhydrous THF (80 mL) was added triethylamine (6.7 mL, 48 mmol) at 0°C. After 2 minutes the above acetyl chloride in anhydrous THF (80 mL) was added quickly in 10 minutes via a canula at the same temperature. The obtained yellow cloudy solution was stirred at 0 ~ 5°C for 30 minutes then at room temperature for 4 hours. The reaction solution was diluted with ethyl acetate and water. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate twice and the combined organic layers were washed with 2% HCl solution and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate. It was filtered and the solvents were removed. The residue was purified by flash chromatography (Hexanes/AcOEt, 1:1, 1:1.5) to give (2S)-4-(methylene)-1-[5-methoxy-2-nitro-4-(phenylmethoxy)-benzoyl]-2-pyrrolidinecarboxylic acid methyl ester as a yellow solid (5.6 g, y = 85%). ^{1}H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): the compound appears as a pair of distinct rotomers. δ 7.76 (s, 0.7H), 7.73 (s, 0.3H), 7.43-7.29 (m, 5H), 6.83 (s, 0.7H), 6.80 (s, 0.3H), 5.17 (s, 1.4H), 5.16 (s, 0.6H), 5.10-4.89 (m, 2.7H), 4.57 (d, J = 16 Hz, 0.3H), 4.19-4.12 (m, 0.7H), 3.95-3.77 (m, 6.3H), 3.57 (s, 1H), 3.06-2.96 (m, 1H), 2.73-2.62 (m, 1H); ^{13}C NMR (400 Hz, $CDCl_3$): 171.8, 171.7, 166.5, 166.2, 154.9, 154.4, 148.25, 148.18, 141.7, 141.3, 137.19, 137.13, 135.3, 135.2, 128.7, 128.43, 128.41, 127.5, 127.3, 109.5, 109.1, 109.0, 108.9, 71.3,

60.6, 58.1, 56.7, 56.5, 52.39, 52.37, 52.0, 50.2, 37.1, 35.5; MS (ESI): *m/z* 449.3 $(M + Na)^+$.



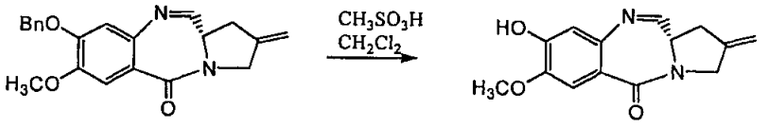
To a solution of the ester (3.15 g, 7.39 mmol) in anhydrous dichloromethane (9 mL) and toluene (27 mL) was added dibal-H (15 mL, 1.0 M in toluene) dropwise via a syringe pump in 30 minutes at -78°C. The mixture was continued to stir at -78°C for 2 hours and TLC (hexanes/AcOEt, 1:1.5) showed all the starting material consumed. The reaction was quenched with methanol (0.3 mL, 7.4 mmol) at -78°C and 5% HCl (20 mL) was added followed by addition of AcOEt (50 mL). The dry ice/acetone bath was removed and the mixture was warmed to 0°C and stirred for 15 minutes. The aqueous layer was extracted with AcOEt twice and the combined organic layers were washed with cold 5% HCl and brine, dried over anhydrous sodium sulfate. It was filtered through celite and the solvents were removed. The residue was purified by flash chromatography (Hexanes/AcOEt, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 100% AcOEt) to give (2S)-4-(methylene)-1-[5-methoxy-2-nitro-4-(phenylmethoxy)benzoyl]-2-pyrrolidinecarboxaldehyde as a fluffy yellow solid (2.69 g, y = 92%). ^1H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): the compound appears as a pair of distinct rotomers. δ 9.75 (s, 0.7H), 9.32 (s, 0.3H), 7.76 (s, 0.7H), 7.69 (s, 0.3H), 7.45-7.31 (m, 5H), 6.85 (s, 0.7H), 6.80 (s, 0.3H), 5.19-4.82 (m, 4.7H), 4.56 (d, J = 16 Hz, 0.3H), 4.14-3.79 (m, 5H), 2.99-2.68 (m, 2H); ^{13}C NMR (400 Hz, $CDCl_3$): 198.3, 197.1, 167.1, 155.0, 154.6, 148.4, 141.3, 140.4, 137.2, 135.2, 128.7, 128.5, 128.4, 127.5, 126.9, 126.6, 109.8, 109.4, 109.3, 109.2, 109.1. 71.3, 66.6, 64.3, 56.7, 56.6, 52.2, 50.6, 33.2, 31.9; MS (ESI): *m/z* 419.2 $(M + Na)^+$.



Procedure 1: To a solution of (2S)-4-(methylene)-1-[5-methoxy-2-nitro-4-(phenylmethoxy)benzoyl]-2-pyrrolidinecarboxaldehyde (1.0 equivalent) in THF/H_2O (v/v, 1.7:1, 0.03 M) was added sodium hydrosulfite (5~8 equivalent) in portions within 2 minutes at room temperature. The mixture was further stirred for 6~20 hours and monitored by TLC (hexanes/AcOEt 1:2 and CH_2Cl_2/MeOH 5:1). After the aldehyde was almost consumed, the reaction was quenched with methanol (about same volume as THF used). The solvents were removed by rotary evaporation *in vacuo* (temperature < 40°C) and the remainder solid was put on high vacuum to make it completely dry. The solid was suspended in anhydrous methanol (0.03 M) and AcCl (8~10 equivalent) was added dropwise at room temperature. After stirred for 15 minutes, the cloudy solution was filtered and the solid was washed with anhydrous methanol. The clear yellow filtrate was stirred at room temperature for 1 to 2 hours and was quenched with saturated sodium bicarbonate. After most of the methanol was removed by rotary evaporation, the remainder was diluted with dichloromethane and water. The aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate and filtered. The solvents were removed and the residue was purified by flash chromatography (hexanes/AcOEt, 1:3, 1:5) to give (11aS)-7-methoxy-2-methylene-8-(phenylmethoxy)-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one in 70% to 85% yield. The NMR spectra are consistent with the literature reported. MS (ESI): *m/z* 371.2 $(M + Na)^+$. MS (ESI, with CH_3OH): *m/z* 403.3 $(M + CH_3OH + Na)^+$. MS (ESI, with H_2O): *m/z* 389.2 $(M + H_2O + Na)^+$.

Procedure 2: To a solution of (2S)-4-(methylene)-1-[5-methoxy-2-nitro-4-(phenylmethoxy)benzoyl]-2-pyrrolidinecarboxaldehyde (1.0 equivalent) in MeOH/H_2O (v/v, 3.2:1, 0.03 M) was added sodium hydrosulfite (6~8 equivalent) in portions within 2 minutes at room temperature, followed by addition of sodium hydrosulfate (0.5~1.0 equivalent). The mixture was further stirred for 12~20 hours and monitored by TLC (hexanes/AcOEt 1:2 and CH_2Cl_2/MeOH 5:1). After the intermediate [MS (ESI): 459.0 $(M - H)^-$] was almost consumed, the reaction was quenched with saturated sodium bicarbonate to pH 5~6. The solvents were

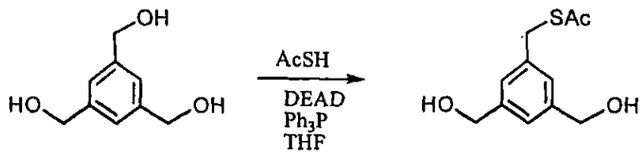
removed by rotary evaporation *in vacuo* (temperature < 40°C) and the remainder solid was put on high vacuum to make it completely dry. The solid was suspended in anhydrous methanol (0.03 M) and AcCl (8~10 equivalent) was added dropwise at room temperature. After stirred for 15 minutes, the cloudy solution was filtered and the solid was washed with anhydrous methanol. The clear yellow filtrate was stirred at room temperature for 1 to 2 hours and was quenched with saturated sodium bicarbonate. After most of the methanol was removed by rotary evaporation, the remainder was diluted with dichloromethane and water. The aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate and filtered. The solvents were removed and the residue was purified by flash chromatography (hexanes/AcOEt, 1:3, 1:5) to give (11aS)-7-methoxy-2-methylene-8-(phenylmethoxy)-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one in 65% to 80% yield.



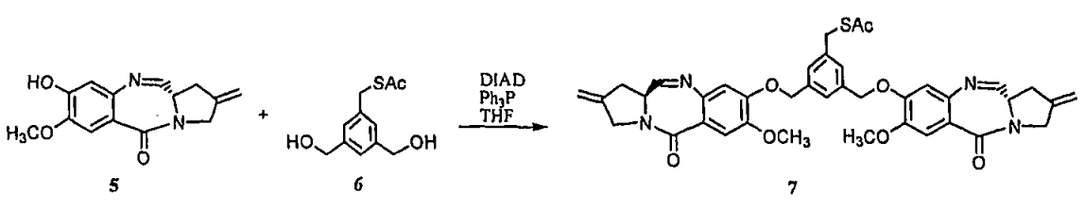
To a solution of the starting material (98 mg, 0.28 mmol) in anhydrous dichloromethane (2 mL) was added a freshly mixed solution of methanesulfonic acid (2 mL) in anhydrous dichloromethane (4 mL) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1.5 hours and was poured on ice (~30 g), quenched with saturated $NaHCO_3$ and diluted with dichloromethane. The aqueous layer was extracted with dichloromethane once and the combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and the solvents were removed. The residue was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2/MeOH, 15:1) to give the product as a yellow solid (29 mg). The above aqueous layer was stirred at room temperature overnight and extracted with dichloromethane and AcOEt subsequently. The combined dichloromethane and AcOEt were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and the solvents were removed to give (11aS)-8-hydroxy-7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one (25 mg). The total yield is

74%. ^{1}H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7.65 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.35 (bs, 1H), 5.17 (t, J = 1.6 Hz, 1H), 5.14 (7, J = 1.6Hz, 1H), 4.26 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.87-3.83 (m, 1H), 3.12-3.05 (m, 1H), 2.91 (d, J = 16 Hz, 1H); MS (ESI): *m/z* 281.0 $(M + Na)^+$. MS (ESI, with water): *m/z* 258.9 $(M + H)^+$, *m/z* 299.1 $(M + H_2O + Na)^+$.

- Example 12 : 8,8'-[5-acetylthiomethyl-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-methylene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



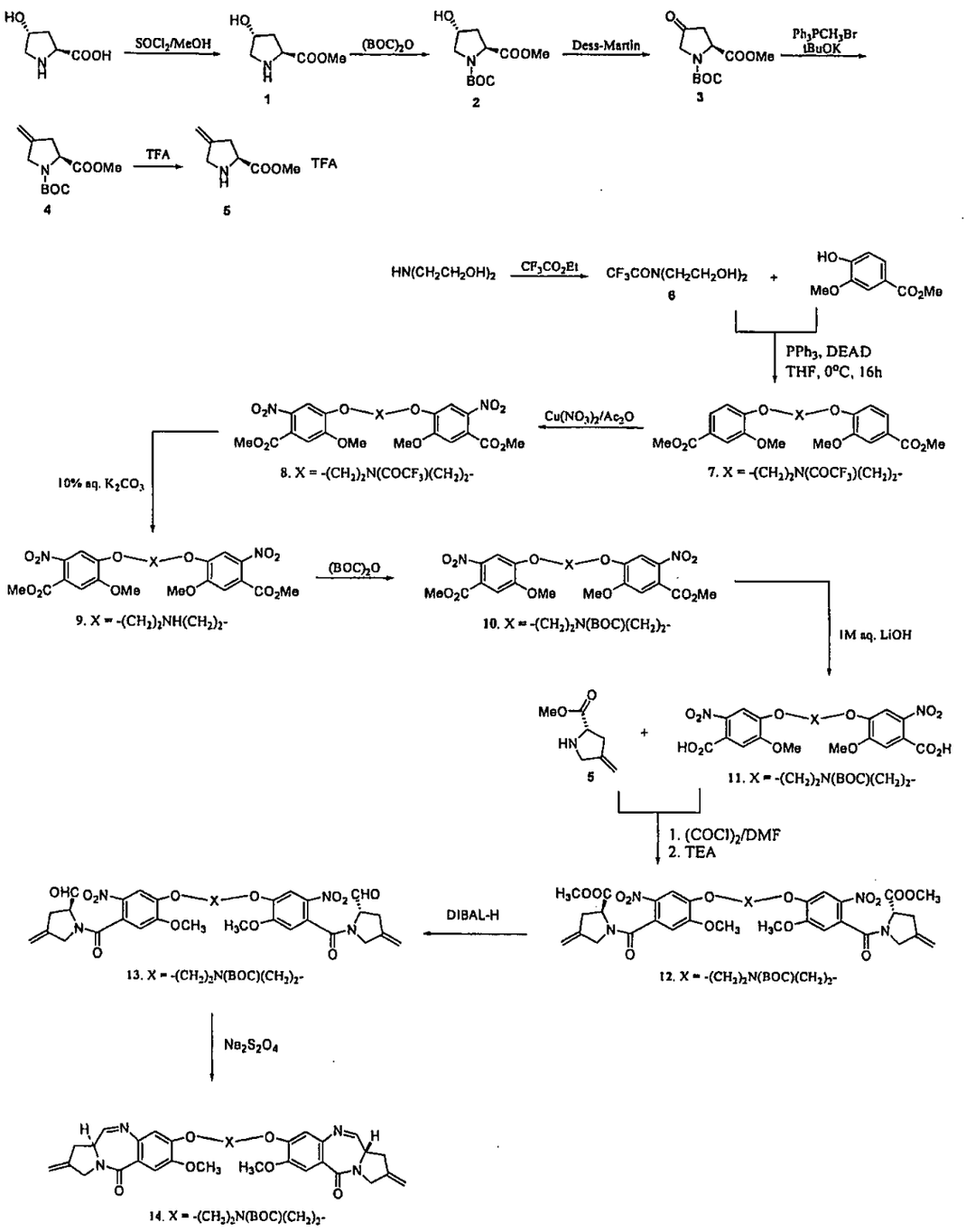
To a solution of triphenylphosphine (577 mg, 2.2 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was added diethyl azodicarboxylate (2.2 M in toluene, 791 µL, 1.7 mmol) dropwise at 0°C. After stirred at 0°C for 50 minutes, a solution of 1,3,5-tri(hydroxymethyl)benzene (269 mg, 1.6 mmol, prepared by reduction of trimethyl 1,3,5-benzenetricarboxylate with lithium aluminum hydride in THF, co-evaporated with dry benzene and dried on high vacuum for couple hours before use) and thioacetic acid (108 µL, 1.45 mmol) in dry THF (4 mL) was added dropwise. After 1 hour, the ice/water bath was removed and the reaction was stirred at room temperature for 15 hours. The solvents were removed by rotary evaporation *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography to give 5-acetylthiomethyl-1,3-bis(hydroxymethyl)-benzene as colorless solid (110 mg). ^{1}H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7.13-6.99 (m, 3H), 4.45 (apt, J = 20.4 Hz, 4H), 3.98 (apt, J = 20.4 Hz, 4H), 3.73 (bs, 2H), 2.24 (apt, J = 20.4 Hz, 3H); MS (ESI): *m/z* 249.0 $(M + Na)^+$.



To a solution of triphenylphosphine (28 mg, 0.1 mmol) in anhydrous THF (0.3 mL) was added disopropyl azodicarboxylate (19 µL, 0.09 mmol) dropwise at 0°C. After stirred at 0°C for 35 minutes, a solution of (11aS)-8-hydroxy-7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one, compound **5,** (18 mg, 0.07 mmol, co-evaporated with dry benzene and dried on high vacuum for couple hours before use) in dry THF (0.2 mL) was added. The mixture was continued to stir for 10 minutes before 5-acetylthiomethyl-1,3-bis(hydroxymethyl)-benzene, compound **6,** (6.6 mg, 0.03 mmol, co-evaporated with dry benzene and dried on high vacuum for couple hours before use) in dry THF (0.2 mL) was added. The reaction mixture was allowed to stir at 0°C for 35 minutes. The ice/water bath was removed and the solution was stirred at room temperature for 21 hours. The solvents were removed by rotary evaporation *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography to furnish the crude product which was further purified by preparative HPLC (C18 column, CH_3CN/H_2O) to give 0.7 mg of 8,8'-[5-acetylthiomethyl-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-methylene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one], compound **7**. MS (ESI, with H_2O): *m/z* 765.3 $(M + 2H_2O + Na)^+$, 747.3 $(M + H_2O + Na)^+$, 729.2 $(M + Na)^+$, 707.3 $(M + H)^+$, 663.2 $(M - Ac)^-$.

- Example 13 Bis-{2-[(S)-2-methylene-7-methoxy-5-oxo-1,3,,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yloxy]-ethyl}-carbamic acid tert-butyl ester

Scheme 1



Compound **1**. Thionyl chloride (5.6 mL, 76.3 mmol) was added dropwise to dry methanol (76 mL) at -20 °C, following by addition of *trans*-4-hydroxy-*L*-proline (5.0 g, 38.1 mmol). The resulting mixture was allowed to warm to rt and stirred for 20 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the

residue was further dried under high vacuum to provide *trans*-4-hydroxy-*L*-proline methyl ester **1** as a white solid: ^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 2.18 – 2.23 (m, 2H), 3.06 (m, 1H), 3.32 – 3.36 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 4.42 (br. s, 1H), 4.48 (dd, J = 5.4, 8.1 Hz, 1H), 5.56 (br. s, 1H); EIMS *m/z* 146 ([M]$^+$+1).

Compound **2**. To a solution of *trans*-4-hydroxy-*L*-proline methyl ester **1** (4.48 g, 30.9 mmol) and sodium bicarbonate (1.56 g, 18.5 mmol) in anhydrous DMF (42 mL) was added solution of $(BOC)_2O$ in DMF (20 mL) at 0°C under argon. After stirring for an overnight at rt, the reaction was quenched by the addition of 100 mL H_2O at 0°C, and extracted with EtOAc (4 x 80 mL). The combined organic layer was washed with brine (100 mL), dried ($MgSO_4$), filtered and concentrated with rotavapor. The residue was purified by flash chromatography (silica gel, 1:1 hexanes/EtOAc) to give N-BOC protected *trans*-4-hydroxy-*L*-proline methyl ester **2** as colorless oil: ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotamers) δ 1.38 and 1.43 (2 x s, 9H), 2.04 – 2.07 (m, 1H), 2.23 – 2.27 (m, 2H), 3.54 – 3.63 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 4.34 – 4.38 (m, 1H), 4.46 (br. s, 1H).

Compound **3**. (Franco Manfre, Jean-Marc Kern, and Jean-Francois Biellmann *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2060-2065). N-BOC protected *trans*-4-hydroxy-*L*-proline methyl ester compound **2** (3.24 g, 13.2 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (132 mL) and cooled to 0°C. Pyridine and Dess-Martin periodinane were added and stirring was continued until TLC showed no SM left. The reaction mixture was diluted with CH_2Cl_2, washed with 10% aq. $Na_2S_2O_3$ (3 x 50 mL), 1N aq. HCl (50 mL), sat. aq. $NaHCO_3$ (50 mL), brine (50 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated. Purification of the residue by flash chromatography (silica gel, 7:3 hexanes/EtOAc) gave N-BOC protected 4-oxo-*L*-proline methyl ester **3** as light yellow oil: ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotamers) δ 1.44 (s, 9H), 2.53 – 2.57 (m, 1H), 2.85 – 2.96 (m, 1H), 3.72 and 3.74 (2 x s, 3H), 3.85 – 3.87 (m, 2H), 4.67 – 4.77 (m, 1H).

Compound **4**. (Kuei-Ying Lin, Mark Matteucci US 5414077) A solution of potassium-*t*-butoxide (2.51 g, 22.3 mmol) in anhydrous THF (40 mL) was added

to a suspension of methyltriphenylphosphonium bromide (7.99 g, 22.3 mmol) in THF (40 mL) at 0°C. The resulting yellow ylide suspension was stirred at 0°C for 2 h before the addition of the solution of N-BOC protected 4-oxo-*L*-proline methyl ester **3** (2.72 g, 11.2 mmol) in THF (32 mL). After stirring at rt for 1 h, the reaction mixture was diluted with EtOAc (100 mL), washed with H_2O (80 mL), brine (80 mL), dried ($MgSO_4$), and concentrated. Purification of the residue by flash chromatography (silica gel, 9:1 hexanes/EtOAc) yielded N-BOC protected 4-methylene-*L*-proline methyl ester, compound **4,** as colorless oil: ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotamers) δ 1.40 and 1.45 (2 x s, 9H), 2.58 – 2.62 (m, 1H), 2.88 – 2.98 (m, 1H), 3.69 and 3.70 (2 x s, 3H), 4.03 – 4.06 (m, 2H), 4.36 – 4.49 (m, 1H), 4.97 – 4.99 (m, 2H); EIMS *m/z* 264 ($[M]^+$+Na).

Compound **5**. N-BOC protected 4-methylene-*L*-proline methyl ester, compound **4,** (0.8 g, 3.31 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (6.5 mL) and cooled to 0 °C. A solution of trifluoroacetic acid (6.5 mL) in CH_2Cl_2 (6.5 mL) was added dropwise and the resulting mixture was stirred at rt for 1.5 h. After removal of volatile solvents with rotavapor, the brown residue was dissolved in 10 mL H_2O, washed with Et_2O (3 x 5 mL). Aqueous solution was concentrated, which was further dried under high vacuum to yield 4-methylene-*L*-proline methyl ester **5** as TFA salt: ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotamers) δ 2.83 – 2.87 (m, 1H), 3.05 – 3.11 (m, 1H), 3.80 and 3.81 (2 x s, 3H), 4.00 – 4.10 (m, 2H), 4.55 (dd, *J* = 5.7, 5.7 Hz, 1H), 5.17 – 5.21 (m, 2H); ^{13}CNMR δ 34.0, 49.1, 53.8, 59.3, 111.7, 137.6, 169.8; EIMS *m/z* 142 ($[M]^+$+1).

Compound **6**.(Kamal, A.; et al *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4679-4688) Diethanolamine (3.57 g, 34 mmol) was dissolved in methanol (20 mL) and treated with Et_3N (4.7 mL, 34 mmol) and ethyl trifluoroacetate (4.90 g, 34 mmol) for 20 h at rt, followed by adding another 1 mL CF_3COOEt. After another 20 h, removal of volatile solvents under high vacuum yielded N-trifluoroacetyl-diethanolamine compound **6** as light yellow oil, which was used without further purification.

Compound **7**. Diethyl azodicarboxylate (7.66 g, 44 mmol) was added dropwise to a stirred solution of methyl vanillate (7.30 g, 40.1 mmol) and triphenylphosphine (15.67 g, 59.7 mmol) in anhydrous THF (57 mL) at 0 °C, and the resulting mixture was stirred for 1 h at this temperature followed by addition of a solution of N-trifluoroacetyl-diethanolamine **6** (7.30 g, 40.1 mmol) in anhydrous THF (20 mL). After stirring for an overnight at rt, the reaction was quenched with H_2O (100 mL), and extracted with Et_2O (3 x 80 mL). The combined Et_2O layers were washed with brine (100 mL), dried ($MgSO_4$), and concentrated. Purification of the residue by flash chromatography (silica gel, 8:2 to 7:3 hexanes/EtOAc) yielded N-trifluorocetyl-N,N-di[2-(4-methoxycarbonyl-2-methoxy-phenoxy)ethyl]amine, compound **7**, as a white solid: ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.81 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 4.04 – 4.08 (m, 4H), 4.28 – 4.32 (m, 4H), 6.84 and 6.85 (2 x d, J = 6.3 Hz, 2H), 7.50 and 7.51 (2 x d, J = 1.5 Hz, 2H), 7.61 (dd, J = 1.5, 6.3 Hz, 2H).

Compound **8**. Solid $Cu(NO_3)_2.xH_2O$ (2.33 g, 12.41 mmol) was added to a stirred solution of N-trifluorocetyl-N,N-di[2-(4-methoxycarbonyl-2-methoxy-phenoxy)ethyl]amine **7** (2.62 g, 4.96 mmol) in acetic anhydride (50 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h and rt for 2 h, then poured into 200 mL ice-water. Stirring was continued for another 1 h. The resulting yellow precipitate was collected by filtration. Further purification with flash chromatography (silica gel, 6:4 hexanes/EtOAc) yielded N-trifluorocetyl-N,N-di[2-(4-methoxycarbonyl-2-methoxy-5-nitro-phenyloxy)ethyl]amine, compound **8**, as light yellow solid: ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.86 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.886 (s, 3H), 3.890 (s, 3H), 4.04 – 4.09 (m, 4H), 4.30 – 4.35 (m, 4H), 6.98 and 6.99 (2 x s, 2H), 7.37 and 7.40 (2 x s, 2H).

Compound **9**. A solution of N-trifluorocetyl-N,N-di[2-(4-methoxycarbonyl-2-methoxy-5-nitro-phenyloxy)ethyl]amine **8** (2.58 g, 4.16 mmol) in THF-MeOH (1:2, 48 mL) was treated with 10% aq. K_2CO_3 (16 mL) at rt for 12 h. After removal of volatile with rotavapor, the residue was diluted with 100 mL H_2O, extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The combined EtOAc layers were washed

with brine (100 mL), dried ($MgSO_4$), and concentrated yielding N,N-di[2-(4-methoxycarbonyl-2-methoxy-5-nitro-phenyloxy)ethyl]amine, compound **9,** at yellow solid, which was used without further purification: ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.17 (t, J = 3.9 Hz, 4H), 3.89 (s, 6H), 3.93 (s, 6H), 4.19 (t, J = 3.9 Hz, 4H), 7.05 (s, 2H), 7.47 (s, 2H).

Compound **10**. N,N-di[2-(4-methoxycarbonyl-2-methoxy-5-nitrophenyl-oxy)ethyl]amine, compound **9,** (crude, 4.16 mmol) and $NaHCO_3$ (210 mg, 2.50 mmol) was suspended in THF, and treated with $(BOC)_2O$ (999 mg, 4.58 mmol) at 0 °C and stirring was continued at rt for 3 h. After removal of THF, the residue was partitioned between H_2O and EtOAc (100/100 mL). Aqueous layer was further extracted with EtOAc (2 x 50 mL). The combined EtOAc layers were washed with brine (80 mL), dried ($MgSO_4$), and concentrated. Purification of the residue by flash chromatography (silica gel, 6:4 hexanes/EtOAc) yielded N-tert-butoxycarbonyl-N,N-di[2-(4-methoxycarbonyl-2-methoxy-5-nitro-phenyloxy)ethyl]amine, compound **10,** as light yellow solid: ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.44 (s, 9H), 3.77 (m, 4H), 3.83, 3.86 and 3.87(3 x s, 12H), 4.20 and 4.26 (2 x t, J = 3.9 Hz, 4H), 6.97 and 6.99 (2 x s, 2H), 7.36 and 7.40 (2 x s, 2H); EIMS *m/z* 646 ($[M]^+$+Na).

Compound **11**. N-tert-butoxycarbonyl-N,N-di[2-(4-methoxycarbonyl-2-methoxy-5-nitro-phenyloxy)ethyl]amine, compound **10** (2.11 g, 3.39 mmol) was suspended in THF-MeOH-H_2O (3:1:1, 65 mL) and treated with 1M aq. LiOH (14 mL) at rt for 3 h. After removal of volatile solvents, the residue was diluted with H_2O (25 mL). The resulting aqueous solution was acidified to pH ~ 1 with concentrate HCl. The precipitated N-tert-butoxycarbonyl-N,N-di[2-(4-carboxy-2-methoxy-5-nitro-phenyloxy)ethyl]amine, compound **11,** was collected by filtration, washed with H_2O, and further dried under high vacuum: ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotamers) δ 1.39 (s, 9H), 3.70 (m, 4H), 3.88 and 3.89(2 x s, 6H), 4.29 (m, 4H), 7.29 and 7.31 (2 x s, 2H), 7.63 (s, 2H), 13.60 (br. s, 2H); ^{13}CNMR δ 27.8, 46.2 and 46.6, 56.3 and 56.4, 67.2, 79.2, 107.9 and 108.0, 111.3, 141.4

and 141.5, 149.1, 151.7, 154.5, 165.9; HRMS *m/z* calcd for $C_{25}H_{29}N_3O_{14}Na$ 618.1547, found 618.1552 ($[M]^+$+Na).

Compound **12**. A catalytic amount of DMF (2 drops) was added to a solution of N-tert-butoxycarbonyl-N,N-di[2-(4-carboxy-2-methoxy-5-nitro-phenyloxy)ethyl]amine 11 (194 mg, 0.33 mmol) and oxalyl chloride (72.7 μL, 0.81 mmol) in anhydrous THF (6.5 mL) and the resulting mixture was stirred at rt for an overnight. Excess THF and oxalyl chloride was removed with rotavapor. The actyl chloride was resuspended in fresh THF (4 mL) and was added dropwise to a solution of 4-methylene-*L*-proline methyl ester 5 (206.7 mg, 0.81 mmol), Et_3N (0.19 mL, 1.39 mmol), and H_2O (0.4 mL) in THF (1 mL) at 0°C under argon atmosphere. The reaction mixture was allowed to warm to rt and stirring was continued for 2 h. After removal of THF, the residue was partitioned between H_2O and EtOAc (10/10 mL). The aqueous layer was further extracted with EtOAc (2 x 8 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried ($MgSO_4$) and concentrated. Purification of the residue by flash chromatography (silica gel, 2:8 hexanes/EtOAc) yielded bis{2-[5-methoxy-2-nitro-4-[(S)-4-methylene-2-methoxycarbonyl-1-pyrrolidinylcarbonyl]-phenyloxy]-ethyl}-carbamic acid tert-butyl ester **12** as light yellow oil (rotamers): ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotamers) δ 1.46 (s, 9H), 2.68 – 2.75 (m, 2H), 2.99 – 3.10 (m, 2H), 3.60 – 4.28 (m, 24H), 4.56 – 5.12 (m, 6H), 6.78 – 6.83 (m, 2H), 7.63 – 7.71 (m, 2H); EIMS *m/z* 864 ($[M]^+$+Na).

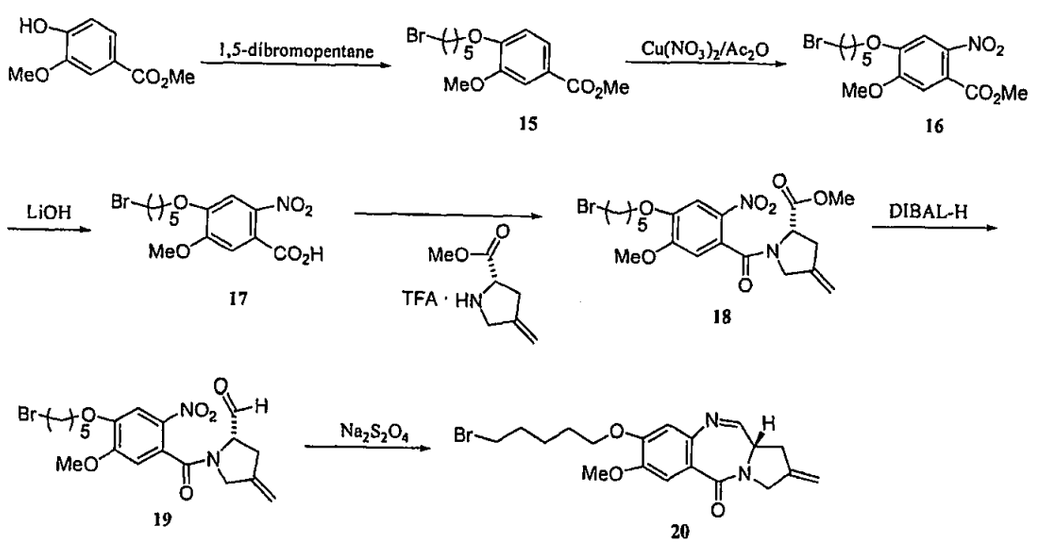
Compound **13**. To a vigorously stirred solution of bis{2-[5-methoxy-2-nitro-4-[(S)-4-methylene-2-methoxycarbonyl-1-pyrrolidinylcarbonyl]phenyloxy]-ethyl}-carbamic acid tert-butyl ester **12** (100 mg, 0.12 mmol) in anhydrous toluene (2.4 mL) was added dropwise solution of DIBAL-H (480 μL of a 1M solution in toluene) at -78 °C under argon atmosphere. After the mixture was stirred for an additional 45 min, excess reagent was decomposed by addition of five drops of methanol followed by 5% HCl (4 mL). The resulting mixture was allowed to warm to 0°C. Layers were separated and the aqueous layer was further extracted with CH_2Cl_2 (3 x 3 mL). Combined organic layers were washed with

brine, dried ($MgSO_4$) and concentrated. Purification of the residue by flash chromatography (silica gel, 95:5 $CHCl_3$/MeOH) yielded bis{2-[5-methoxy-2-nitro-4-[(S)-4-methylene-2-formyl-1-pyrrolidinylcarbonyl]phenyloxy]-ethyl}-carbamic acid tert-butyl ester **13** as light yellow oil (84 mg, 91%).

Compound **14**. A mixture of bis{2-[5-methoxy-2-nitro-4-[(S)-4-methylene-2-formyl-1-pyrrolidinylcarbonyl]phenyloxy]-ethyl}-carbamic acid tert-butyl ester 13 (180 mg, 0.23 mmol), $Na_2S_2O_4$ (1.84 mmol, 8 equiv), 3.5 mL THF, and 2.2 mL H_2O was stirred at rt for 20 h. Solvents were removed under high vacuum. The residue was re-suspended in MeOH (30 mL), and AcCl was added dropwise until pH ~ 2. The resulting mixture was stirred at rt for 1 h. The reaction was work-up by removing most of MeOH, then diluted with EtOAc (25 mL). The EtOAc solution was washed with sat. aq. $NaHCO_3$, brine, dried ($MgSO_4$), and concentrated. Purification of the residue by flash chromatography (silica gel, 97:3 $CHCl_3$/MeOH) yielded bis-{2-[(S)-2-methylene-7-methoxy-5-oxo-1,3,,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yloxy]-ethyl}-carbamic acid tert-butyl ester **14** as white solid (86 mg, 50%).

Example 14: (11aS)-7-(5-bromopentyloxy)-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one

Scheme 2



Compound **15**. To a solution of methyl vanillate (9.109 g, 50 mmol) in acetone (200 mL) were added K_2CO_3 (27.64 g, 200 mmol) and 1,5-dibromopentane (20.4 mL, 150 mmol). The resulting mixture was heated to reflux. After 6h, TLC showed no starting material left. The mixture was cooled to rt, and the solid was removed by filtration. The filtrate was concentrated. Purification by flash chromatography (silica gel, 8:2 hexanes/EtOAc) afforded 4-(5-bromopentyloxy)-3-methoxy-benzoic acid methyl ester **15** as white solid (13.65 g, 82%): ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.60 – 1.66 (m, 2H), 1.85 – 1.97 (m, 4H), 3.42 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 4.06 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.63 (dd, J = 6.3, 1.5 Hz, 1H); EIMS *m/z* 353 and 355 ($[M]^+$+Na).

Compound **16**. Solid $Cu(NO_3)_2.xH_2O$ (3.64 g, 19.42 mmol) was added to a stirred solution of 4-(5-bromopentyloxy)-3-methoxy-benzoic acid methyl ester **15** (5.36 g, 16.18 mmol) in acetic anhydride (81 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h and rt for 2 h, then poured into 200 mL ice-water. Stirring was continued for another 1 h. The resulting yellow precipitate was collected by filtration and washed with water. Further dried under high vacuum yielded 4-(5-bromopentyloxy)-5-methoxy-2-nitro-benzoic acid methyl ester compound **16** as light yellow solid (5.98 g), which was used directly to the next step: ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.59 – 1.70 (m, 2H), 1.85 – 1.98 (m, 4H), 3.43 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 4.08 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 7.05 (s, 1H), 7.42 (s, 1H). EIMS *m/z* 398 and 400 ($[M]^+$+Na).

Compound **17**. 4-(5-Bromopentyloxy)-5-methoxy-2-nitro-benzoic acid methyl ester **16** (5.98 g, 15.9 mmol) was suspended in THF-MeOH-H_2O (3:1:1, 157 mL) and treated with 1M aq. LiOH (31 mL) at rt for 5 h. After removal of volatile solvents, the residue was diluted with H_2O (70 mL). The resulting aqueous solution was acidified to pH ~ 2 with concentrate HCl. The precipitated 4-(5-bromopentyloxy)-5-methoxy-2-nitro-benzoic acid **17** was collected by filtration, washed with H_2O, and further dried under high vacuum(5.47 g): ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.64 – 1.68 (m, 2H), 1.87 – 1.98 (m, 4H), 3.43 (t, J

= 4.8 Hz, 2H), 4.08 (s, 3H), 4.10 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 7.21 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 13.60 (br. s, 1H); EIMS *m/z* 384 and 386 ($[M]^+$+Na).

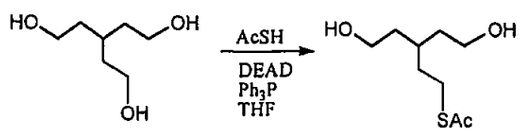
Compound **18**. A catalytic amount of DMF (2 drops) was added to a solution of 4-(5-bromopentyloxy)-5-methoxy-2-nitro-benzoic acid **17** (270 mg, 0.74 mmol) and oxalyl chloride (80 μL, 0.89 mmol) in anhydrous THF (7.5 mL) and the resulting mixture was stirred at rt for an overnight. Excess THF and oxalyl chloride were removed with rotavapor. The acetyl chloride was resuspended in fresh THF (6 mL) and was added dropwise to a solution of 4-methylene-*L*-proline methyl ester **5** (228 mg, 0.89 mmol), Et_3N (0.32 mL, 2.31 mmol), and H_2O (0.15 mL) in THF (1.5 mL) at 0 °C under argon atmosphere. The reaction mixture was allowed to warm to rt and stirring was continued for 4 h. After removal of THF, the residue was partitioned between H_2O and EtOAc (20/20 mL). The aqueous layer was further extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried ($MgSO_4$) and concentrated. Purification of the residue by flash chromatography (silica gel, 6:4 hexanes/EtOAc) yielded 1-[4-(5-bromopentyloxy)-5-methoxy-2-nitro-benzoyl]-4-methylene-*L*-proline methyl ester **18** as light yellow oil (rotamers): ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotamers) δ 1.62 – 1.68 (m, 2H), 1.86 – 1.98 (m, 4H), 2.64 – 2.75 (m, 1H), 2.99 – 3.08 (m, 1H), 3.43 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.59 – 3.96 (m, 7H), 4.05 – 4.21 (m, 3H), 4.57 – 4.61 and 4.90 – 5.12 (m, 3H), 6.80 and 6.83 (2 s, 1H), 7.64 and 7.67 (2 s, 1H); EIMS *m/z* 507 and 509 ($[M]^+$+Na).

Compound **19**. To a vigorously stirred solution of 1-[4-(5-bromopentyloxy)-5-methoxy-2-nitro-benzoyl]-4-methylene-*L*-proline methyl ester **18** (61 mg, 0.12 mmol) in anhydrous toluene – CH_2Cl_2 (3:1, 2.5 mL) was added dropwise solution of DIBAL-H (188 μL of a 1M solution in toluene) at -78 °C under argon atmosphere. After the mixture was stirred for an additional 45 min, excess reagent was decomposed by addition of three drops of methanol followed by 5% HCl (2 mL). The resulting mixture was allowed to warm to 0 °C. Layers were separated and the aqueous layer was further extracted with CH_2Cl_2 (3 x 2 mL). Combined organic layers were washed with brine, and dried ($MgSO_4$) and

concentrated. Purification of the residue by flash chromatography (silica gel, 1:1 hexanes/EtOAc) yielded (S)-1-[4-(5-bromopentyloxy)-5-methoxy-2-nitro-benzoyl]-4-methylene-2-pyrrolidinecarboxaldehyde **19** as light yellow oil (44 mg, 80%).

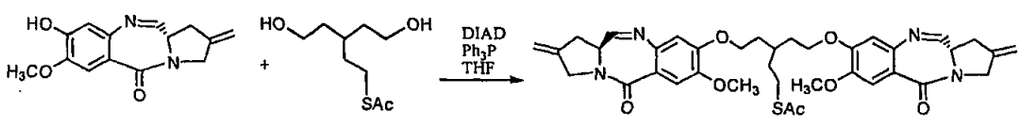
Compound **20**. A mixture of (S)-1-[4-(5-bromopentyloxy)-5-methoxy-2-nitro-benzoyl]-4-methylene-2-pyrrolidinecarboxaldehyde **19** (43.7 mg, 0.096 mmol), $Na_2S_2O_4$ (0.58 mmol, 6 equiv), 1.5 mL THF, and 0.9 mL H_2O was stirred at rt for 18 h. Solvents were removed under high vacuum. The residue was re-suspended in MeOH (6 mL), and AcCl was added dropwise until pH ~ 2. The resulting mixture was stirred at rt for 1 h. The reaction was work-up by removing most of MeOH, then diluted with EtOAc (20 mL). The EtOAc solution was washed with sat. aq. $NaHCO_3$, brine, and dried ($MgSO_4$) and concentrated. Purification of the residue by flash chromatography (silica gel, 98:2 $CHCl_3$/MeOH) yielded (11aS)-7-(5-bromopentyloxy)-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one **20** as light yellow oil (31 mg, 74%): ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ1.58 - 1.66 (m, 2H), 1.84 – 1.99 (m, 4H), 2.91 – 2.95 (m, 1H), 3.08 – 3.14 (m, 1H), 3.42 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.87 – 4.27 (m, 5H), 5.15 (br s, 1H), 5.18 (br s, 1H), 6.84 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.71 (d, J = 4.0 Hz, 1H); EIMS *m/z* 429 and 431 ($[M]^+$+Na).
Compound **20** can then be coupled to a PBD moiety prepared as in example 11 to form a compound of the invention.

- Example 15 : 8,8'-[3-(2-acetylthioethyl)-1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-methylene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzo-diazepin-5-one]



To a solution of triphenylphosphine (1.77 g, 6.8 mmol) in anhydrous THF (15 mL) was added diethyl azodicarboxylate (2.2 M in toluene, 2.4 mL, 5.4

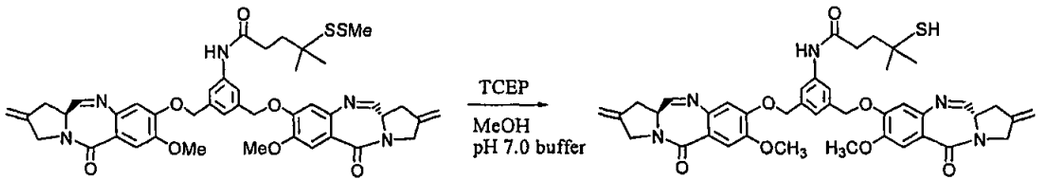
mmol) dropwise at 0°C. After stirred at 0°C for 55 minutes, a solution of 3-(2-hydroxyethyl)pentane-1,5-diol (740 mg, 5 mmol) and thioacetic acid (335 µL, 4.5 mmol) in dry THF (7 mL) was added dropwise. After 1 hour the ice/water bath was removed and the reaction was stirred at room temperature for 16 hours. The solvents were removed by rotary evaporation *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography ($CHCl_3$/MeOH, 20:1, 15:1, 10:1, 4:1) to give 3-(2-acetylthioethyl)pentane-1,5-diol as white solid (350 mg) and recovered starting material triol (406 mg). ^1H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 3.65-3.63 (m, 4H), 3.45 (bs, 2H), 2.84-2.80 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 1.73-1.67 (m, 1H), 1.55-1.49 (m, 6H). MS (ESI): *m/z* 229.0 $(M + Na)^+$.



To a solution of triphenylphosphine (53 mg, 0.2 mmol) in anhydrous THF (0.4 mL) was added disopropyl azodicarboxylate (36 µL, 0.17 mmol) dropwise at 0°C. After stirred at 0°C for 25 minutes, a solution of (11aS)-8-hydroxy-7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one, the PBD monomer, (38 mg, 0.14 mmol, co-evaporated with dry benzene and dried on high vacuum for couple hours before use) in dry THF (0.2 mL) was added. The mixture was continued to stir for 10 minutes before the thioacetate compound (12 mg, 0.058 mmol, co-evaporated with dry benzene and dried on high vacuum for couple hours before use) in dry THF (0.2 mL) was added. The reaction mixture was allowed to stir at 0°C for 35 minutes. The ice/water bath was removed and the solution was stirred at room temperature for 12 hours. The solvents were removed by rotary evaporation *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography ($CHCl_3$/MeOH, 100:1, 50:1, 25:1, 20:1) to furnish 8,8'-[3-(2-acetylthioethyl)-1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-methylene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (19 mg, y = 47%). ^1H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7.66 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 7.46 (s, 2H), 6.78 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.26 (s, 4H), 4.17-4.09 (m, 4H), 3.88 (s,

6H), 3.87-3.83 (m, 2H), 3.13-3.06 (m, 2H), 2.94-2.90 (m, 4H), 2.29 (s, 3H), 1.95 (bs, 3H), 1.68 (bs, 4H). MS (ESI, with H_2O): *m/z* 745.3 $(M + 2H_2O + Na)^+$, 727.3 $(M + H_2O + Na)^+$, 709.2 $(M + Na)^+$.

- Example 16 : 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimethylbutanoyl)amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared as follows :

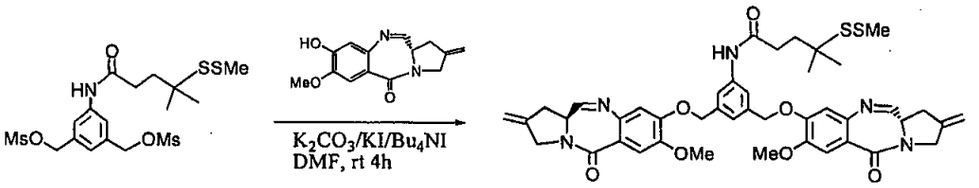


To a suspension of Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP, 52 mg, 0.18 mmol) in water (0.3 mL) was added saturated sodium bicarbonate (~0.6 mL) dropwise to adjust the pH to 6~7. A phosphate buffer (pH 7.0, 10 mM, Na_2HPO_4/H_3PO_4, 0.5 mL) was then added to it. This obtained TCEP solution was added to a mixture of 8,8'-[5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)-amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (29 mg, 0.036 mmol) in methanol (2.2 mL) and stirred at room temperature for 3 hours. The reaction was quenched with a phosphate buffer (pH 6.5) and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and the solvents were removed under reduced pressure to give a white solid. The solid was dissolved in dichloromethane/MeOH (2:1) and evaporated again. Dichloromethane was added and evaporated. The residue was high vacuumed and purified by reverse phase C18 column {CH_3CN/H_2O, the solid was dissolved in CH_3CN/H_2O (3:1, 2 mL) and stirred for 30 minutes before loading on column} to furnish 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimethylbutanoate)-amino-1,3-benzenediylbis (methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (11 mg) as a white solid (method H).

MS (ESI): m/z=786.3 MNa^+

m/z=804.2 $MNa^+ + H_2O$

8,8'-[5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared as follows:



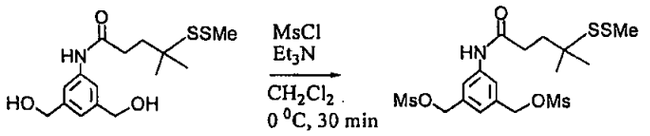
To a solution of 5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)-amino-1,3-bis-(mesyloxymethyl)-benzene (89 mg, 0.18 mmol) dissolved in anhydrous DMF (2 mL) was added 8-hydroxy-7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one (93 mg, 0.36 mmol), potassium carbonate powder (100 mg, 0.72 mmol), potassium iodide powder (15 mg, 0.09 mmol) and tetrabutylammonium iodide (13 mg, 0.036 mmol) at room temperature. After the mixture was stirred for one hour, a second portion of 8-hydroxy-7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one was added (22 mg, 0.085 mmol). The solution continued to stir at room temperature for another 3 hours. The reaction was then quenched with water and diluted with dichloromethane. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate. It was filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure followed by high vacuum to remove the residual DMF. The residue was then purified by reverse phase C18 column (CH_3CN/H_2O) to furnish 8,8'-[5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (29 mg) as a white solid (method H).

MS (ESI): m/z=832.2 MNa^+

m/z=850.2 $MNa^+ + H_2O$

^1H NMR (400 Hz, $CDCl_3$-d1, in δ ppm): 7.67 (bs, 2H), 7.58-7.26 (m, 5H), 6.82 (s, 2H), 5.21-5.14 (m, 8H), 4.30 (s, 4H), 4.02-3.88 (m, 9H), 3.16-3.10 (m, 2H), 2.97-2.93 (m, 2H), 2.45-2.40 (m, 5H), 2.09-2.03 (m, 2H), 1.34 (s, 6H)

5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)amino-1,3-bis-(mesyloxymethyl)-benzene may be prepared as follows :



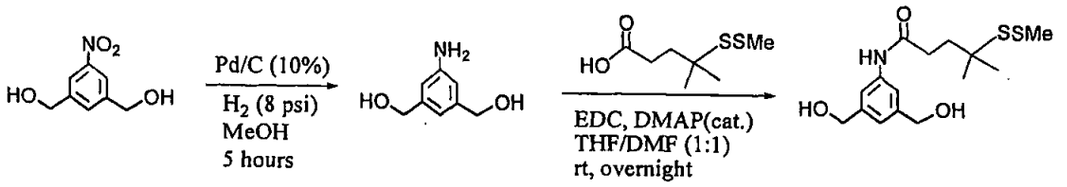
To a suspension of 5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)-amino-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene (329 mg, 1.0 mmol) in anhydrous dichloromethane (7 mL) was added triethylamine (348 µL, 2.5 mmol) followed by methanesulfonyl chloride (193 µL, 2.5 mmol) dropwise over 10 minutes at -2 °C. The solution was stirred at 0 °C for another 30 minutes and was then quenched with a mixture of ice and water. The mixture was extracted with cold dichloromethane and the combined dichloromethane layers were washed with cold water, dried over anhydrous sodium sulfate. It was filtered and the filtrate was evaporated by rotary evaporation *in vacuo*. The residue was quickly purified by a short silica gel column (Dichloromethane/Hexanes/Ethylacetate, 1:2:4) to furnish 5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)-amino-1,3-bis-(mesyloxymethyl)-benzene as a colorless oil (410 mg).

MS (ESI): m/z=508.0 MNa^+

m/z=483.9 M-H

m/z=519.9 $M-H + 2H_2O$

5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)-amino-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared as follows :

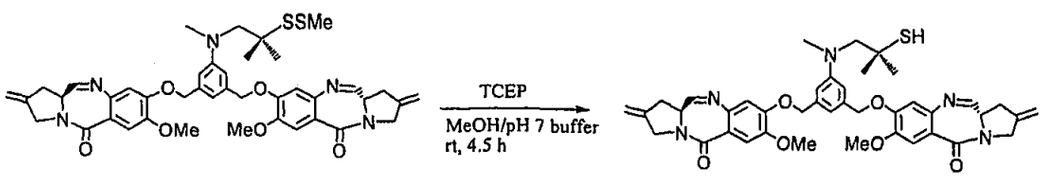


To a solution of 5-Nitro-*m*-xylene-α,α'-diol (890 mg, 5.4 mmol) in methanol (50 mL) was added Pd/C (10%, 287 mg). A hydrogen atmosphere was introduced and the mixture was hydrogenated under pressure (H_2, 5~8 psi) for 5 hours at room temperature. The solution was filtered through celite and the filtrate was evaporated by rotary evaporation *in vacuo* to give 5-amino-*m*-xylene-α,α'-diol, which was then dissolved in THF (10 mL)/DMF (15 ml). 4-methyldithio-4,4-dimethyl butanoic acid (1.05 g, 5.4 mmol) dissolved in THF (5 ml) was added at room temperature followed by the addition of 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (2.1 g, 10.8 mmol) and 4-dimethylamino pyridine (66 mg, 0.54 mmol). The obtained mixture was stirred at room temperature overnight then quenched with 10% ammonium chloride, extracted with ethylacetate, washed and dried. It was filtered and the solvents were removed by rotary evaporation *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2/MeOH, 15:1, 10:1, 7:1) to furnish 5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)-amino-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene as a white solid (729 mg).

MS (ESI): m/z=352.1 MNa^+

^1H NMR (400 Hz, $CDCl_3$-d1, in δ ppm): 7.47 (s, 2H), 7.10 (s, 1H), 4.58 (s, 4H), 2.52-2.47 (m, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.02-1.98 (m, 2H), 1.34 (s, 6H).

• Example 17 : 8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-mercapto-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared as follows :



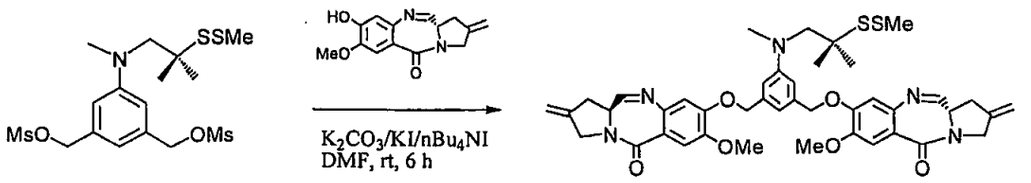
To a suspension of Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP, 64 mg, 0.22 mmol) in water (0.05 mL) was added saturated sodium bicarbonate (~0.7 mL) dropwise to adjust the pH to 6~7. A phosphate buffer (pH 7.0, 10 mM, Na_2HPO_4/H_3PO_4, 0.8 mL) was then added to it. This obtained TCEP solution was added to a mixture of 8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (35 mg, 0.045 mmol) in methanol (5 mL) and stirred at room temperature for 4.5 hours. The reaction was quenched with a phosphate buffer (pH 6.5) and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and the solvents were removed under reduced pressure to give a white solid. The solid was dissolved in dichloromethane/MeOH (2:1) and evaporated again. Dichloromethane was added and evaporated. The residue was high vacuumed and purified by reverse phase C18 column {CH_3CN/H_2O, the solid was dissolved in CH_3CN/H_2O (3:1, 2 mL) and stirred for 30 minutes before loading on column} to furnish 8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-mercapto-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (10.5 mg, y = 32%) as a white solid (method H).

MS (ESI): m/z=758.2 MNa^+

m/z=776.2 $MNa^+ + H_2O$

m/z=794.3 $MNa^+ + 2H_2O$

8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared as follows :

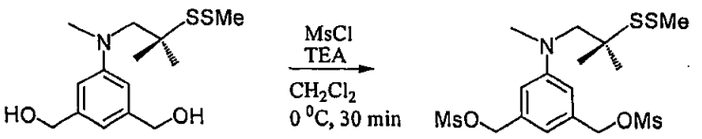


To a solution of 5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-bis-(mesyloxymethyl)-benzene (105 mg, 0.23 mmol) in anhydrous DMF (2.5 mL) was added 8-hydroxy-7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one (119 mg, 0.46 mmol), potassium carbonate powder (127 mg, 0.92 mmol), potassium iodide powder (20 mg, 0.12 mmol) and tetrabutylammonium iodide (17 mg, 0.046 mmol) at room temperature. After the mixture was stirred for 1.5 hours, the second portion of 8-hydroxy-7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one was added (23 mg, 0.089 mmol). The solution continued to stir at room temperature for 4.5 hours. The reaction was then quenched with water and diluted with dichloromethane. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with brine, and dried over anhydrous sodium sulfate. The solution was filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure, then submitted to high vacuum to remove the residual DMF. The residue was suspended in CH_3CN/H_2O (10:1) and filtered. The filtrate was evaporated and the crude product was purified by reverse phase C18 column (CH_3CN/H_2O) to furnish 8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)-amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (39 mg) as a white solid (method H).

MS (ESI): m/z=804.2 MNa^+
m/z=822.2 $MNa^+ + H_2O$
m/z=840.2 $MNa^+ + 2H_2O$

^1H NMR (400 Hz, $CDCl_3$-d1, in δ ppm): 7.64 (bs, 2H), 7.50 (s, 2H), 6.83-6.76 (m, 5H), 5.18-5.10 (m, 8H), 4.27 (s, 4H), 3.95 (s, 6H), 3.90-3.84 (m, 3H), 3.51 (s, 2H), 3.13-3.07 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.94-2.90 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.30 (s, 6H)

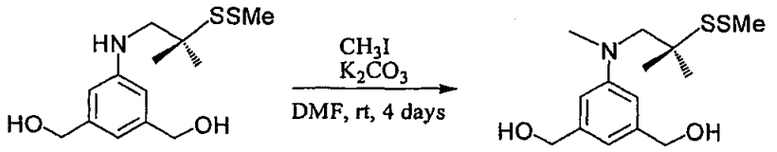
5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-bis-(mesyloxymethyl)-benzene may be prepared as follows :



To a solution of 5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene (135 mg, 0.45 mmol) in anhydrous dichloromethane (3 mL) was added triethylamine (153 µL, 1.1 mmol) followed by methanesulfonyl chloride (87 µL, 1.1 mmol) dropwise over 10 minutes at -2 °C. The solution was stirred at 0 °C for another 30 minutes and was then quenched with ice/water. The mixture was extracted with cold dichloromethane and the combined dichloromethane layers were washed with cold water, and dried over anhydrous sodium sulfate. It was then filtered and the filtrate was evaporated by rotary evaporation *in vacuo*. The residue was purified by a preparative TLC plate (hexanes/ethylacetate, 1:1.5) to furnish 5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-bis-(mesyloxymethyl)-benzene as a colorless oil (105 mg)

MS (ESI): m/z=480.0 MNa^+

5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared as follows :

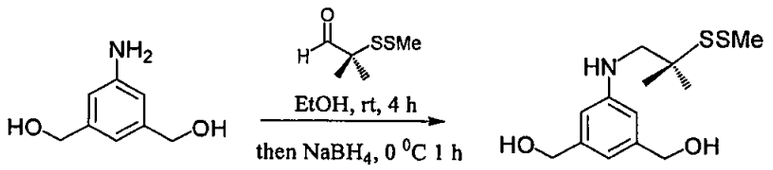


To a solution of 5-(N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene (226 mg, 0.78 mmol) in DMF (4 mL) was added iodomethane (149 µL, 2.4 mmol) followed by potassium carbonate powder (108 mg, 0.78 mmol). After stirring at room temperature for 4 days the mixture was quenched with saturated ammonium chloride and then diluted with dichloromethane. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate. The solution was filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was purified

by flash chromatography (hexanes/ethylacetate, 1:2) to furnish 5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene as colorless foam (152 mg)
MS (ESI): m/z=324.1 MNa^+

^1H NMR (400 Hz, $CDCl_3$-d1, in δ ppm): 6.70 (s, 2H), 6.66 (s, 1H), 4.06 (s, 4H), 3.54 (s, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 1.37 (s, 6H)

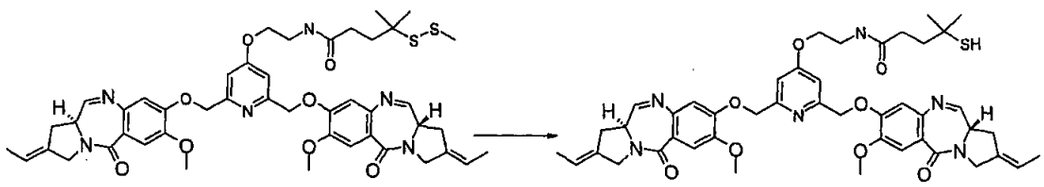
5-(N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared as follows :



To a solution of 5-amino-1,3-bis-hydroxylmethyl-benzene (765 mg, 5 mmol) in absolute ethanol (25 mL) was added 2-(methyldithio)-isobutyraldehyde (751 mg, 5 mmol). After stirring at room temperature for 4 hours the solution was cooled to 0 °C with an ice/water bath and sodium borohydride (220 mg, 5.8 mmol) was added. The mixture continued to stir at 0 °C for one hour and then was quenched with cold 5% hydrochloric acid and diluted with dichloromethane. Saturated sodium bicarbonate was added to make the solution slightly basic. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate. The solution was filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (CH_2Cl_2/MeOH, 15:1, 10:1) to furnish 5-(N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene as colorless oil (832 mg)
MS (ESI): m/z=310.0 MNa^+

Example 18 :

8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-methyl)-pentanamido-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared as follows :



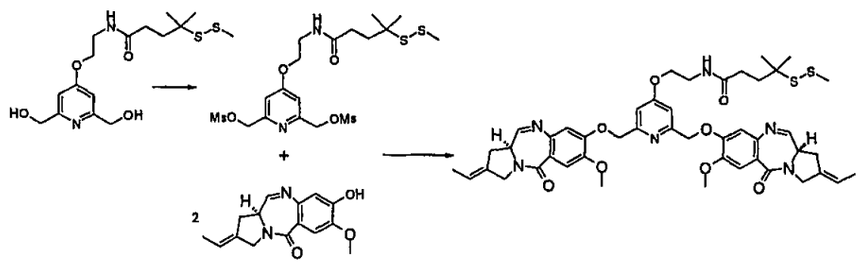
To a solution of 8,8'-[(4-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (60mg) in methanol (1.6 mL) was added DMF (0.2mL) and a solution of tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (48 mg) in water 0.2mL. The reaction mixture was stirred for 18h at room temperature and the solvent was removed in vacuo to give a residue that was purified by silica gel chromatography (Merck SuperVarioFlash 10g column, Si60 15-40µm), using gradient elution with a mixture of methanol (A) / dichloromethane / acetonitrile 9:1 (B), (gradient : 100% B down to 10% A : 90% B) to give 8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-methyl)-pentanamido-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (17mg) :

LC/MS (Method A1, ZQ) : ES : m/z=855 $MH^+ + H_2O$

m/z=837 MH^+

Retention time = 3.70 minutes

8,8'-[(4-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared as follows :



To a cooled (0°C) solution of 4-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine (360 mg) and triethylamine (810 µL) in dichloromethane (4 mL), was added a solution of methanesulfonyl chloride (298 µL) in dichloromethane (4 mL). After 2 hours, water was added. The layers were separated, and the aqueous layer was extracted twice dichloromethane. The combined organic solutions were dried over magnesium sulfate, and concentrated in vacuo to a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Interchrom Puriflash 20g column, SiOH 15-35 µm), using gradient elution with a mixture of methanol (A) / dichloromethane (B), (gradient: 100% B down to 3%A : 97%B) to give 280 mg of mesylate compound.

To a solution of pre-tomaymycin (120 mg) in dimethylformamide (4 mL) was added potassium carbonate (244 mg), potassium iodide (147 mg) and a sample of the mesylate compound (137 mg). The reaction mixture was stirred for 20 h at 30°C. Water (20 mL) was added and the resulting solid was filtered, washed with water and dried in vacuo to give a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Interchrom Puriflash 20g column, SiOH 15-35 µm), using gradient elution with a mixture of methanol (A) / dichloromethane (B), (gradient : 100% B down to 6%A : 94%B) to give crude compound, which was dissolved in water / acetonitrile 1:1 then concentrated in vacuo to give 8,8'-[(4-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (120 mg):

LC/MS (Method A1, ZQ) : ES : m/z=919 $MH^+ + 2\ H_2O$

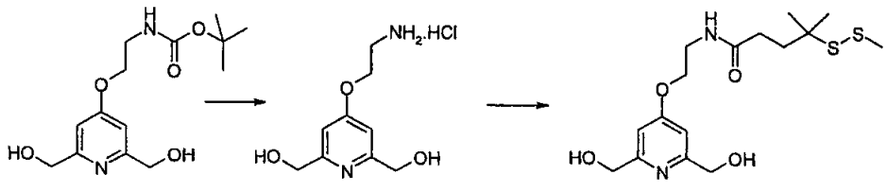
m/z=901 $MH^+ + H_2O$

m/z=883 MH^+

Retention time = 3.82 minutes

^{1}H N.M.R. (500 MHz, CDCl3-d1, δ in ppm) : δ = 1,28 (s, 6H) ; 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 1,94 (m, 2H) ; 2,29 (m, 2H) ; 2,39 (s, 3H) ; 2,97 (m, 4H) ; from 3,50 to 4,20 (m, 6H) ; 4,00 (s, 6H) ; 4,27 (s, 4H) ; 5,27 (m, 4H) ; 5,61 (m, 2H) ; 5,87 (t broad, J = 5,5 Hz, 1H) ; 6,83 (s, 2H) ; 6,97 (s, 2H) ; 7,55 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H) .

4-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine may be prepared as follows :



To a solution of 4-(2-tert-butoxycarbonylamino-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine (656 mg) in dioxane (3.5 mL) was added a solution of hydrochloric acid 4N in dioxane (5.5 mL). After 20h at room temperature, the reaction mixture was concentrated in vacuo to a residue (603 mg).

To a solution of a sample of the previous residue (150 mg) in dimethylformamide (3.5 mL) was added triethylamine (267 µL), 4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoic acid (149 mg), N,N'-diisopropylcarbodiimide (119 µL) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (49 mg). After 15 h at room temperature, water was added to the reaction mixture and the aqueous solution was extracted three times with ethyl acetate. The combined organic solutions were washed with a saturated sodium chloride aqueous solution, dried over magnesium sulfate and concentrated in vacuo to a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Interchrom Puriflash 20g column, SiOH 15-35 µm), using gradient elution with a mixture of methanol (A) / dichloromethane (B), (gradient : 100% B down to 10%A : 90%B) to give 4-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine (81 mg):

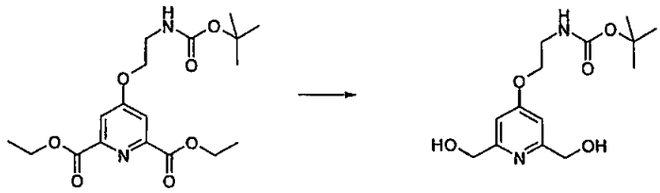
LC/MS (Method A3) : ES m/z=375 MH^+

m/z=156 $C_7H_{10}NO_3^+$

Retention time = 2.2 minutes

^{1}H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,22 (s, 6H) ; 1,79 (m, 2H) ; 2,19 (m, 2H) ; 2,39 (s, 3H) ; 3,43 (q, J = 5,5 Hz, 2H) ; 4,06 (t, J = 5,5 Hz, 2H) ; 4,45 (d broad, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,33 (d, J = 6,0 Hz, 2H) ; 6,84 (s, 2H) ; 8,13 (t broad, J = 5,5 Hz, 1H) .

4-(2-tert-butoxycarbonylamino-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine



4-(2-tert-butoxycarbonylamino-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl) pyridine, starting with 4-(2-tert-Butoxycarbonylamino-ethoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester :

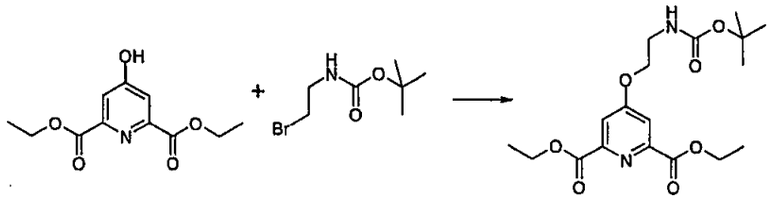
LC/MS (Method A3) : ES m/z=299 MH^+

m/z=156 $C_7H_{10}NO_3^+$

Retention time = 1.7 minutes

^{1}H N.M.R. (300 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,39 (s, 9H) ; 3,32 (m partially masked, 2H) ; 4,03 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 4,46 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,30 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 6,83 (s, 2H) ; 7,00 (t broad, J = 6,0 Hz, 1H) .

4-(2-tert-Butoxycarbonylamino-ethoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester



4-(2-tert-Butoxycarbonylamino-ethoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(3-tert-

butoxycarbonylamino-propoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester, using 2-tert-butoxycarbonylamino-ethyl bromide :

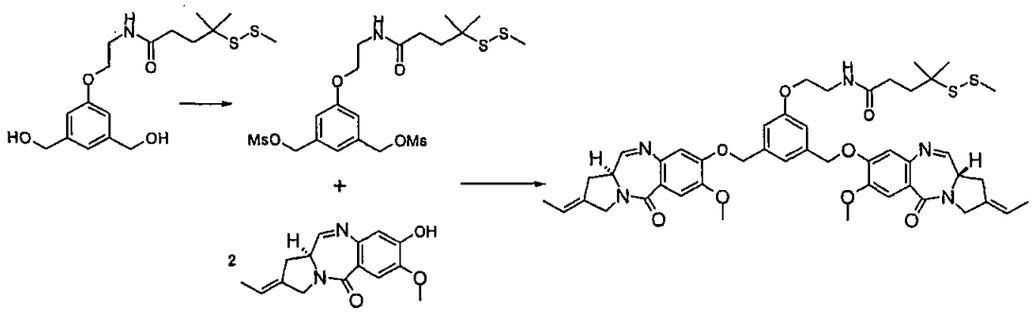
LC/MS (Method A3) : ES m/z=383 MH^+
m/z=240 $C_{11}H_{14}NO_5^+$

Retention time = 3.6 minutes

^{1}H N.M.R. (300 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,23 (t, J = 7,0 Hz, 6H) ; 1,37 (s, 9H) ; 3,33 (m partially masked, 2H) ; 4,22 (t, J = 5,5 Hz, 2H) ; 4,38 (q, J = 7,0 Hz, 4H) ; 7,01 (t broad, J = 5,5 Hz, 1H) ; 7,71 (s, 2H) .

Example 19 :

8,8'-[(1-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



8,8'-[(1-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[(4-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one], starting with 1-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene :

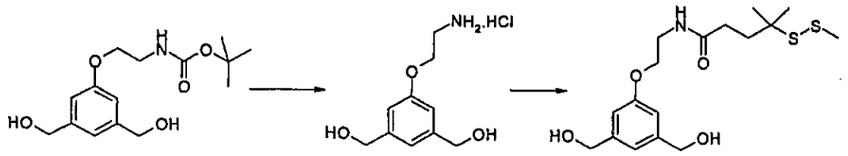
LC/MS (Method A1, Platform I) : ES : m/z=882 MH^+

Retention time = 4.13 minutes

^{1}H N.M.R. (500 MHz, CDCl3-d1, δ in ppm) : 1,30 (s, 6H) ; 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 1,96 (m, 2H) ; 2,31 (m, 2H) ; 2,40 (s, 3H) ; 2,97 (m, 4H) ; 3,66 (m, 2H) ; 3,89 (m, 2H)

; 3,97 (s, 6H) ; 4,04 (t, J = 5,5 Hz, 2H) ; 4,27 (s broad, 4H) ; 5,14 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,19 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,61 (m, 2H) ; 5,93 (t, J = 6,0 Hz, 1H) ; 6,82 (s, 2H) ; 6,94 (s broad, 2H) ; 7,09 (s broad, 1H) ; 7,53 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H) .

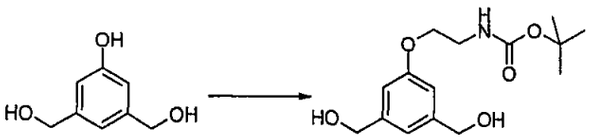
1-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene



1-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine, using 1-(2- tert-butoxycarbonylamino-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene :

^{1}H N.M.R. (400 MHz, CDCl3-d1, δ in ppm) : δ = 1,22 (s, 6H) ; 1,80 (m, 2H) ; 2,20 (m, 2H) ; 2,39 (s, 3H) ; 3,40 (q, J = 6,0 Hz, 2H) ; 3,95 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 4,44 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,11 (t broad, J = 6,0 Hz, 2H) ; 6,73 (s broad, 2H) ; 6,84 (s broad, 1H) ; 8,09 (t broad, 1H) .

1-(2- tert-butoxycarbonylamino-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene



1-(2- tert-butoxycarbonylamino-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared following the procedure for the preparation of 5-(3-phtalimido-propoxy)-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene, using 2-tert-butoxycarbonylamino-ethyl bromide :

LC/MS (Method A3) : ES m/z=298 MH^+
m/z=242 $(M + 2H - tBu)^+$
m/z=224 $(m/z=242 - H_2O)^+$
m/z=206 $(m/z=224 - H_2O)^+$

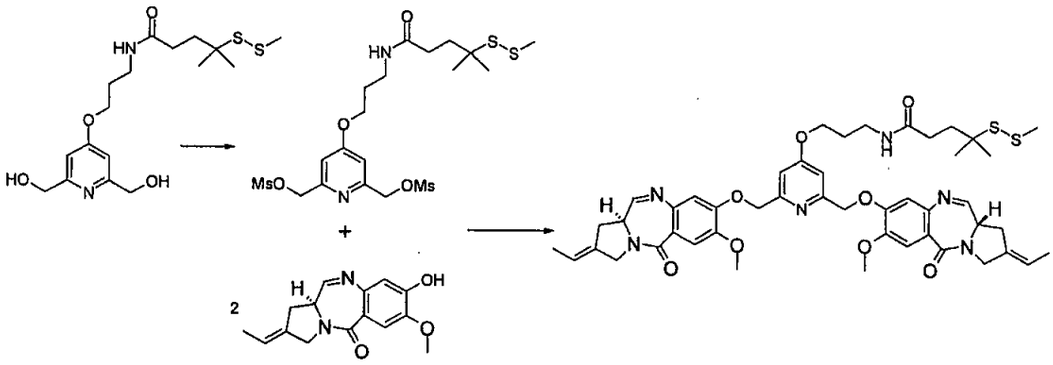
m/z=162 $(m/z=206 - CO_2)^+$

Retention time = 2.7 minutes

^{1}H N.M.R. (500 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,39 (s, 9H) ; 3,28 (q, J = 6,0 Hz, 2H) ; 3,91 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 4,44 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,14 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 6,72 (s broad, 2H) ; 6,83 (s broad, 1H) ; 7,01 (t broad, J = 7,0 Hz, 1H) .

Example 20 :

8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one] may be prepared as follows :



To a cooled (0°C) solution of 4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine (55 mg) and triethylamine (99 µL) in dichloromethane (2 mL), was added methanesulfonyl chloride (36 µL). After 30 minutes, water was added. The layers were separated, and the aqueous layer was extracted twice with dichloromethane. The combined organic solutions were dried over magnesium sulfate, and concentrated in vacuo to a residue (95 mg).

To a stirred solution of pre-tomaymycin (50 mg) in dimethylformamide (0.75 mL), were added potassium carbonate (114 mg), a solution of the previous residue (55 mg) in dimethylformamide (1 mL) and potassium iodide (46 mg). The reaction was stirred for 20 h at 30°C. Solids were filtered off and washed with dimethylformamide. Water was added to the combined dimethylformamide solution and formic acid was added until complete dissolution of the precipitate.

The resulting solution was injected for HPLC purification according to method B. The appropriate fractions were combined and concentrated by centrifugal evaporation over a Jouan Model RC10.10. apparatus to afford 8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one] (13.5mg).

LC/MS (Method A3) : ES m/z=897 MH^+

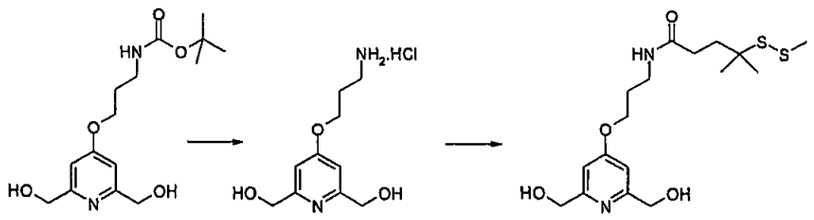
m/z=664 $(M - C_{10}H_{20}NOS_2 + 2H)^+$

m/z=234 $C_{10}H_{20}NOS_2^+$

Retention time = 3.7 minutes

^1H N.M.R. (500 MHz, CD3COOD-d4, δ in ppm) : δ = 1,25 (s, 6H) ; from 1,60 to 2,20 (m partially masked, 10H) ; 2,35 (m, 5H) ; from 2,80 to 4,44 (m, 14H) ; 3,91 (s, 6H) ; 5,40 (s, 4H) ; 5,62 (m, 2H) ; from 6,83 to 7,95 (m, 8H) .

4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine



4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine, using 4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine :

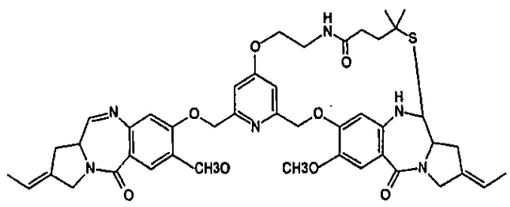
LC/MS (Method A3) : ES m/z=389 MH^+

m/z=234 $(M - C_7H_8NO_3)^+$

m/z=156 $C_7H_{10}NO_3^+$

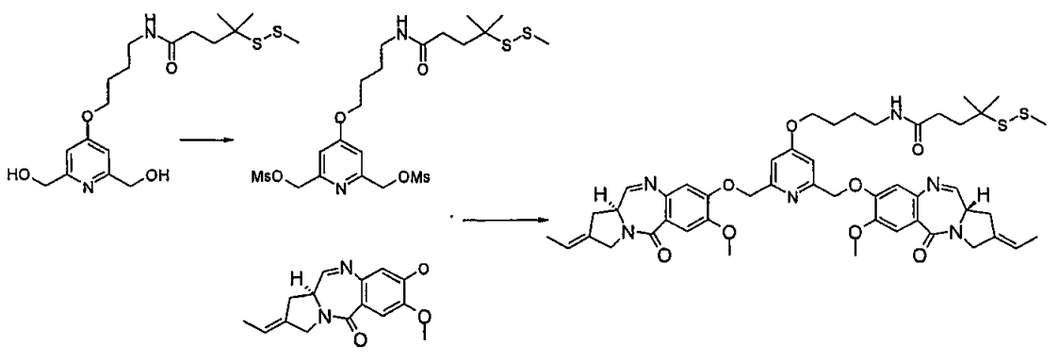
Retention time = 2.3 minutes

The thiol (SH) derivative deriving from compound of example 20 is in equilibrium with the compound of formula :



Example 21:

8,8'-[(4-(4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-butoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



8,8'-[(4-(4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-butoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one], using 4-(4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-butoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine :

LC/MS (Method A1, Platform II) : ES : m/z=947 $MH^+ + 2\ H_2O$

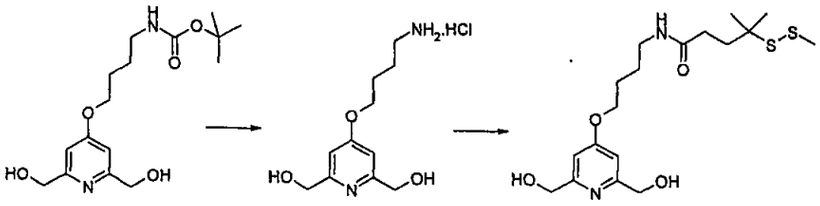
m/z=929 $MH^+ + H_2O$

m/z=911 MH^+

Retention time = 3.74 minutes

^{1}H N.M.R. (500 MHz, CD3COOD-d4, δ in ppm) : δ = 1,26 (s, 6H) ; from 1,59 to 1,76 (m, 8H) ; from 1,81 to 1,94 (m, 4H) ; 2,35 (m, 5H) ; from 2,80 to 4,40 (m, 14H) ; 3,92 (s, 6H) ; 5,39 (m, 4H) ; 5,50 (m, 2H) ; from 6,72 to 7,95 (m, 8H) .

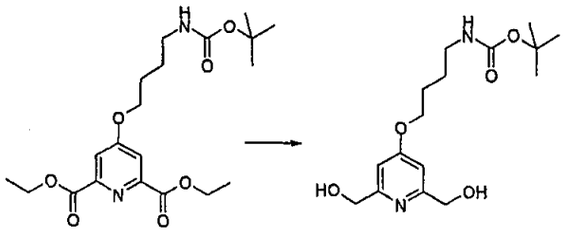
4-(4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-butoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine



4-(4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-butoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine, using 4-(4-tert-Butoxycarbonylamino-butoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine :

LC/MS (Method A3) : ES m/z=403 MH^+
m/z=248 $(M - C_7H_8NO_3)^+$
m/z=156 $C_7H_{10}NO_3^+$
Retention time = 2.3 minutes

4-(4-tert-Butoxycarbonylamino-butoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine



4-(4-tert-Butoxycarbonylamino-butoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl) pyridine, starting with 4-(4-tert-Butoxycarbonylamino-butoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester:

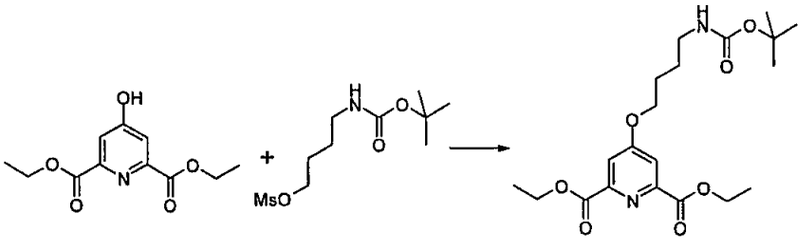
LC/MS (Method A3) : ES m/z=411 MH^+

m/z=355 $(M + 2H - tBu)^+$

m/z=240 $C_{11}H_{14}NO_5^+$

Retention time = 3.9 minutes

4-(4-tert-Butoxycarbonylamino-butoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester



4-(4-tert-Butoxycarbonylamino-butoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester, using methane sulfonic acid 4-tert-butoxycarbonylamino-butyl ester (Cazenave Gassiot, A.; Charton, J.; Girault-Mizzi, S.; Gilleron, P.; Debreu-Fontaine, M-A.; Sergheraert, C.; Melnyk, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15(21)*, 4828) :

LC/MS (Method A3) : ES m/z=327 MH^+

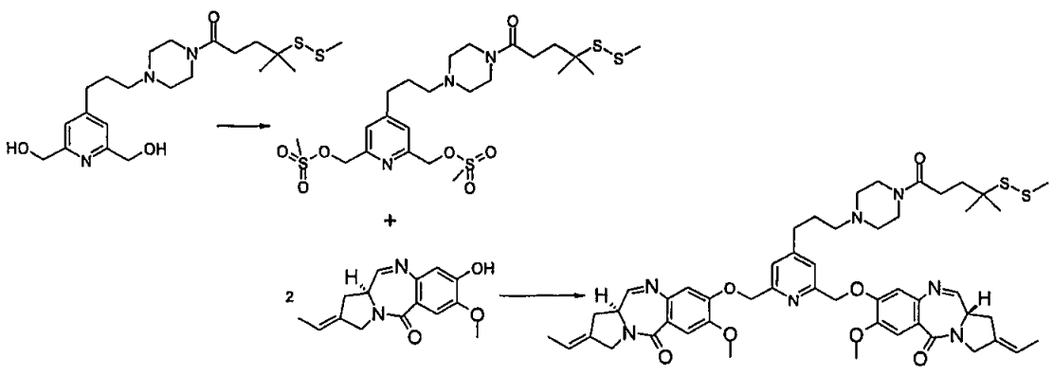
m/z=271 $(M + 2H - tBu)^+$

m/z=156 $C_7H_{10}NO_3^+$

Retention time = 2.0 minutes

Example 22:

8,8'-[(4-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



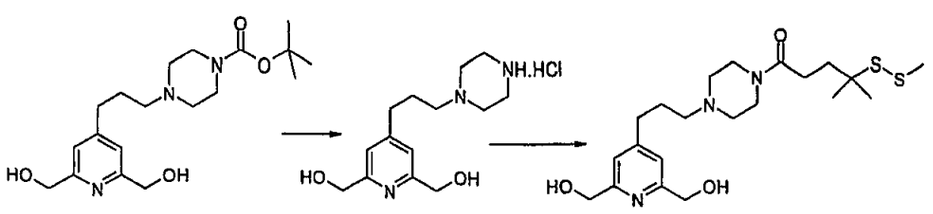
8,8'-[(4-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one], using 4-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine :

LC/MS (Method A1, Platform II) : ES : m/z=950 MH^+

Retention time = 3.32 minutes

^{1}H N.M.R. (500 MHz, CDCl3, δ in ppm) : δ = 1,32 (s, 6H) ; 1,76 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 1,80 (m, 2H) ; 1,94 (m, 2H) ; from 2,27 to 2,46 (m, 11H) ; 2,67 (m, 2H) ; 2,97 (m, 4H) ; from 3,40 to 3,70 (m, 4H) ; 3,90 (m, 2H) ; 4,00 (s, 6H) ; 4,27 (s broad, 4H) ; 5,29 (s broad, 4H) ; 5,60 (q broad, J = 6,5 Hz, 2H) ; 6,86 (s, 2H) ; 7,30 (s, 2H) ; 7,56 (s, 2H) ; 7,65 (d, J = 4,5 Hz, 2H) .

4-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine may be prepared as follows :



To a solution of 4-(3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine (610 mg) in dioxane (10 mL) was added a solution of hydrochloric acid 4N in dioxane (2.5 mL). After 4h at room temperature, the reaction mixture was concentrated in vacuo to a residue (560 mg).

To a solution of a sample of the previous residue (160 mg) in dimethylformamide (2.5 mL) was added N,N-diisopropylethylamine (181 µL), 4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoic acid (158 mg), N,N'-diisopropyl-carbodiimide (88 µL) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (15 mg). After 15 h at room temperature, solids were filtered off and the dimethylformamide solution was injected for HPLC purification according to method F. The appropriate fractions were combined and concentrated by freeze-drying to afford 4-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine (105 mg) :

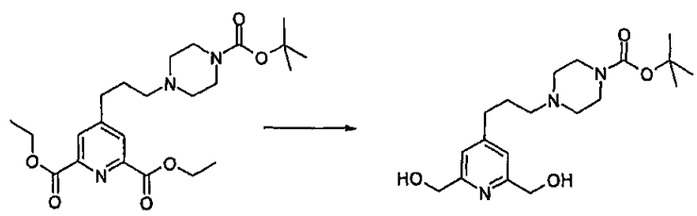
LC/MS (Method A3) : ES m/z=442 MH^+

m/z=266 $(M + 2H - C_7H_{13}OS_2)^+$

Retention time = 2.3 minutes

^1H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,27 (s, 6H) ; from 1,70 to 1,83 (m, 4H) ; from 2,25 to 2,39 (m, 8H) ; 2,40 (s, 3H) ; 2,63 (m, 2H) ; 3,43 (m, 4H) ; 4,49 (s, 4H) ; 5,28 (m broad, 2H) ; 7,18 (s, 2H) .

4-(3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine



4-(3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine

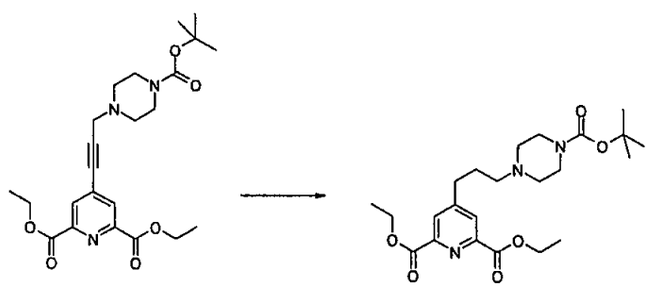
may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl) pyridine, starting with 4-

[3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-propyl]-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester:

LC/MS (Method A3) : ES m/z=366 MH^+
m/z=310 $(M + 2H - tBu)^+$
m/z=266 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$
Retention time = 0.5 minutes

^1H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,39 (s, 9H) ; 1,73 (m, 2H) ; 2,29 (m, 6H) ; 2,61 (m, 2H) ; 3,30 (m partially masked, 4H) ; 4,49 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,30 (t broad, J = 6,0 Hz, 2H) ; 7,18 (s, 2H) .

4-[3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-propyl]-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester

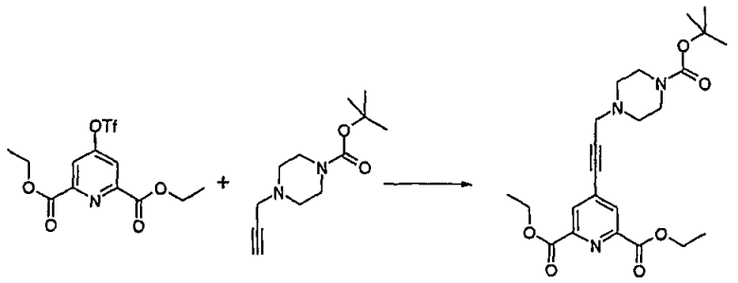


4-[3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-propyl]-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester may be prepared following the procedure for the preparation of 5-(3-tert-butoxycarbonyl-N-methyl-amino-propyl)-benzene-1,3-dicarboxylic acid diethyl ester, starting with 4-[3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-prop-1-ynyl]-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester :

LC/MS (Method A3) : ES m/z=450 MH^+
m/z=394 $(M + 2H - tBu)^+$
m/z=350 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$
Retention time = 2.4 minutes

^1H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,35 (t, J = 7,0 Hz, 6H) ; 1,39 (s, 9H) ; 1,79 (m, 2H) ; 2,27 (m, 6H) ; 2,80 (m, 2H) ; 3,29 (m, 4H) ; 4,39 (q, J = 7,0 Hz, 4H) ; 8,12 (s, 2H) .

4-[3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-prop-1-ynyl]-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester

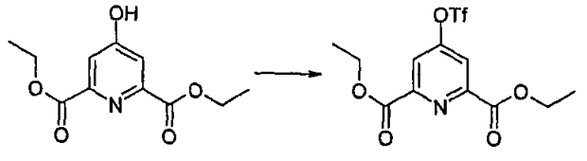


4-[3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-prop-1-ynyl]-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester may be prepared following the procedure for the preparation of 5-(3-tert-butoxycarbonyl-N-methyl-amino-propyn-1-yl)-benzene-1,3-dicarboxylic acid diethyl ester, starting with 4-trifluoromethanesulfonyloxy-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester and tert-butyl-4-propargyl-piperazine-1-carboxylate (Zheng, H.; Weiner, L.M.; Bar-Am, O.; Epsztejn, S.; Cabantchik, Z.I.; Warshawsky, A.; Youdim, M.B.H. ; and Fridkin, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *3*, 773)

EI (Method C)	m/z=445	$M^{+\cdot}$
	m/z=388	$(M - C_4H_9)^+$
	m/z=344	$(m/z=388 - CO_2)^+$
	m/z=57	$C_4H_9^+$

^{1}H N.M.R. (400 MHz, CDCl3-d1, δ in ppm) : δ = 1,46 (t, J = 7,0 Hz, 6H) ; 1,48 (s, 9H) ; 2,60 (m broad, 4H) ; 3,52 (m broad, 4H) ; 3,62 (s broad, 2H) ; 4,49 (q, J = 7,0 Hz, 4H) ; 8,23 (s, 2H) .

4-trifluoromethanesulfonyloxy-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester may be prepared as follows :



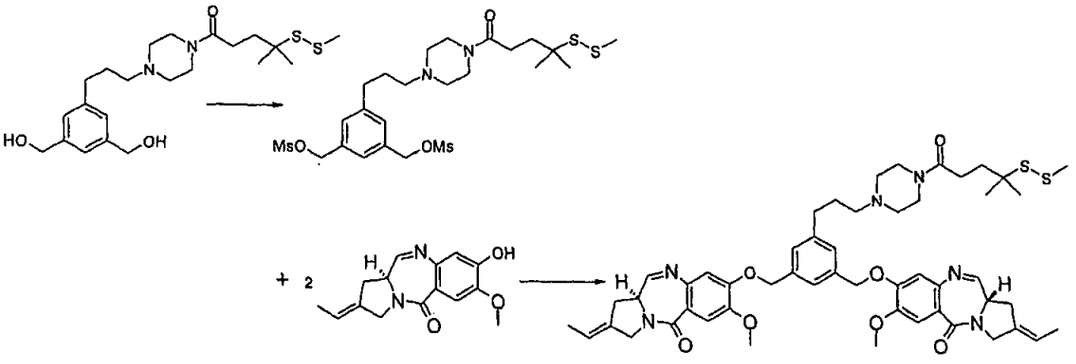
To a cooled (0°C) solution of chelidamic acid diethyl ester (Chaubet, F.; Nguyen van duong, M.; Gref, A.; Courtieu, J.; Crumbliss, A.L.; Gaudemer, A. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31(40)*, 5729-5732) (3.5 g) in pyridine (35 mL), was

added dropwise trifluoromethanesulfonyl chloride (2.6 mL). The reaction was then stirred at room temperature for 3 hours. Water and ethyl acetate were added. The layers were separated, and the aqueous layer was extracted twice ethyl acetate. The combined organic solutions were dried over magnesium sulfate, and concentrated in vacuo to a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Merck SuperVarioPrep 90g column, Si60 15-40μm), eluted with dichloromethane to give 4-trifluoromethanesulfonyloxy-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester (4.2g).

LC/MS (Method A1, Platform I) : ES m/z=372 MH^+
Retention time = 4.38 minutes

Example 23 :

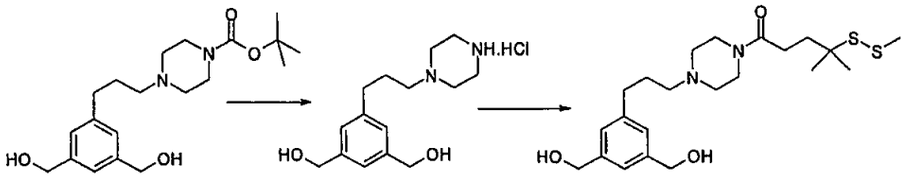
8,8'-[(1-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



8,8'-[(1-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-benzene -3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one], using 1-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene :

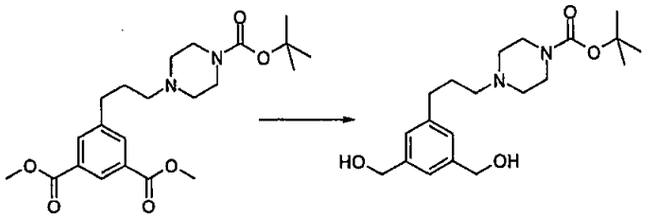
LC/MS (Method A3) : ES m/z=949 MH^+
m/z=475,3 $(M + 2H)^{2+}$ /2
Retention time = 3.3 minutes

1-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene



1-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine, starting with 1-(3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-propyl)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene :
LC/MS (Method A3) : ES m/z=441 MH^+
Retention time = 2.4 minutes
^{1}H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,26 (s, 6H) ; 1,71 (m, 2H) ; 1,79 (m, 2H) ; from 2,22 to 2,40 (m, 8H) ; 2,39 (s, 3H) ; 2,58 (m, 2H) ; 3,44 (m, 4H) ; 4,45 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,09 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 7,00 (s broad, 2H) ; 7,08 (s broad, 1H) .

1-(3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-propyl)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene



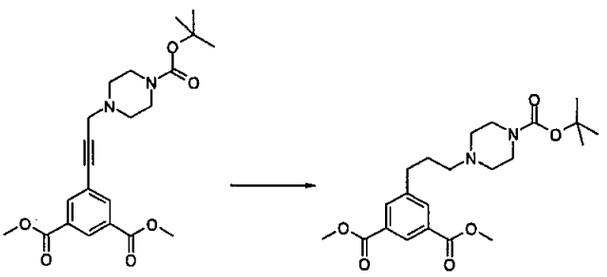
1-(3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-propyl)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared following the procedure for the preparation of 5-(3-tert-butoxycarbonyl-N-methyl-amino-propyl)-1,3-bis-(hydroxymethyl)-benzene,

starting with 5-[3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-propyl]-isophthalic acid dimethyl ester:

LC/MS (Method A3) : ES m/z=365 MH^+
m/z=309 $(M + 2H - tBu)^+$
Retention time = 2.0 minutes

^1H N.M.R. (300 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,39 (s, 9H) ; 1,71 (m, 2H) ; 2,28 (m, 6H) ; 2,57 (m, 2H) ; 3,29 (m partially masked, 4H) ; 4,44 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,08 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 7,00 (s broad, 2H) ; 7,08 (s broad, 1H) .

5-[3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-propyl]-isophthalic acid dimethyl ester

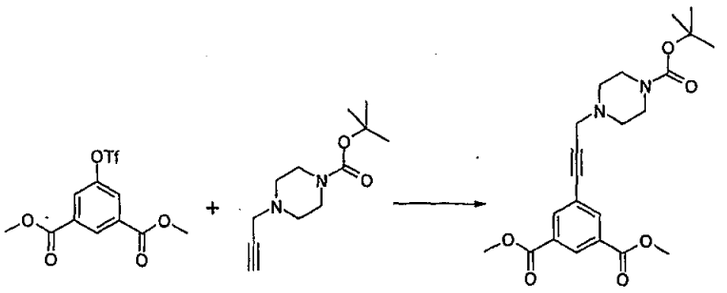


5-[3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-propyl]-isophthalic acid dimethyl ester may be prepared following the procedure for the preparation of 5-(3-tert-butoxycarbonyl-N-methyl-amino-propyl)-benzene-1,3-dicarboxylic acid diethyl ester, starting with 5-[3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-prop-1-ynyl]-isophthalic acid dimethyl ester:

LC/MS (Method A3) : ES m/z=421 MH^+
m/z=365 $(M + 2H - tBu)^+$
m/z=321 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$
Retention time = 2.7 minutes

^1H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,39 (s, 9H) ; 1,74 (m, 2H) ; 2,28 (m, 6H) ; 2,75 (m, 2H) ; 3,30 (m partially masked, 4H) ; 3,89 (s, 6H) ; 8,08 (d, J = 2,0 Hz, 2H) ; 8,32 (t, J = 2,0 Hz, 1H) .

5-[3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-prop-1-ynyl]-isophthalic acid dimethyl ester



5-[3-(4-tert-Butoxycarbonyl-piperazin-1-yl)-prop-1-ynyl]-isophthalic acid dimethyl ester may be prepared following the procedure for the preparation of 5-(3-tert-butoxycarbonyl-N-methyl-amino-propyn-1-yl)-benzene-1,3-dicarboxylic acid diethyl ester, starting with tert-butyl-4-propargyl-piperazine-1-carboxylate :

LC/MS (Method A3) : ES m/z=417 MH^+

m/z=361 $(M + 2H - tBu)^+$

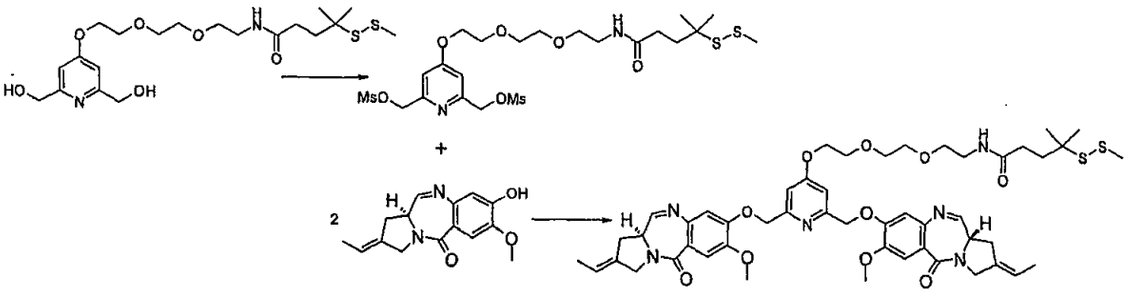
m/z=317 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$

Retention time = 3.1 minutes

^1H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,40 (s, 9H) ; 2,50 (m masked, 4H) ; 3,35 (m, 4H) ; 3,61 (s, 2H) ; 3,90 (s, 6H) ; 8,14 (s broad, 2H) ; 8,40 (s broad, 1H) .

Example 24 :

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared

following the procedure for the preparation of 8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one], using 4-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine :

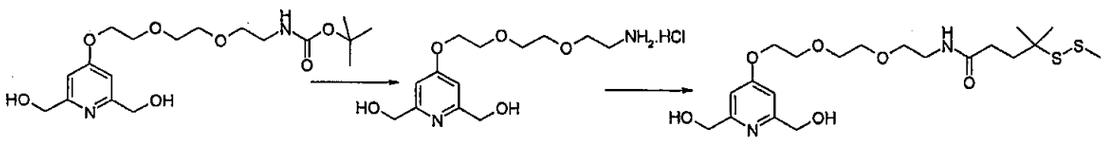
LC/MS (Method A3) : ES m/z=971 MH^+

m/z=486,3 $(M + 2H)^{2+}$ /2

Retention time = 3.60 minutes

^1H N.M.R. (500 MHz, CDCl3-d1, δ in ppm) : δ = 1,28 (s, 6H) ; 1,76 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 1,94 (m, 2H) ; 2,26 (m, 2H) ; 2,40 (s, 3H) ; 2,98 (m, 4H) ; from 3,36 to 3,95 (m, 12H) ; 4,00 (s, 6H) ; 4,18 (m, 2H) ; 4,28 (s broad, 4H) ; 5,27 (m, 4H) ; 5,61 (m, 2H) ; 5,97 (m broad, 1H) ; 6,84 (s, 2H) ; 7,01 (s broad, 2H) ; 7,56 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

4-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine



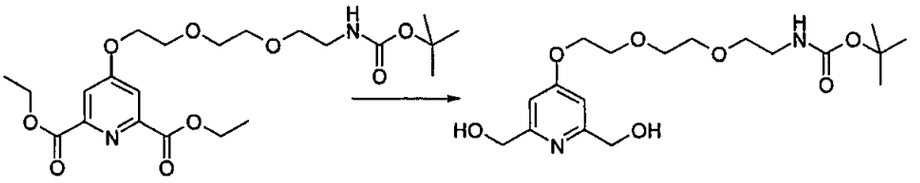
4-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine, starting with 4-(2-{2-[2-tert-butoxycarbonylamino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine :

LC/MS (Method A3) : ES m/z=463 MH^+

Retention time = 2.3 minutes

^1H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,22 (s, 6H) ; 1,79 (m, 2H) ; 2,15 (m, 2H) ; 2,39 (s, 3H) ; 3,18 (q, J = 6,0 Hz, 2H) ; 3,40 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 3,52 (m, 2H) ; 3,60 (m, 2H) ; 3,76 (m, 2H) ; 4,18 (m, 2H) ; 4,45 (s, 4H) ; 5,32 (m broad, 2H) ; 6,85 (s, 2H) ; 7,90 (t broad, J = 6,0 Hz, 1H) .

4-(2-{2-[2-tert-butoxycarbonylamino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine



4-(2-{2-[2-tert-butoxycarbonylamino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl) pyridine, starting with 4-(2-{2-[2-tert-butoxycarbonylamino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester :

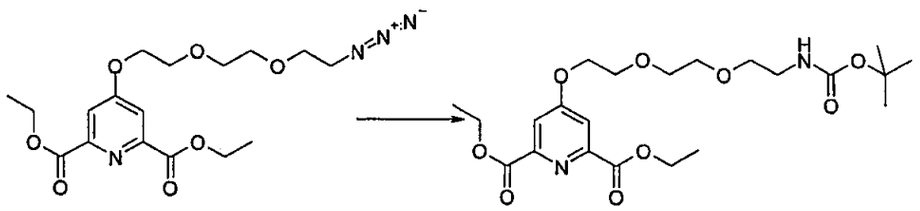
LC/MS (Method A3) : ES m/z=387 MH^+

m/z=331 $(M + 2H - tBu)^+$

Retention time = 2.0 minutes

^1H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,37 (s, 9H) ; 3,07 (q, J = 6,0 Hz, 2H) ; 3,39 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 3,51 (m, 2H) ; 3,59 (m, 2H) ; 3,73 (m, 2H) ; 4,18 (m, 2H) ; 4,45 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,31 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 6,73 (t broad, J = 6,0 Hz, 1H) ; 6,85 (s, 2H) .

4-(2-{2-[2-tert-butoxycarbonylamino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester may be prepared as follows :



To a solution of 4-(2-{2-[2-azido-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester (Roy, B.C.; Santos, M.; Mallik, S.; D. Campiglia, A.D. *J. Org. Chem.* **2003**, *68(10)*, 3999) (900 mg) in ethyl acetate (18 mL) were added di-tert-butyl-dicarbonate (545mg) and palladium 10% on carbon (73 mg). The solution was stirred at room temperature under an hydrogen atmosphere (2 bar) for 18h. The solid was filtered off and solvent was removed in vacuo to a

residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Analogix Super Flash SiO_2 SF25-34g), using gradient elution with a mixture of dichloromethane (A) and methanol (B) (gradient : 100% A down to 97.5% A : 2.5% B) to give 4-(2-{2-[2-tert-butoxycarbonylamino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester (760mg) :

LC/MS (Method A3) : ES m/z=471 MH^+

m/z=415 $(M + 2H - tBu)^+$

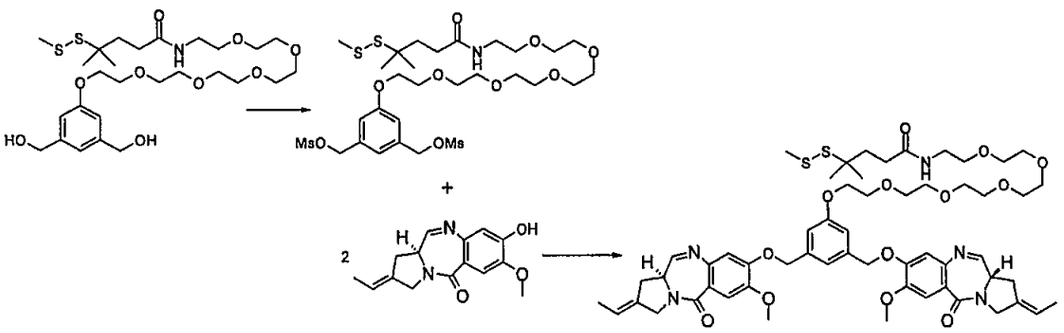
m/z=371 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$

Retention time = 3.6 minutes

^1H N.M.R. (300 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,32 (t, J = 7,0 Hz, 6H) ; 1,36 (s, 9H) ; 3,04 (q, J = 6,0 Hz, 2H) ; 3,38 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 3,51 (m, 2H) ; 3,59 (m, 2H) ; 3,79 (m, 2H) ; 4,25 (m masked, 2H) ; 4,29 (q, J = 7,0 Hz, 4H) ; 6,70 (t broad, J = 6,0 Hz, 1H) ; 7,73 (s, 2H) .

Example 25 :

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-

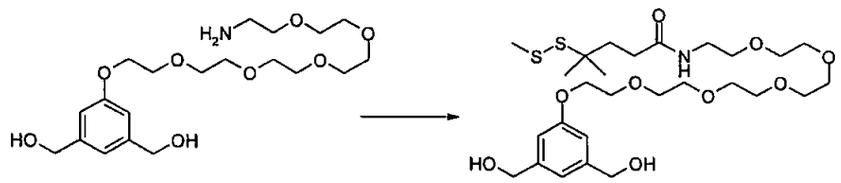
tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one], using 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene :

LC/MS (Method A1, Platform II) : ES : m/z=1102 MH^+

Retention time = 4.49 minutes

^1H N.M.R. (500 MHz, CDCl3-d1, δ in ppm) : δ = 1,30 (s, 6H) ; 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 1,95 (m, 2H) ; 2,28 (m, 2H) ; 2,41 (s, 3H) ; 2,97 (m, 4H) ; from 3,33 to 3,96 (m, 24H) ; 3,96 (s, 6H) ; 4,12 (m, 2H) ; 4,27 (s broad, 4H) ; from 5,07 to 5,24 (m, 4H) ; 5,60 (m, 2H) ; 6,21 (m broad, 1H) ; 6,81 (s, 2H) ; 6,96 (s, 2H) ; 7,07 (s, 1H) ; 7,51 (s, 2H) ; 7,65 (d, J = 4,5 Hz, 2H) .

1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene

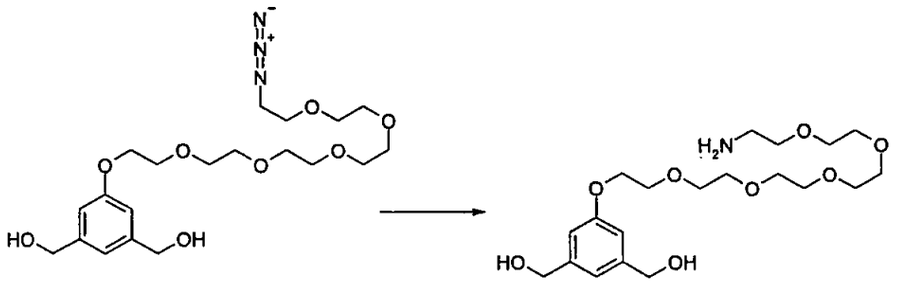


1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared following the procedure for the preparation of 1-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene, starting with 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-amino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene :

LC/MS (Method G1) : ES m/z=594 MH^+

Retention time = 1.9 minutes.

1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-amino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared as follows :

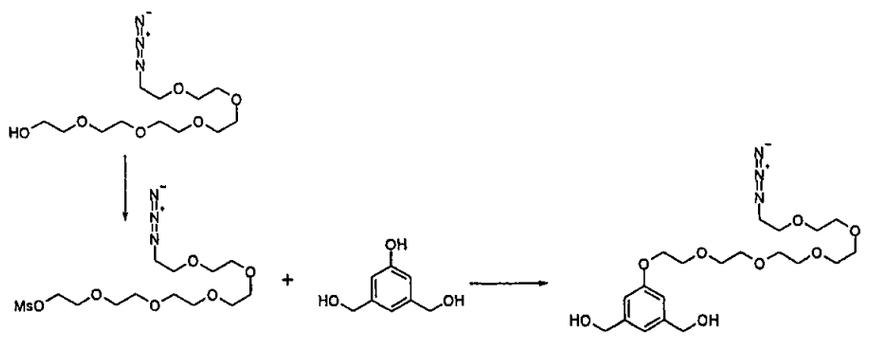


To a solution of 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azido-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene (540 mg) in THF (5.5 mL) were added triphenylphosphine (320 mg) and water (22 µL). The solution was stirred at room temperature for 18h and solvent was removed in vacuo to a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Merck SuperVarioFlash 30g column, Si60 15-40µm, eluted with dichloromethane / methanol 95:5, then dichloromethane / methanol / NH_4OH 75:25:2.5 to give 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-amino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene (430 mg) :

LC/MS (Method A3) : ES : m/z=418 MH^+

Retention time = 1.3 and 1.7 minutes

1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azido-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared as follows :



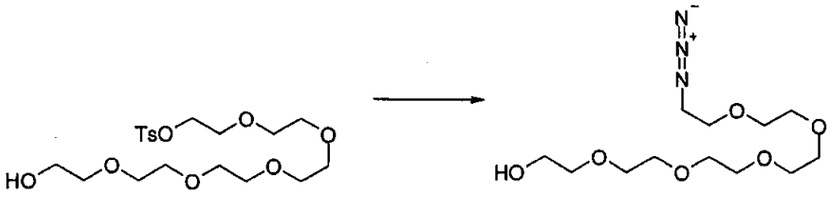
To a cooled (0°C) solution of 2-[2-(2-{2-[2-(2-Azido-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethanol (1.6 g) and triethylamine (1.45 mL) in dichloromethane (40 mL), was added methanesulfonyl chloride (617 µL). After 1 hour, water was

added. The layers were separated and the organic layer was dried over magnesium sulfate, and concentrated in vacuo to a residue (1.83g).

A sample of the residue (1.4g), 3,5-bis-hydroxymethylphenol (510 mg) and potassium carbonate (686 mg) were mixed in dimethylformamide (8mL) and heated at 70°C for 15h. The reaction mixture was cooled to room temperature, water was added and the aqueous solution was extracted three times with ethyl acetate.The combined organic solutions were washed with a saturated sodium chloride aqueous solution, dried over magnesium sulfate and concentrated in vacuo to a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Merck SuperVarioPrep 70g column, Si60 15-40µm), eluted with a mixture of methanol (A) / dichloromethane (B), (gradient : 2%A : 98%B to 10%A : 90%B) to give 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azido-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene (540 mg) :

CI (Method D) : m/z=461 MNH_4^+

2-[2-(2-{2-[2-(2-Azido-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethanol may be prepared as follows :

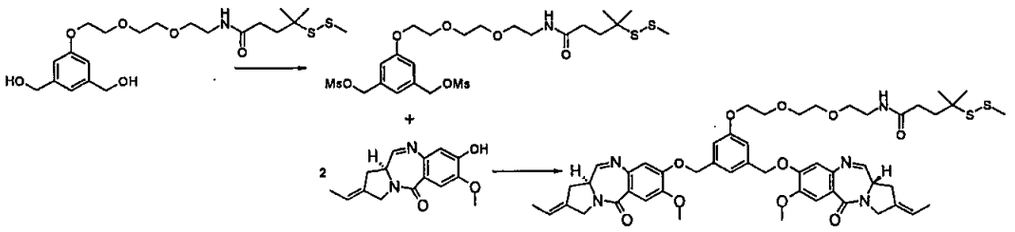


To a solution of 2-[2-(2-{2-[2-(2-tosyloxy-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethanol (Loiseau, F. A. ; Hii, K. K. ; Hill, A. M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 639) (4.5 g) in dimethylformamide (30 mL), was added sodium azide (0.89 g). The solution was stirred at 70°C for 18h and solvent was then removed in vacuo to a residue. Dichloromethane was added and the resulting precipitate was filtered off. The organic layer was concentrated in vacuo to give 2-[2-(2-{2-[2-(2-Azido-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethanol (3.1 g) :

CI (Method D) : m/z=325 MNH_4^+

Example 26 :

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



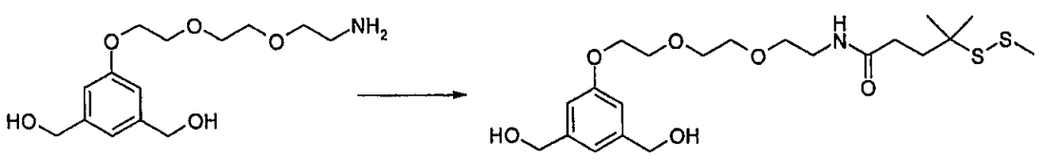
8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one], using 1-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene :

LC/MS (Method A1, Platform II) : ES : m/z=970 MH^+

Retention time = 3.89 minutes

^1H N.M.R. (500 MHz, CDCl3-d1, δ in ppm) : δ = 1,27 (s, 6H) ; 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 1,94 (m, 2H) ; 2,26 (m, 2H) ; 2,40 (s, 3H) ; 2,98 (m, 4H) ; from 3,35 to 3,92 (m, 12H) ; 3,96 (s, 6H) ; 4,15 (m, 2H) ; 4,28 (s broad, 4H) ; from 5,10 to 5,23 (m, 4H) ; 5,60 (q broad, J = 6,5 Hz, 2H) ; 6,05 (t broad, J = 6,0 Hz, 1H) ; 6,81 (s, 2H) ; 6,98 (s, 2H) ; 7,09 (s, 1H) ; 7,53 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H) .

1-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene



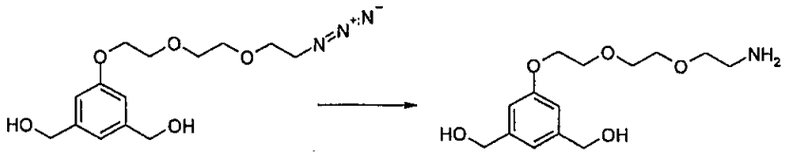
1-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared following the procedure for the preparation of 1-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene, starting with 1-(2-{2-[2-amino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene :

LC/MS (Method A3) : ES : m/z=462 MH^+

m/z=444 $(M + H - H_2O)^+$

Retention time = 3.0 minutes

1-(2-{2-[2-amino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene



1-(2-{2-[2-amino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared following the procedure for the preparation of 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-amino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene, starting with 1-(2-{2-[2-azido-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene :

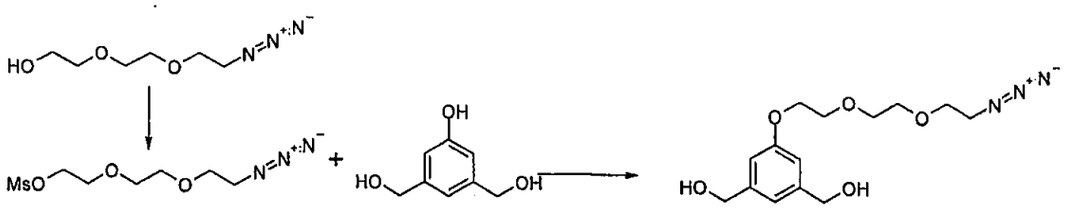
LC/MS (Method A3) : ES : m/z=286 MH^+

m/z=268 $(M + H - H_2O)^+$

Retention time = 0.8 minutes

1-(2-{2-[2-azido-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene

Azido

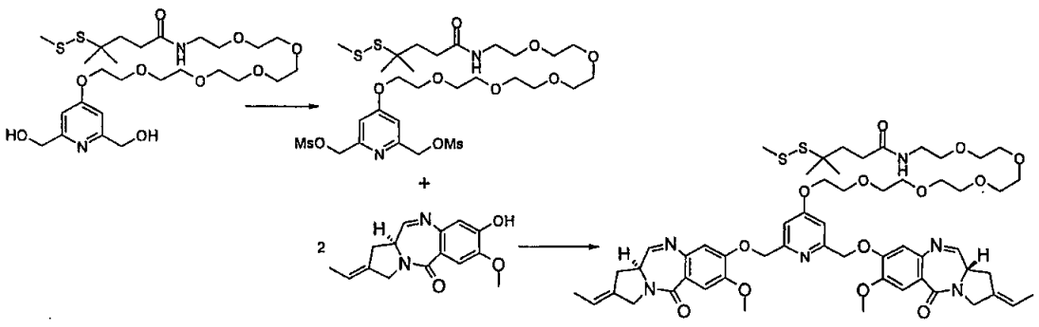


1-(2-{2-[2-azido-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared following the procedure for the preparation of 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azido-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-

benzene, starting with 2-[2-(2-Azido-ethoxy)-ethoxy]-ethanol (Roy, B.C ; Santos, M. ; Mallik, S. ; Campiglia, A.D. *J. Org. Chem.* **2003**, *68(10)*, 3999) :
CI (MethodD) m/z=329 MNH_4^+.

Example 27:

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



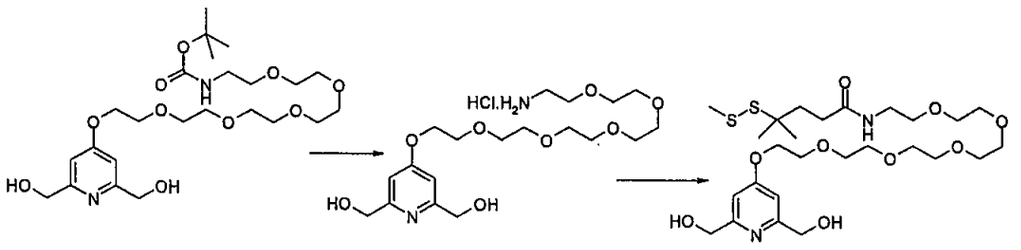
8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one], using 4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine :

LC/MS (Method A3) : ES : m/z=1103 MH^+
m/z=552 $(M + 2H)^{2+}$ /2
Retention time = 3.7 minutes

^1H N.M.R. (500 MHz, CDCl3-d1, δ in ppm) : δ = 1,29 (s, 6H) ; 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 1,94 (m, 2H) ; 2,28 (m, 2H) ; 2,40 (s, 3H) ; 2,97 (m, 4H) ; from 3,33 to 3,95 (m, 24H) ; 3,99 (s, 6H) ; 4,18 (m, 2H) ; 4,28 (s broad, 4H) ; 5,27 (m, 4H) ;

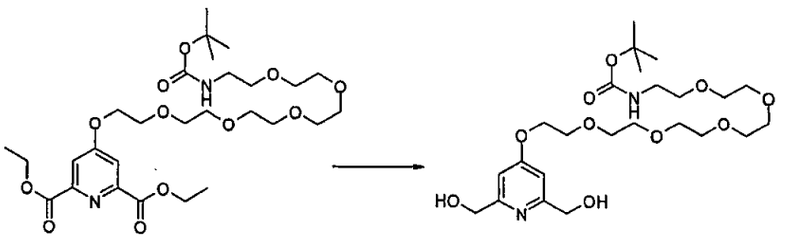
5,60 (m, 2H) ; 6,19 (m broad, 1H) ; 6,82 (s, 2H) ; 7,00 (s broad, 2H) ; 7,55 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H) .

4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine



4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine, starting with 4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-tert-butoxycarbonylamino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine :
LC/MS (Method A3) : ES : m/z=596 MH^+
Retention time = 2.4 minutes

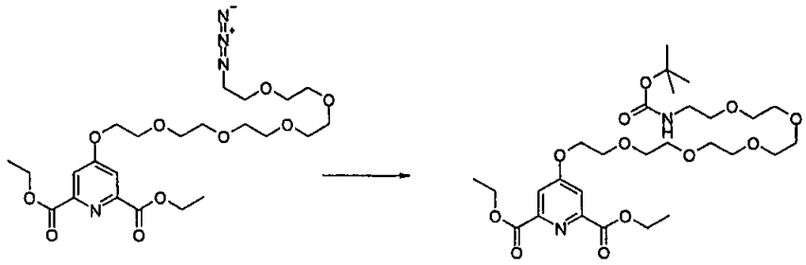
4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-tert-butoxycarbonylamino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine



4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-tert-butoxycarbonylamino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl) pyridine, starting with 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-tert-Butoxycarbonylamino-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester :

LC/MS (Method A3) : ES : m/z=519 MH^+
Retention time = 2.2 minutes

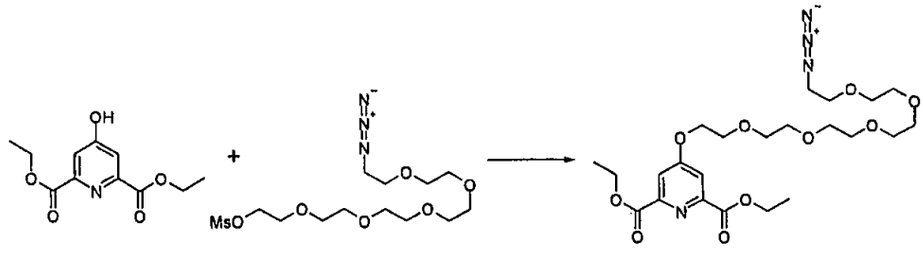
4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-tert-Butoxycarbonylamino-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester



4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-tert-Butoxycarbonylamino-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester may be prepared following the procedure for the preparation of 4-{2-{2-[2-tert-butoxycarbonylamino-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy}-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester, starting with 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-Azido-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester :

LC/MS (Method A3) : ES : m/z=603 MH^+
m/z=271 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$
Retention time = 3.6 minutes

4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-Azido-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester may be prepared as follows :



To a solution of chelidamic acid diethyl ester (1.03g) in dimethylformamide (10mL) were added methanesulfonic acid 2-[2-(2-{2-[2-(2-azido-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethyl ester (1.82g) and potassium carbonate (893 mg). The resulting mixture was heated at 70°C for 15h, then was cooled to room

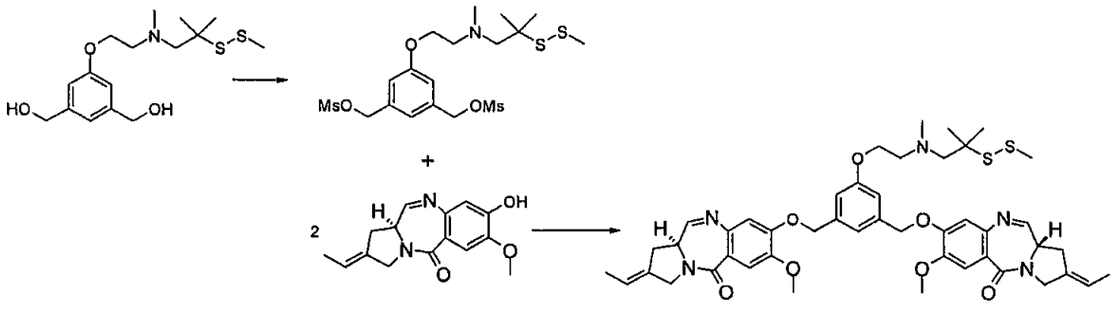
temperature. Water was added and the aqueous solution was extracted three times with ethyl acetate. The combined organic solutions were washed with a saturated sodium chloride aqueous solution, dried over magnesium sulfate and concentrated in vacuo to a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Merck SuperVarioPrep 70g column, Si60 15-40μm), eluted with a mixture of methanol (A) / dichloromethane (B), (gradient : 3%A : 97%B to 5%A : 95%B) to give 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-Azido-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester (2.19 g) :

LC/MS (Method A3) : ES : m/z=529 MH^+

Retention time = 3.4 minutes

Example 28 :

8,8'-[(1-(2-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

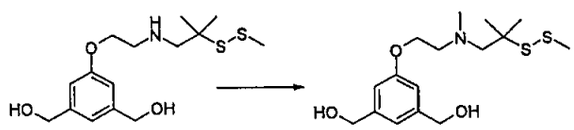


8,8'-[(1-(2-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one], using 1-(2-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene :

LC/MS (Method A1, Platform I) : ES : m/z=872 $MH^+ + H_2O$
m/z=854 MH^+
Retention time = 3.40 minutes

^1H N.M.R. (500 MHz, CDCl3-d1, δ in ppm) : δ = 1,31 (s, 6H) ; 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 2,39 (s, 3H) ; 2,45 (s, 3H) ; 2,62 (s, 2H) ; 2,92 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 2,97 (m, 4H) ; 3,89 (m, 2H) ; 3,96 (s, 6H) ; 4,06 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,26 (s broad, 4H) ; 5,12 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,19 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,60 (q broad, J = 6,5 Hz, 2H) ; 6,82 (s, 2H) ; 6,95 (s broad, 2H) ; 7,06 (s broad, 1H) ; 7,52 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H) .

1-(2-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared as follows :



To a cooled (5°C) suspension of 1-(2-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene (280 mg) in formaldehyde (228 µL), was added formic acid (319µL). The resulting mixture was heated at 100°C for 1h15mn, then was cooled to room temperature. Water and ice were added, followed by an aqueous solution of sodium hydroxide until pH=12. The resulting aqueous solution was extracted three times with ethyl acetate and the combined organic solutions were dried over magnesium sulfate and concentrated in vacuo to a residue. The residue was purified by silica gel chromatography (Merck SuperVarioFlash 25g column, Si60 15-40µm), eluted with a mixture of methanol (A) / dichloromethane (B), (gradient : 2%A : 98%B to 5%A : 95%B) to give 1-(2-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene (210 mg) :

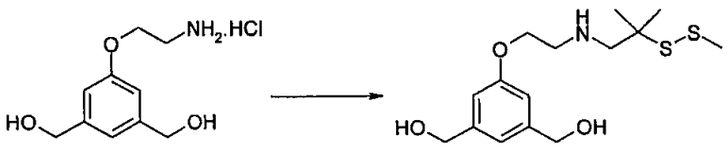
LC/MS (Method A3) : ES : m/z=346 MH^+
m/z=212 $(M + 2H - C_5H_{11}S_2)^+$

m/z=135 $C_5H_{11}S_2^+$

Retention time = 2.1 minutes

^{1}H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,27 (s, 6H) ; 2,39 (s, 3H) ; 2,40 (s, 3H) ; 2,60 (s, 2H) ; 2,85 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 4,02 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 4,44 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,10 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 6,72 (s broad, 2H) ; 6,82 (s broad, 1H) .

1-(2-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene may be prepared as follows :

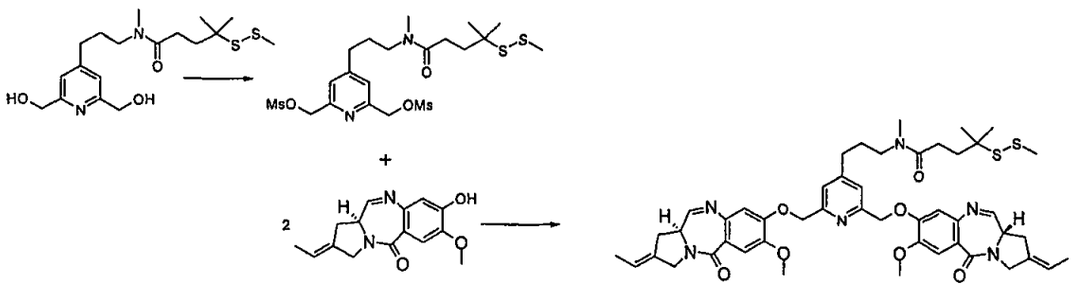


To a suspension of 1-(2-amino-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene hydrochloride (900 mg) in tetrahydrofuran (4.5mL) was added triethylamine (1.07mL). After stirring for 15min, 2-(methyldithio)isobutyraldehyde (530 µL) and titanium isopropoxyde (1.42 mg) were added and the resulting mixture was stirred at room temperature for 2h. Ethanol (9mL) and sodium cyanoborohydride (242 mg) were added and the new mixture was stirred at room temperature for 18h. Solids were filtered off and the filtrate was concentrated in vacuo to a residue. The residue was then diluted in ethyl acetate and the resulting solids were filtered off. The organic solution was then washed with water and with a saturated sodium chloride aqueous solution, dried over magnesium and concentrated in vacuo to a new residue that was purified by silica gel chromatography (Merck SuperVarioFlash 30g column, Si60 15-40µm), eluted with a mixture of methanol (A) / dichloromethane (B), (gradient : 4%A : 96%B to 10%A : 90%B) to give 1-(2-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene (290mg) :

^{1}H N.M.R. (400 MHz, DMSO-d6, δ in ppm) : δ = 1,27 (s, 6H) ; 1,82 (m broad, 1H) ; 2,39 (s, 3H) ; 2,67 (s, 2H) ; 2,91 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 4,00 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 4,43 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,10 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 6,73 (s broad, 2H) ; 6,83 (s broad, 1H).

Example 29 :

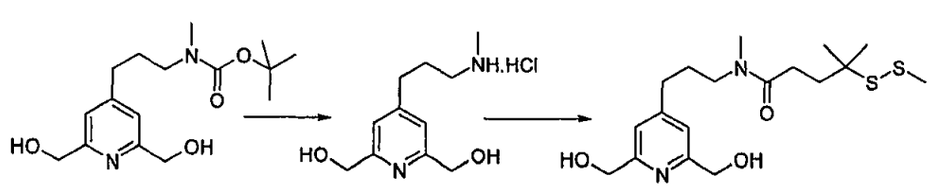
8,8'-[(4-(3-[methyl-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]



8,8'-[(4-(3-[methyl-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one], using 4-(3-[methyl-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-amino]-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine :

^{1}H N.M.R. (500 MHz, CDCl3-d1, δ in ppm) : δ = 1,32 (s, 6H) ; 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 1,94 (m, 4H) ; from 2,20 to 4,30 (m, 18H) ; 4,00 (s, 6H) ; 4,27 (s broad, 4H) ; from 5,21 to 5,68 (m, 6H) ; from 6,80 to 7,70 (m, 8H) .

4-(3-[methyl-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-amino]-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine



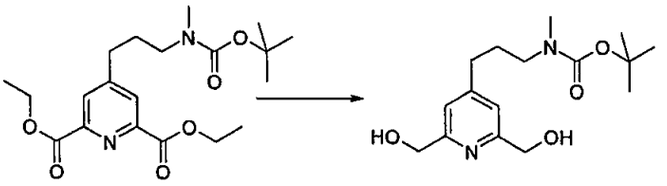
4-(3-[methyl-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-amino]-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-2,6-bis-

(hydroxymethyl)-pyridine, using 4-(3-(tert-Butoxycarbonyl-methyl-amino)-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine:

LC/MS (Method A3) : ES : m/z=387 MH^+

Retention time = 2.5 minutes

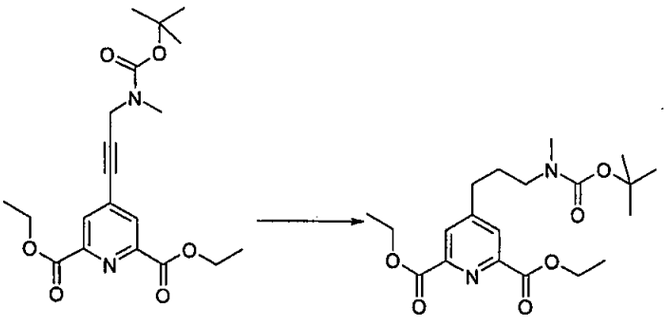
4-(3-(tert-Butoxycarbonyl-methyl-amino)-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine



4-(3-(tert-Butoxycarbonyl-methyl-amino)-propyl)-2,6-bis-(hydroxymethyl)-pyridine may be prepared following the procedure for the preparation of 4-(3-tert-butoxycarbonylamino-propoxy)-2,6-bis-(hydroxymethyl) pyridine, using 4-(3-(tert-butoxycarbonyl-methyl-amino)-propyl)-pyridine-2,6-bis-dicarboxylic acid diethyl ester:

CI (Method D) m/z=311 MH^+

4-(3-(tert-Butoxycarbonyl-methyl-amino)-propyl)-pyridine-2,6-bis-dicarboxylic acid diethyl ester



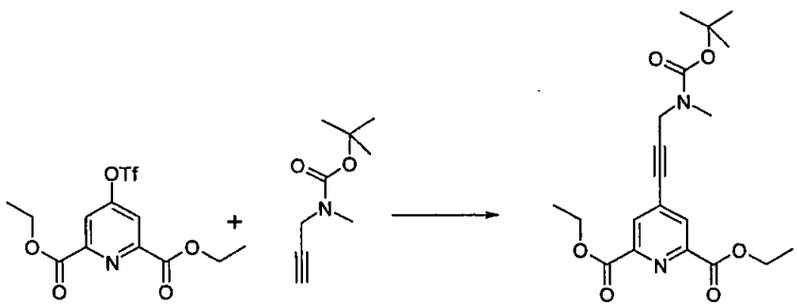
4-(3-(tert-Butoxycarbonyl-methyl-amino)-propyl)-pyridine-2,6-bis-dicarboxylic acid diethyl ester may be prepared following the procedure for the preparation of 5-(3-tert-butoxycarbonyl-N-methyl-amino-propyl)-benzene-1,3-dicarboxylic acid diethyl ester, starting with 4-[3-(tert-Butoxycarbonyl-methyl-amino)-prop-1-ynyl]-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester:

LC/MS (Method G2) : ES : m/z=395 MH^+

m/z=339 $(M + 2H - tBu)^+$

Retention time = 7.5 minutes

4-[3-(tert-Butoxycarbonyl-methyl-amino)-prop-1-ynyl]-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester

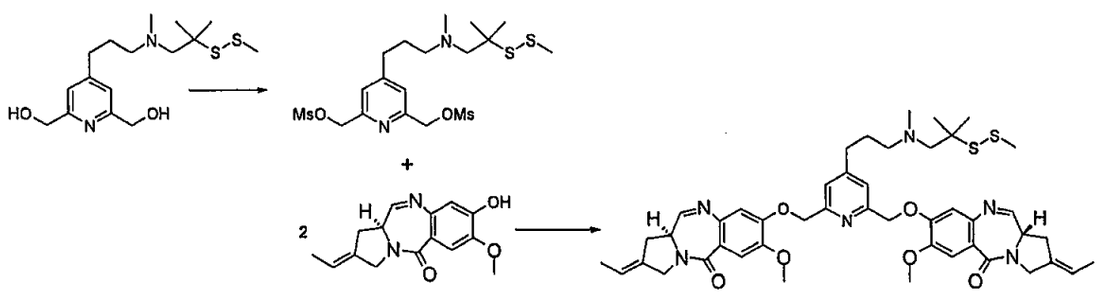


4-[3-(tert-Butoxycarbonyl-methyl-amino)-prop-1-ynyl]-pyridine-2,6-dicarboxylic acid diethyl ester may be prepared following the procedure for the preparation of 5-(3-tert-butoxycarbonyl-N-methyl-amino-propyn-1-yl)-benzene-1,3-dicarboxylic acid diethyl ester, starting with tert-butoxycarbonyl-N-methyl-propargylamine.

CI (Method D) m/z=391 MH^+

Example 30 :

8,8'-[(4-(3-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

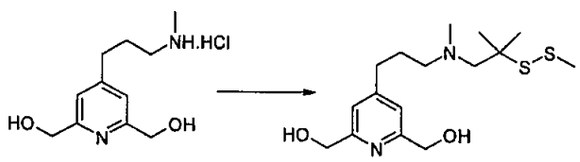


8,8'-[(4-(3-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-

pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one], using 4-{3-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-propyl}-2,6-bis-(hydroxy methyl)-pyridine :

^{1}H N.M.R. (500 MHz, CDCl3-d1, δ in ppm) : δ = 1,28 (s, 6H) ; 1,65 (m partially masked, 2H) ; 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 2,29 (s, 3H) ; 2,38 (s, 3H) ; 2,46 (m, 4H) ; 2,65 (m, 2H) ; 2,97 (m, 4H) ; 3,89 (m, 2H) ; 4,00 (s, 6H) ; 4,27 (s broad, 4H) ; 5,29 (s, 4H) ; 5,60 (q broad, J = 6,5 Hz, 2H) ; 6,86 (s, 2H) ; 7,30 (s, 2H) ; 7,55 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H) .

4-{3-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-propyl}-2,6-bis-(hydroxy methyl)-pyridine



P-34409-034-3

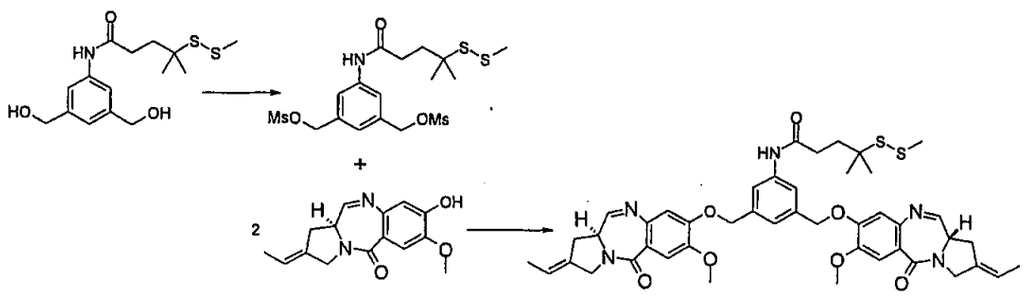
4-{3-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-propyl}-2,6-bis-(hydroxy methyl)-pyridine may be prepared following the procedure for the preparation of 1-(2-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino-ethoxy)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene, using 4-{3-[methyl-amino]-propyl}-2,6-bis-(hydroxy methyl)-pyridine :

LC/MS (Method A1, Platform II) : ES m/z=345 MH^+

Retention time = 1.15 minutes

Example 31 :

8,8'-[(1-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared as follows :



8,8'-[(1-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] may be prepared following the procedure for the preparation of 8,8'-[(4-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one], starting with (1-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido)-3,5-bis-(hydroxymethyl)-benzene :

LC/MS (Method A1, Platform I) : ES : m/z=838 MH^+

Retention time = 4.11 minutes

^1H N.M.R. (500 MHz, CDCl3-d1, δ in ppm) : δ = 1,33 (s, 6H) ; 1,76 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 2,03 (m, 2H) ; 2,43 (s, 3H) ; 2,46 (m, 2H) ; 2,97 (m, 4H) ; 3,89 (m, 2H) ; 3,95 (s, 6H) ; 4,27 (s broad, 4H) ; 5,14 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,19 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,60 (q, J = 6,5 Hz, 2H) ; 6, 81 (s, 2H) ; from 7,20 to 7,60 (m, 6H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H)

The corresponding mercapto derivatives of compounds of examples 19-31 may be prepared by application of the procedure described in example 18.

▪ Example A : General procedure for conjugate preparation:

Anti-B4 antibody that binds to the CD19 antigen preferentially expressed on the surface of human lymphoma cells is selected for conjugation of tomaymycin derivatives.

In the first step, the antibody is reacted with the modifying agent N-sulfosuccinimidyl 5-nitro-2-pyridyldithiobutanoate (SSNPB) to introduce nitropyridyldithio groups. A solution of huC242 antibody at a concentration of 8 mg/mL in an aqueous buffer containing 0.05 M potassium phosphate, 0.05 M

sodium chloride and 2 mM ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA), pH 6.5 (65.6 mL) is treated with a 8-fold molar excess of a solution of SSNPB in dimethylacetamide (DMA). The reaction mixture is stirred at room temperature for 90 min. and then loaded on to a Sephadex G25 gel filtration column (50 mm x 35.5 mm, column) that has been previously equilibrated into an aqueous buffer containing 0.05 M potassium phosphate, 0.05 M sodium chloride and 2 mM EDTA, pH 7.5.The modified antibody-containing fractions are collected and pooled to yield product. A small aliquot of the modified antibody is treated with dithiothreitol to cleave the nitro-pyridyl disulfide and the released nitro-pyridine-2-thione is assayed spectrophotometrically (ε_{323nm} = 4,299 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{280nm} = 565 $M^{-1}cm^{-1}$ for the compound, and ε_{280nm} = 217,560 $M^{-1}cm^{-1}$ for the antibody). An average of 4 to 6 nitro-pyridyldisulfide molecules are typically linked per molecule of antibody.

The modified antibody is diluted to 2.5 mg/mL in the above buffer at pH 7.5 and then treated with a solution of the tomaymycin derivative in DMA, such that the final concentration of DMA in the buffer is 20%. The conjugation mixture is stirred at room temperature for 16 h. The reaction mixture is purified by passage through a Sephacryl S300 gel filtration column (50 mm x 42 cm, column that has been previously equilibrated in a phosphate-buffered saline (PBS) buffer at pH 6.5. Fractions containing monomeric antibody-tomaymycin derivative conjugate are pooled and dialyzed into the PBS buffer. The final conjugate is assayed spectrophotometrically using the extinction coefficients that are determined separately for each tomaymycin derivative.

SPDB-PBD and SMCC-PBD Conjugates of the compounds of the invention

huB4-SPDB - Compound of example 16

- Example A1 : Anti-B4 antibody that binds to the CD19 antigen preferentially expressed on the surface of human lymphoma cells is selected for conjugation of tomaymycin derivatives.

The antibody was first modified with 4-(2-pyridyldithio)butanoic acid N-hydroxysuccinimide ester (SPDB) to introduce pyridyldithio groups. A 4.5-fold molar excess of SPDB (0.25 µmol, 81.1 µg,) in dimethylacetamide (DMA) (50 µL) was added to a solution of huB4 (8 mg, 0.055 µmol) in aqueous buffer containing 50 mM potassium phosphate, 50 mM sodium chloride and 2 mM ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA), pH 6.5 (0.95 mL). The final protein concentration was 8 mg/mL with 5% DMA in buffer. The modification was allowed to rotate at room temperature for 90 minutes, and was then purified on a Sephadex G25 gel filtration column equilibrated in an aqueous buffer containing 50 mM potassium phosphate, 50 mM sodium chloride and 2 mM EDTA, pH 7.5. A small aliquot of the modified antibody was treated with dithiothreitol (DTT) to cleave the pyridyldisulfide groups. The modified antibody and released pyridine thiol were assayed spectrophotometrically (ε_{343} = 8,080 $M^{-1}cm^{-1}$ for the released pyridine thiol, ε_{280} = 5100 $M^{-1}cm^{-1}$ for the modified pyridyldithio groups and ε_{280} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$ for antibody). An average of 3.36 pyridyldisulfide molecules per molecule of antibody were linked.

The modified antibody (2.29 mg, 0.016 µmol) was diluted in the above buffer at pH 7.5 (732.8 µL) and DMA (91.6 uL, 10% v/v) and then treated with a solution of 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimethylbutanoyl)amino-1,3-benzene-iylbis (methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (Compound of example 16) (0.157 µmol, 0.12 mg) in DMA (91.6 µl, 10% v/v). The final protein concentration was 2.5 mg/mL with 20% DMA in buffer. The conjugation was allowed to rotate at room temperature overnight and then clarified by sedimentation (13,200 RPM for 4 min). The supernatant was then purified on a Sephadex G25 gel filtration column equilibrated in a phosphate-buffered saline (PBS) buffer at pH 6.5. The purified conjugate was dialyzed into PBS pH 6.5 buffer (~1:650 dilution) with four buffer exchanges. The conjugate was clarified through a 0.22 µm syringe filter and assayed spectrophotometrically (ε_{280} = 7743 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{318} = 9137 $M^{-1}cm^{-1}$ for the PBD, and ε_{280} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$ for

antibody). An average of 1.76 PBD molecules (Compound of example 16) per molecule of antibody were linked.

huB4-SMCC - Compound of example 16

- Example A2 : Anti-B4 antibody that binds to the CD19 antigen preferentially expressed on the surface of human lymphoma cells is selected for conjugation of tomaymycin derivatives.

In the first step, the antibody is reacted with the modifying agent Succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) to introduce maleimide groups. A solution of huB4 antibody at a concentration of 6 mg/mL in an aqueous buffer containing 0.05 M potassium phosphate, 0.05 M sodium chloride and 2 mM ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA), pH 6.7 (1 mL) is treated with a 6.5-fold molar excess of a solution of SMCC in dimethylacetamide (DMA). The reaction mixture is stirred at room temperature for 90 min. and then loaded on to a Sephadex G25 gel filtration column (NAP10) that has been previously equilibrated into an aqueous buffer containing 0.10 M N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), pH 8.0. The modified antibody-containing fractions are collected and pooled to yield product. A small aliquot of the modified antibody is treated with β-mercapto ethanol for 10 min followed by addition of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) to assay remaining thiol (ε_{412nm} = 14,150 $M^{-1}cm^{-1}$ for 5-thio-2-nitro benzoic acid (TNB) , and ε_{280nm} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$ for the antibody). The amount of thiol consumed in the reaction with maleimide on the antibody (compared to a control without antibody) is equal to the moles of maleimide attached to the antibody (subtractive Ellman's assay). Approximately 3.2 reactive maleimide groups per antibody were linked.

The modified antibody (3 mg, 0.021 μmol) is diluted to 3.0 mg/mL in HEPES buffer at pH 8.0 and then treated with a solution of compound of example 16 in DMA (5 mM), such that the final concentration of DMA in the buffer is 15 %. Three molar equivalents of 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-

dimethylbutanoyl)amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (Compound of example 16) were added per linker (9.6 eq. per antibody, 0.202 μmol, 149 μg). The conjugation mixture is stirred at room temperature for 20 h. The reaction mixture is purified by passage through a G25 column (NAP 5) that has been previously equilibrated in 0.05 potassium phosphate (KPi), 0.05 M NaCl, 0.002 M EDTA buffer at pH 6.7. Fractions containing huB4-compound of example 16 conjugate are pooled and dialyzed into the KPi buffer for 3 exchanges (24 hr). The final conjugate (2.2 mg, 2.3 mg/ml) is assayed spectrophotometrically using the extinction coefficients that are determined for compound of example 16 (ε_{318nm} = 9,137 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{280nm} = 7,743 $M^{-1}cm^{-1}$) and B4 antibody (ε_{280nm} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$). An average of 2.8 PBD molecules (Compound of example 16) per molecule of antibody were linked.

huB4-SPDB – Compound of example 17

• Example A3 : Anti-B4 antibody that binds to the CD19 antigen preferentially expressed on the surface of human lymphoma cells is selected for conjugation of tomaymycin derivatives.

The antibody was first modified with 4-(2-pyridyldithio)butanoic acid N-hydroxysuccinimide ester (SPDB) to introduce pyridyldithio groups. A 4.5-fold molar excess of SPDB (0.124 μmol, 40.6 μg,) in DMA (25 μL) was added to solution of huB4 (4 mg, 0.028 μmol) in aqueous buffer containing 50 mM potassium phosphate, 50 mM sodium chloride and 2 mM EDTA, pH 6.5 (0.475 mL). The final protein concentration was 8 mg/mL with 5% DMA in buffer. The modification was allowed to rotate at room temperature for 90 minutes, and then purified on a Sephadex G25 gel filtration column equilibrated in an aqueous buffer containing 50 mM potassium phosphate, 50 mM sodium chloride and 2 mM EDTA, pH 7.5. A small aliquot of the modified antibody was treated with DTT to cleave the pyridyldisulfide groups. The modified antibody and released pyridine thiol were assayed spectrophotometrically (ε_{343} = 8,080 $M^{-1}cm^{-1}$ for the released pyridine thiol, ε_{280} = 5100 $M^{-1}cm^{-1}$ for the modified

pyridyldithio groups and ε_{280} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$ for antibody). An average of 3.31 pyridyldisulfide molecules per molecule of antibody were linked.

The modified antibody (3.06 mg, 0.021 µmol) was diluted in the above buffer at pH 7.5 (0.976 mL) and DMA (122 uL, 10% v/v) and then treated with a solution of 8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-mercapto-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl (methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (Compound of example 17) (0.209 µmol, 0.154 mg) in DMA (122 µl, 10% v/v). The final protein concentration was 2.5 mg/mL with 20% DMA in buffer. The conjugation was allowed to rotate at room temperature overnight and then clarified by sedimentation (13,200 RPM for 4 min). The supernatant was then purified on a Sephadex G25 gel filtration column equilibrated in a PBS buffer at pH 6.5. The purified conjugate was dialyzed into PBS pH 6.5 buffer (~1:1200 dilution) with three buffer exchanges. The conjugate was clarified through a 0.22 µm syringe filter and assayed spectrophotometrically (ε_{280} = 10736 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{318} = 12053 $M^{-1}cm^{-1}$ for the PBD, and ε_{280} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$ for antibody). An average of 3.05 PBD molecules (compound of example 17) per molecule of antibody were linked.

huB4-SMCC - Compound of example 17

- Example A4 : Anti-B4 antibody that binds to the CD19 antigen preferentially expressed on the surface of human lymphoma cells is selected for conjugation of tomaymycin derivatives.

In the first step, the antibody is reacted with the modifying agent Succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) to introduce maleimide groups. A solution of huB4 antibody at a concentration of 6 mg/mL in an aqueous buffer containing 0.05 M potassium phosphate, 0.05 M sodium chloride and 2 mM ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA), pH 6.7 (1 mL) is treated with a 7-fold molar excess of a solution of SMCC in dimethylacetamide (DMA). The reaction mixture is stirred at room temperature

for 90 min. and then loaded on to a Sephadex G25 gel filtration column (NAP10) that has been previously equilibrated into an aqueous buffer containing 0.10 M N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), pH 8.0. The modified antibody-containing fractions are collected and pooled to yield product. A small aliquot of the modified antibody is treated with β-mercapto ethanol for 10 min followed by addition of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) to assay remaining thiol (ε_{412nm} = 14,150 $M^{-1}cm^{-1}$ for 5-thio-2-nitro benzoic acid (TNB), and ε_{280nm} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$ for the antibody). The amount of thiol consumed in the reaction with maleimide on the antibody (compared to a control without antibody) is equal to the moles of maleimide attached to the antibody (subtractive Ellman's assay). Approximately 3.7 reactive maleimide groups per antibody were linked.

The modified antibody (4.4 mg, 0.03 μmol) is diluted to 8.7 mg/mL in HEPES buffer at pH 8.0 and then treated with a solution of compound of example 17 in DMA (5.4 mM), such that the final concentration of DMA in the buffer is 20 %. Two molar equivalents of 8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-mercapto-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (Compound of example 17) were added per linker (7.4 eq. per antibody, 0.222 μmol, 164 μg). The conjugation mixture is stirred at room temperature for 20 h. The reaction mixture is purified by passage through a G25 column (NAP 5) that has been previously equilibrated in 0.05 potassium phosphate (KPi), 0.05 M NaCl, 0.002 M EDTA buffer at pH 6.7. Fractions containing huB4-compound of example 17 conjugate are pooled and dialyzed into the KPi buffer for 3 exchanges (24 hr). The final conjugate (2.25 mg, 2.25 mg/ml) is assayed spectrophotometrically using the extinction coefficients that are determined for compound of example 17 (ε_{318nm} = 12,053 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{280nm} = 10,736 $M^{-1}cm^{-1}$) and B4 antibody (ε_{280nm} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$). An average of 2.8 PBD molecules (Compound of example 17) per molecule of antibody were linked.

huMy9-6-SPDB - Compound of example 16

Example A5 : The antibody was first modified with 4-(2-pyridyldithio)butanoic acid N-hydroxysuccinimide ester (SPDB) to introduce pyridyldithio groups. A 4.5-fold molar excess SPDB (0.246 µmol, 80.1 µg,) in DMA (50 µL) was added to solution of huMy9-6 (8 mg, 0.055 µmol) in aqueous buffer containing 50 mM potassium phosphate, 50 mM sodium chloride and 2 mM EDTA, pH 6.5 (0.950 mL). The final protein concentration was 8 mg/mL with 5% DMA in buffer. The modification was allowed to rotate at room temperature for 90 minutes, and then purified on a Sephadex G25 gel filtration column equilibrated in an aqueous buffer containing 50 mM potassium phosphate, 50 mM sodium chloride and 2 mM EDTA, pH 8.5. A small aliquot of the modified antibody was treated with DTT to cleave the pyridyldisulfide groups. The modified antibody and released pyridine thiol were assayed spectrophotometrically (ε_{343} = 8,080 $M^{-1}cm^{-1}$ for the released pyridine thiol, ε_{280} = 5100 $M^{-1}cm^{-1}$ for the modified pyridyldithio groups and ε_{280} = 206,460 $M^{-1}cm^{-1}$ for antibody). An average of 3.32 pyridyldisulfide molecules per molecule of antibody were linked.

The modified antibody (3.05 mg, 0.0208 µmol) was diluted in the above buffer at pH 8.5 (976 µL) and DMA (122 uL, 10% v/v) and then treated with a solution of 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimethylbutanoyl)amino-1,3-benzene-iylbis (methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one] (Compound of example 16) (0.207 µmol, 0.158 mg) in DMA (122 µl, 10% v/v). The final protein concentration was 2.5 mg/mL with 20% DMA in buffer. The conjugation was allowed to rotate at room temperature overnight and then clarified by sedimentation (13,200 RPM for 4 min). The supernatant was then purified on a Sephadex G25 gel filtration column equilibrated in a PBS buffer at pH 6.5. The purified conjugate was dialyzed into PBS pH 6.5 buffer (~1:600 dilution) with three buffer exchanges. The conjugate was clarified through a 0.22 µm syringe filter and assayed spectrophotometrically (ε_{280} = 7743 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{318} = 9137 $M^{-1}cm^{-1}$ for the PBD, and ε_{280} = 206,460 $M^{-1}cm^{-1}$ for antibody). An average of 2.58

PBD molecules (Compound of example 16) per molecule of antibody were linked.

▪ Exemple B : Binding Assay

The relative binding affinities of the anti-B4 antibody and its tomaymycin conjugate on antigen-expressing Ramos cells is determined using a fluorescence-based assay. The antibody-tomaymycin conjugate and naked antibody at starting concentrations of 1 a 10^{-7} M are added to 96-well round bottom plates and titrated using 3-fold serial dilutions so that there are duplicates for each concentration. Ramos cells are added at 50,000 cells per well to each well containing various concentrations of the antibody or conjugate, as well as to control wells. The plates are incubated on ice for 3 hours. After the incubation period, the cells in the plate are washed, and a fluorescence labeled secondary antibody that binds to a humanized IgG, like anti-B4, is added, and the plates are incubated for 1 hour on ice. The plates are washed again after the incubation period, and the cells are fixed with 1% formaldehyde/PBS solution. The fluorescence in each well of the plates is read using a Becton Dickinson FACSCalibur fluorescence analyzer. Data are plotted as a percent of the maximum fluorescence obtained at the highest concentration of antibody or conjugate.

▪ Example C: *In vitro* potency and specificity of tomaymycin derivative or tomaymycin derivative conjugates. General protocol to be used:

Samples of free tomaymycin derivative or tomaymycin derivative conjugate are added to a 96-well flat bottomed tissue culture plate and titrated using serial dilutions ranging from 1×10^{-12} M to 3×10^{-7} M.. Antigen positive tumor cells or antigen negative tumor cells are added to the wells in such a way that there are triplicate samples for each drug concentration for each cell line. The plates are incubated at 37°C in an atmosphere of 5 % CO_2 for 4 days.

At the end of the incubation period, 20 µl of the tetrazolium reagent WST-8· (2-(2-methoxy-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2-tetrazolium,

monosodium salt) is added to each well, and the plates are returned to the incubator for 2 hours. The absorbance in each well of the plates is then measured using the Molecular Devices plate reader at 450 nm. Surviving fraction of cells at each concentration of tomaymycin derivative or conjugate are plotted.

Compounds	*A549 (IC_{50})*	*KB (IC_{50})*	*MCF7 (IC_{50})*
Example 5	$7x10^{-11}$M	$1x10^{-10}$M	$1x10^{-10}$M
Example 1	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M
Example 2	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M

The specific cytotoxicity of the compounds vs. the conjugates of the invention against MOLT-4 and BJAB or HL60/GC and Ramos cell lines were tested. Results are illustrated in figures 1a-c, 2a-c and 3a-b.

Figure 1a represents *in vitro* potency of huB4-SPDB - compound of example 16 towards antigen positive BJAB cells and antigen negative MOLT-4 cells.

Figure 1b represents *in vitro* potency of huB4-SMCC - compound of example 16 towards antigen positive BJAB cells and antigen negative MOLT-4 cells.

Figure 1c represents *in vitro* potency of free compound of example 16 towards BJAB and MOLT-4 cells.

Figure 2a represents *in vitro* potency of huB4-SPDB - Compound of example 17 towards antigen positive BJAB cells and antigen negative MOLT-4 cells.

Figure 2b represents *in vitro* potency of huB4-SMCC- Compound of example 17 towards antigen positive BJAB cells and antigen negative MOLT-4 cells.

Figure 2c represents *in vitro* potency of free compound of example 17 towards BJAB and MOLT-4 cells.

Figure 3a represents *in vitro* potency of huMy9-6-SPDB- compound of example 16 towards antigen positive HL60/GC cells and antigen negative Ramos cells.

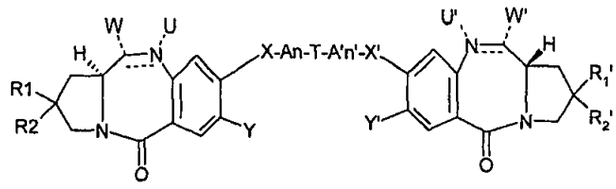
Figure 3b represents *in vitro* potency of free compound of example 16 towards HL60/GC and Ramos cells.

- Example D : *In vivo* efficacy of tomaymycin derivative or tomaymycin derivative conjugates.

The tests can be carried out by application and/or adaptation of the protocol described in WO 2004/103272, with huB4 as the antibody and appropriate antigen positive cell lines, such as Ramos and Rajii Burkitt's Lymphoma cell lines.

CLAIMS

1. Compounds of formula (I)



(I)

where

---- represents an optional single bond;

 represents either a single bond or a double bond ;

provided that when represents a single bond, U and U', the same or different, independently represent H and W and W', the same or different, are independently selected from the group consisting of OH, an ether such as -OR, an ester (e.g. an acetate), such as -OCOR, a carbonate such as -OCOOR, a carbamate such as –OCONRR', a cyclic carbamate, such that N10 and C11 are a part of the cycle, a urea such as –NRCONRR', a thiocarbamate such as -OCSNHR, a cyclic thiocarbamate such that N10 and C11 are a part of the cycle, -SH, a sulfide such as -SR, a sulphoxide such as -SOR, a sulfone such as -SOOR, a sulphonate such as $-SO_3^-$, a sulfonamide such as -NRSOOR, an amine such as –NRR', optionally cyclic amine such that N10 and C11 are a part of the cycle, a hydroxylamine derivative such as -NROR', an amide such as –NRCOR, an azido such as $-N_3$, a cyano, a halo, a trialkyl or triarylphosphonium, an aminoacid-derived group;

and when represents a double bond, U and U' are absent and W and W' represent H;

- R1, R2, R1', R2' are the same or different and independently chosen from Halide or Alkyl optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Aryl, Het, $S(O)_qR$, or R1 and R2 and R1' and R2' form together a double bond containing group =B and =B' respectively.

- B and B' are the same or different and independently chosen from Alkenyl being optionally substituted by one or more Hal, CN, R, , CF_3, OR, Aryl, Het, $S(O)_qR$ or B and B' represent an oxygen atom.

- X, X' are the same or different and independently chosen from one or more –O-, -NR-, -(C=O)-, $-S(O)_q-$.

- A, A' are the same or different and independently chosen from Alkyl or Alkenyl optionally containing an oxygen, a nitrogen or a sulfur atom and each being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$, Aryl, Het, Alkyl, Alkenyl.

- Y, Y' are the same or different and independently chosen from H, OR;

- T is -NR-, -O-, $-S(O)_q-$, or a 4 to 10-membered aryl, cycloalkyl, heterocyclic or heteroaryl, each being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$, and/or linker(s), or a branched Alkyl, optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$ and/or linker(s), or a linear Alkyl substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$ and/or linker(s);

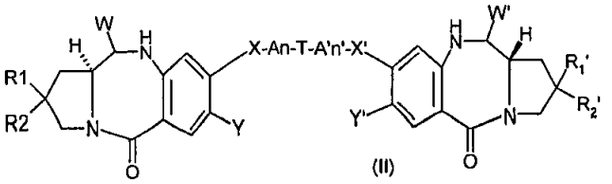
- n, n', equal or different are 0 or 1;

- q is 0, 1 or 2;

- R, R' are equal or different and independently chosen from H, Alkyl, Aryl, each being optionally substituted by Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, Aryl, Het;

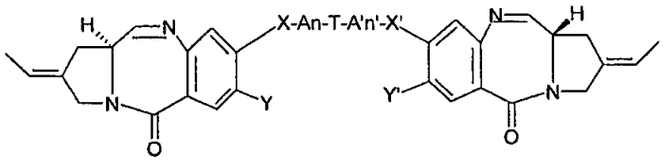
or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

2. Derivatives according to claim 1 having the following formula (II)



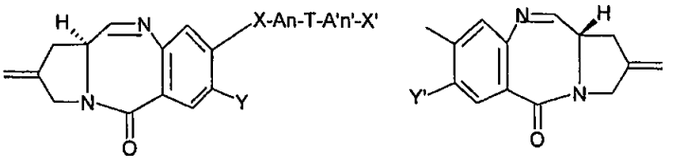
▪ Y, Y', X, X', n, n', R1, R2, R1', R2', R, R', T are as in claim 1 and W and W' the same or different are independently selected from the group consisting of OH, an ether such as -OR, an ester (e.g. an acetate), such as -OCOR, -COOR, a carbonate such as -OCOOR, a carbamate such as –OCONRR', a cyclic carbamate, such that N10 and C11 are a part of the cycle, a urea such as –NRCONRR', a thiocarbamate such as -OCSNHR, a cyclic thiocarbamate such that N10 and C11 are a part of the cycle, -SH, a sulfide such as -SR, a sulphoxide such as -SOR, a sulfone such as -SOOR, a sulphonate such as $-SO_3^-$, a sulfonamide such as -NRSOOR, an amine such as –NRR', optionally cyclic amine such that N10 and C11 are a part of the cycle, a hydroxylamine derivative such as -NROR', an amide such as –NRCOR, -NRCONRR', an azido such as $-N_3$, a cyano, a halo, a trialkyl or triarylphosphonium, an aminoacid-derived group.

3. Compounds according to claim 1 or 2 of formula:



where X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' are defined as in claim 1.

4. Compounds according to claim 1 or 2 of formula:



where X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' are defined as in claim 1.

5. Compounds according to anyone of the preceding claims, wherein X=X'.

6. Compounds according to anyone of the preceding claims, wherein X=X'=O.

7. Compounds according to anyone of the preceding claims, wherein A=A'.

8. Compounds according to anyone of the preceding claims, wherein A=A'=linear unsubstituted alkyl.

9. Compounds according to anyone of the preceding claims, wherein Y=Y'.

10. Compounds according to anyone of the preceding claims, wherein Y=Y'=OAlkyl.

11. Compounds according to anyone of the preceding claims, wherein T is a 4 to 10-membered aryl, cycloalkyl, heterocyclic or heteroaryl, each being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, Alkyl, and/or linker(s).

12. Compounds according to anyone of the preceding claims, wherein T is a phenyl or pyridyl, each being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$ and/or linker(s).

13. Compounds according to anyone of the preceding claims, wherein said linker is chosen from containing disulfide groups, thioether groups, acid labile groups, photolabile groups, peptidase labile groups and esterase labile groups.

14. Compounds according to anyone of the preceding claims, wherein said linker comprises thiol-, sulfide or disulfide-containing substituents.

15. Compounds according to claim 14, wherein said linker is of formula:

–G-D-(Z)p-S-Z'

where

G is a single or double bond, –O-, -S- or –NR-;

D is a single bond or –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- ;

where E and F are the same or different and are independently chosen from linear or branched $-(OCH_2CH_2)_i$Alkyl$(OCH_2CH_2)_j-$, -Alkyl$(OCH_2CH_2)_i$-Alkyl-, $-(OCH_2CH_2)_i-$, $-(OCH_2CH_2)_i$Cycloalkyl$(OCH_2CH_2)_j-$, $-(OCH_2CH_2)_i$Heterocyclic$(OCH_2CH_2)_j-$, $-(OCH_2CH_2)_i$Aryl$(OCH_2CH_2)_j-$, $-(OCH_2CH_2)_i$Heteroaryl$(OCH_2CH_2)_j-$, –Alkyl-$(OCH_2CH_2)_i$Alkyl$(OCH_2CH_2)_j-$, -Alkyl-$(OCH_2CH_2)_i-$, -Alkyl-$(OCH_2CH_2)_i$Cycloalkyl$(OCH_2CH_2)_j-$, -Alkyl$(OCH_2CH_2)_i$Heterocyclic$(OCH_2CH_2)_j-$, -Alkyl-$(OCH_2CH_2)_i$Aryl$(OCH_2CH_2)_j-$, -Alkyl$(OCH_2CH_2)_i$Heteroaryl$(OCH_2CH_2)_j-$, -Cycloalkyl-Alkyl-, -Alkyl-Cycloalkyl-, -Heterocyclic-Alkyl-, -Alkyl-Heterocyclic-, -Alkyl-Aryl-, -Aryl-Alkyl-, -Alkyl-Heteroaryl- , -Heteroaryl-Alkyl-;

where i and j, identical or different are integers and independently chosen from 0, 1 to 2000;

Z is linear or branched -Alkyl-;

p is 0 or 1;

Z' represents H, a thiol protecting group such as COR, R_{20} or SR_{20}, wherein R_{20} represents H, methyl, Alkyl, optionally substituted Cycloalkyl, aryl, heteroaryl or heterocyclic, provided that when Z' is H, said compound is in equilibrium with the corresponding compound formed by intramolecular cyclisation resulting

from addition of the thiol group –SH on the imine bond –NH= of one of the PBD moieties.

16. Compounds according to claim 15, wherein G is a single bond or –O- or -NR-.

17. Compounds according to claim 15 or 16, wherein G is –O-.

18. Compounds according to claim 15, 16 or 17, wherein D is a single bond or –E-, -E-NR-, -E-CO-, -CO-E-, -E-NR-CO-.

19. Compounds according to anyone of claims 15 to 18, wherein D is -E-NR-CO-.

20. Compounds according to anyone of claims 15 to 19, wherein E is a linear or branched –Alkyl-, $-(OCH_2CH_2)_i-$ or –Alkyl-heterocyclic.

21. Compounds according to anyone of claims 15 to 20, wherein Z is $-(CH_2)_2-C(CH_3)_2-$.

22. Compounds according to anyone of claims 15 to 21, wherein p is 1.

23. Compounds according to anyone of claims 15 to 22, wherein Z' is H or SR_{20}, wherein R_{20} represents Alkyl, aryl, heterocyclic or heteroaryl.

24. Compounds according to claim 14 or 15, wherein said linker is chosen from:

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_y(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_y SZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(OCO)(R_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CONR_{19})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t$-phenyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-furyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,$-(CR_{13}R_{14})_t$-thiazolyl- $CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t$-thienyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t$-morpholino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-N-methyl-piperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-phenyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-furyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-thiazolyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-thienyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-morpholino-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-N-methylpiperazino-QSZ', or

$-O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-O(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-O(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-O-phenyl-QSZ', -O-furyl-QSZ', -O-oxazolyl-QSZ', -O-thiazolyl-QSZ', -O-thienyl-QSZ', -O-imidazolyl-QSZ', -O-morpholino-QSZ', -O-piperazino-QSZ', -O-N-methylpiperazino-QSZ',

$-OCO(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)_v(CR_{15}R_{16})_u$ $(OCH_2CH_2)_y$ SZ',
$-OCO-(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-OCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-OCO-phenyl-QSZ', -OCO-furyl-QSZ', -OCO-oxazolyl-QSZ', -OCO-thiazolyl-QSZ', -OCO-thienyl-QSZ', -OCO-imidazolyl-QSZ', -OCO-morpholino-QSZ', -OCO-piperazino-QSZ', -OCO-N-methylpiperazino-QSZ', or

$-CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u$ $(OCH_2CH_2)_y$ SZ',
$-CO-(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-CO-phenyl-QSZ', -CO-furyl-QSZ', -CO-oxazolyl-QSZ', -CO-thiazolyl-QSZ', -CO-thienyl-QSZ', -CO-imidazolyl-QSZ', -CO-morpholino-QSZ', -CO-piperazino-QSZ', -CO-piperidino-QSZ', -CO-N-methylpiperazino-QSZ',

$-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO\ NR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO$-phenyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-furyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-oxazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-thiazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-thienyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-imidazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-morpholino-QSZ', $-NR_{19}CO$-piperazino-QSZ', $-NR_{19}CO$-piperidino-QSZ', $-NR_{19}CO$-N-methylpiperazino-QSZ',
$-NR_{19}$-phenyl-QSZ', $-NR_{19}$-furyl-QSZ', $-NR_{19}$-oxazolyl-QSZ', $-NR_{19}$-thiazolyl-QSZ', $-NR_{19}$-thienyl-QSZ', $-NR_{19}$-imidazolyl-QSZ', $-NR_{19}$-morpholino-QSZ', $-NR_{19}$-piperazino-QSZ', $-NR_{19}$-piperidino-QSZ', $-NR_{19}$-N-methylpiperazino-QSZ',
$-NR_{19}CO-NR_{12}$-phenyl-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-oxazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-thiazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-thienyl-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-piperidino-QSZ',

$-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-SCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-SCO-morpholino-QSZ', -SCO-piperazino-QSZ', -SCO-piperidino-QSZ', and -SCO-N-methylpiperazino-QSZ', wherein:

Z' is H, a thiol protective group, R_{20}' or SR_{20}' wherein R_{20}' represents alkyl, aryl, heterocyclic or heteroaryl,

wherein Q is a direct link or a linear alkyl or branched alkyl having from 1-10 carbon atoms or a polyethylene glycol spacer with 2 to 20 repeating ethylene oxy units;

R_{19} and R_{12} are the same or different and are linear alkyl, branched alkyl or cyclic alkyl having from 1 to 10 carbon atoms, or simple or substituted aryl or heterocyclic, and R_{12} can in addition be H,

R_{13}, R_{14}, R_{15} and R_{16} are the same or different and are H or a linear or branched alkyl having from 1 to 4 carbon atoms,

R_{17} and R_{18} are H or alkyll,

u is an integer from 1 to 10 and can also be 0,

t is an integer from 1 to 10 and can also be 0,

y is an integer from 1 to 20 and can also be 0.

25. Compounds according to anyone of the preceding claims chosen from:

8,8'-[1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-methoxy-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[1,4-butanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[3-methyl-1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[2,6-pyridinediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[4-(3-tert-butoxycarbonylaminopropyloxy)-2,6-pyridinediylbis-(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(3-aminopropyloxy)-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(N-methyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyl)-1,3-benzenediylbis-(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-{5-[3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)propyloxy]-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)}-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-acetylthiomethyl-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[(S)-2-methylene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

bis-{2-[(S)-2-methylene-7-methoxy-5-oxo-1,3,,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yloxy]-ethyl}-carbamic acid tert-butyl ester

8,8'-[3-(2-acetylthioethyl)-1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-methylene-7-methoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimethylbutanoyl)amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(N-4-methyldithio-4,4-dimethylbutanoyl)-amino-1,3-benzenediylbis(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-mercapto-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[5-(N-methyl-N-(2-methyldithio-2,2-dimethylethyl)amino-1,3-benzenediyl(methyleneoxy)]-bis[7-methoxy-2-methylene-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-methyl)-pentanamido-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(3-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido-butoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(3-[4-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoylamino)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(1-(2-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-ethoxy)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(3-[methyl-(4-methyl-4-methyldisulfanyl-pentanoyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

8,8'-[(4-(3-[methyl-(2-methyl-2-methyldisulfanyl-propyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

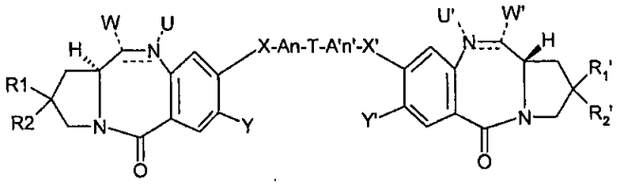
8,8'-[(1-(4-methyl-4-methyldisulfanyl)-pentanamido)-benzene-3,5-dimethyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-ylidene-7-dimethoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-one]

as well as the corresponding mercapto derivatives,

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

26. A conjugate comprising one or more tomaymycin derivatives chemically linked to a cell binding agent trough a linker comprising a linking group.

27. A conjugate coaccording to claim 26, wherein the tomaymycin derivative is of of formula (I'):



(I')

where

---- represents an optional single bond;

---- represents either a single bond or a double bond ;

provided that when ---- represents a single bond, U and U', the same or different, independently represent H, and W and W', the same or different, are independently selected from the group consisting of OH, an ether such as -OR, an ester (e.g. an acetate), such as -OCOR, a carbonate such as -OCOOR, a carbamate such as –OCONRR', a cyclic carbamate, such that N10 and C11 are a part of the cycle, a urea such as –NRCONRR', a thiocarbamate such as -OCSNHR, a cyclic thiocarbamate such that N10 and C11 are a part of the cycle,

-SH, a sulfide such as -SR, a sulphoxide such as -SOR, a sulfone such as -SOOR, a sulphonate such as $-SO_3^-$, a sulfonamide such as -NRSOOR, an amine such as –NRR', optionally cyclic amine such that N10 and C11 are a part of the cycle, a hydroxylamine derivative such as -NROR', an amide such as –NRCOR, an azido such as $-N_3$, a cyano, a halo, a trialkyl or triarylphosphonium, an aminoacid-derived group;

and when ---- represents a double bond, U and U' are absent and W and W' represent H;

- R1, R2, R1', R2' are the same or different and independently chosen from Halide or Alkyl optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Aryl, Het, $S(O)_qR$, or R1 and R2 and R1' and R2' form together a double bond containing group =B and =B' respectively.

- B and B' are the same or different and independently chosen from Alkenyl being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Aryl, Het, $S(O)_qR$ or B and B' represent an oxygen atom.

- X, X' are the same or different and independently chosen from one or more –O-, -NR-, -(C=O)-, $-S(O)_q-$.

- A, A' are the same or different and independently chosen from Alkyl or Alkenyl optionally containing an oxygen, a nitrogen or a sulfur atom and each being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$, Aryl, Het, Alkyl, Alkenyl.

- Y, Y' are the same or different and independently chosen from H, OR;

- T is –Alkyl-, -NR-, -O-, $-S(O)_q-$, or a 4 to 10-membered aryl, cycloalkyl, heterocyclic or heteroaryl, each being optionally substituted by one or more Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$,
and substituted by one or more of said linker(s),

- n, n', equal or different are 0 or 1;

- q is 0, 1 or 2.
- R, R' are equal or different and independently chosen from H, Alkyl, Aryl, each being optionally substituted by Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, Aryl, Het;

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers,
said derivative being covalently bonded to a cell binding agent through said linker comprising said linking group.

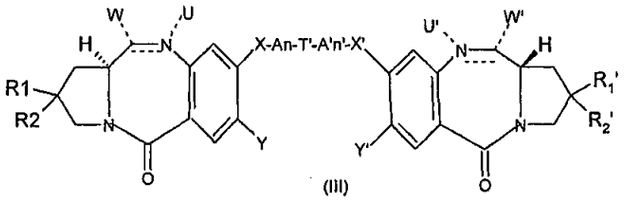
28. A conjugate according to claim 26 or 27, wherein said cell binding agent is chosen from antibodies or a fragment of an antibody that contains at least one binding site, lymphokines, hormones, growth factors, nutrient-transport molecules, or any other cell binding molecule or substance.

29. A conjugate according to claim 26, 27 or 28, wherein said cell binding agent is chosen from monoclonal antibodies; chimeric antibodies; humanized antibodies; fully human antibodies; single chain antibodies; fragments of antibodies such as Fab, Fab', $F(ab')_2$ and F_v, interferons; peptides; lymphokines such as IL-2, IL-3, IL-4, IL-6; hormones such as insulin, TRH (thyrotropin releasing hormones), MSH (melanocyte-stimulating hormone), steroid hormones, such as androgens and estrogens; growth factors and colony-stimulating factors such as EGF, TGFα, insulin like growth factor (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF and GM-CSF; vitamins, such as folate and transferrin.

30. A conjugate according to anyone of claims 26 to 29, wherein U, U', W, W', R1, R2, R1', R2', Y, Y', X, A, A', X', n, n', ----, ---- , T and said linker are defined as in anyone of claims 2 to 25.

31. A conjugate according to anyone of claims 26 to 30 wherein said linking group is a thiol, sulfide or disulfide containing group.

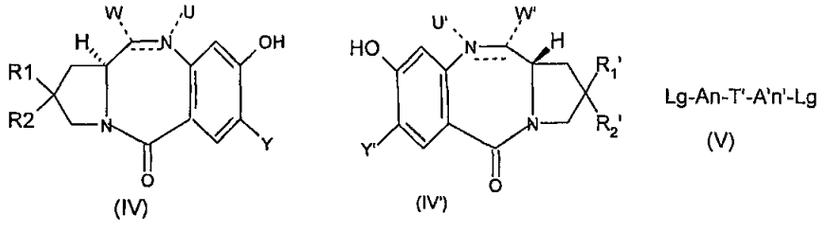
32. Process of preparation of a compound according to anyone of claims 1 to 25, comprising the step of deprotecting a corresponding compound of formula (III) :



(III)

where Y, Y', X, X', A, A', X', U, U', W, W', , ----, ⎯⎯, R1, R1', R2, R2', n, n' are defined as in formula (I) and T' corresponds to T where the functional group(s) has(ve) been protected, and optionally isolating the desired compound of formula (I).

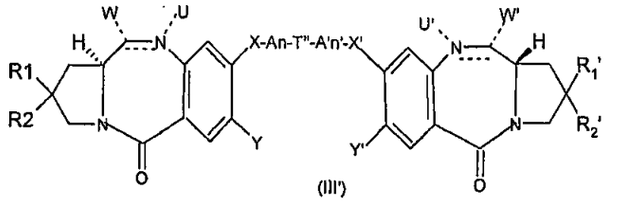
33. Process according to claim 32, wherein the compounds of formula (III) are obtained from coupling corresponding compounds of formulae (IV), (IV') and (V):



(IV) (IV') (V)

where U, U', W, W', Y, Y', A, A', n, n', T', ----, ⎯⎯, R1, R2, R1', R2' are defined as in formula (III), and Lg is a leaving group.

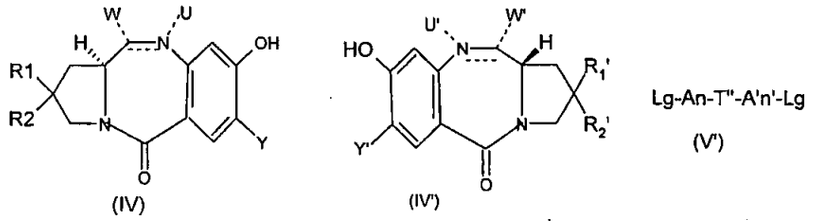
34. Process of preparation of a compound according to anyone of claims 1 to 25, from the corresponding compound of formula (III'):



(III')

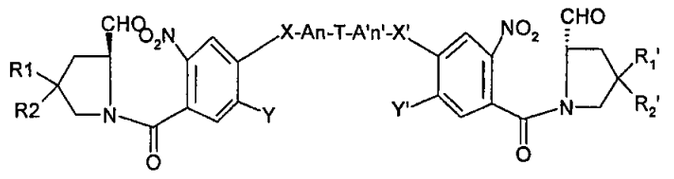
where Y, Y', X, X', A, A', X', U, U', W, W', ----, ⎯⎯, R1, R2, R1', R2', n, n' are defined as in formula (I) and T'' is an optionally protected precursor group of T, and optionally isolating the desired compound of formula (I).

35. Process according to claim 34, wherein the compound of formula (III') may be obtained from coupling the corresponding compound of formulae (IV), (IV') and (V'):



where U, Q, W, W', Y, Y', A, A', n, n', , ----, ⎯⎯, R1, R2, R1', R2' are defined as in formula (I), T'' is an optionally protected precursor group of T and Lg is a leaving group.

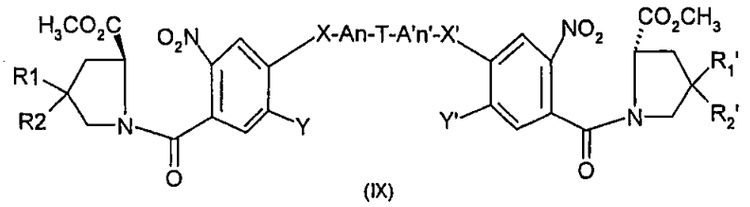
36. Process of preparation of a compound according to anyone of claims 1 to 25 comprising the step of cyclizing the corresponding compound of formula (VIII):



(VIII)

where Y, Y', X, A, A', X', n, n', T, R1, R2, R1', R2' are defined as in formula (I).

37. Process according to claim 36, wherein the compound of formula (VIII) may be obtained from the corresponding compound of formula (IX):



(IX)

where Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T are defined as in formula (I).

38. Process of preparation of a conjugate according to anyone of claims 27 to 31 comprising the step where a compound of formula (I) as defined in claim 1 in which T comprises a sulfide, disulfide or thiol group, or a precursor thereof, is reacted with a cell binding agent comprising a function reactive towards disulfide or thiol so that the compound and the cell binding agent are linked together via a sulphide or disulfide bond.

39. A pharmaceutical composition comprising a conjugate molecule as defined in anyone of claims 26 to 31, or a compound of formula (I) as defined in anyone of claims 1 to 25 together with a pharmaceutically acceptable carrier.

40. Use of an effective amount of a conjugate molecule as defined in anyone of claims 26 to 31 or a compound of formula (I) as defined in anyone of claims 1 to 25 for the preparation of a medicament for killing or inhibiting growth of cells comprising contacting target cells or tissue containing target cells.

41. Use of an effective amount of a conjugate molecule as defined in anyone of claims 26 to 31 or a compound of formula (I) as defined in anyone of claims 1 to 25 for the preparation of a medicament for the treatment of cancer.

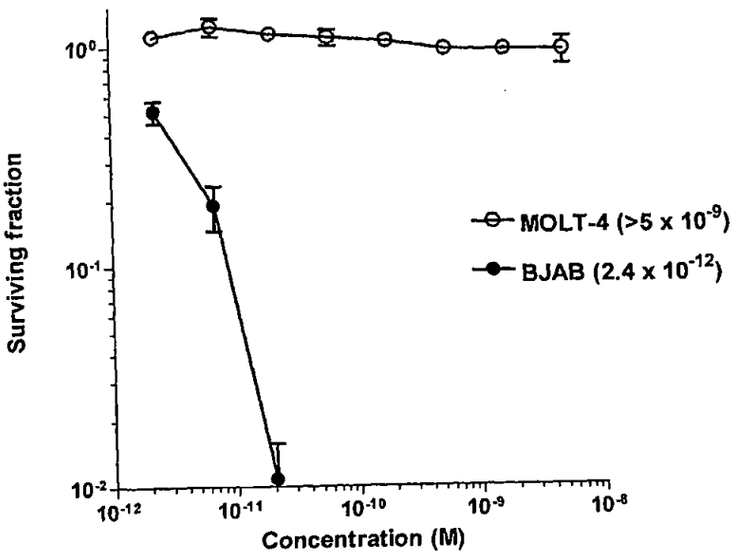


Figure 1a

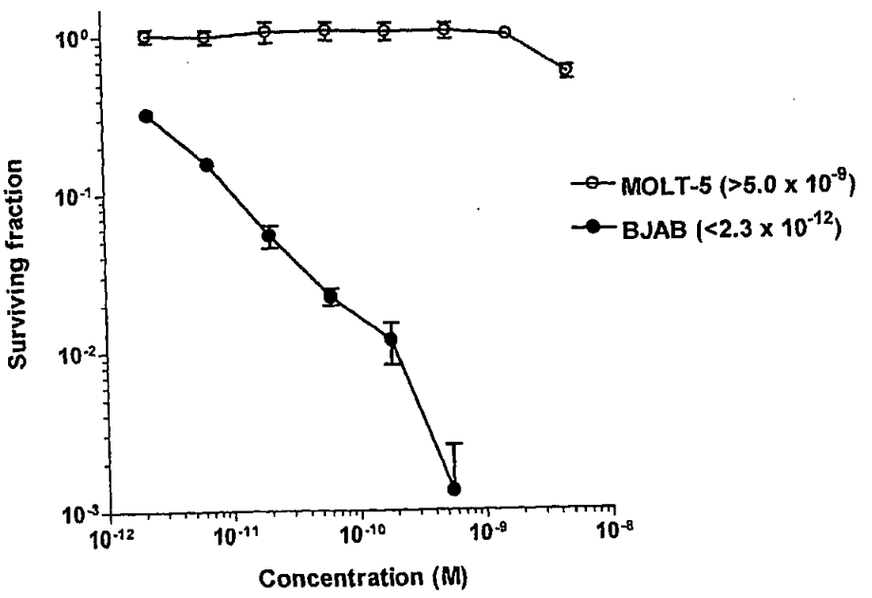


Figure 1b

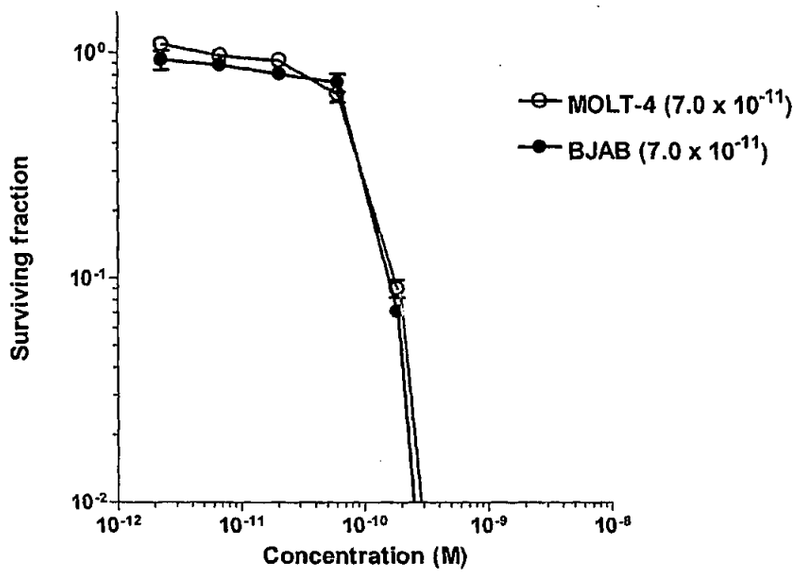


Figure 1c

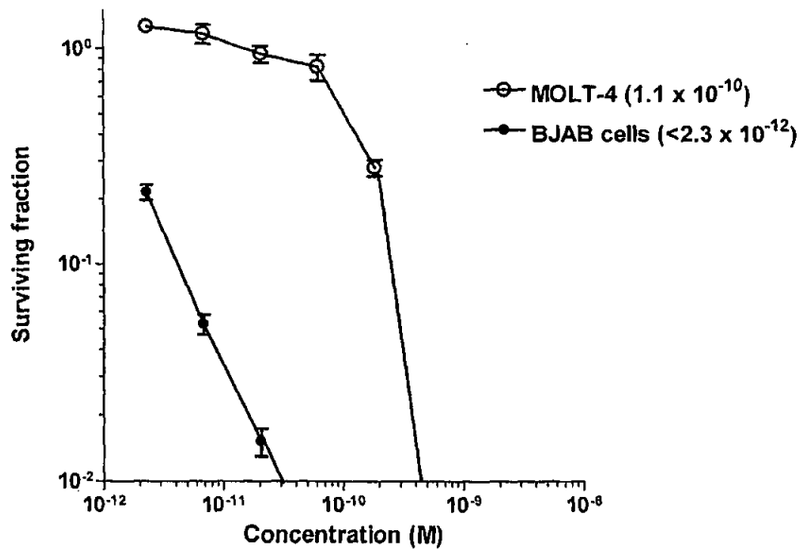


Figure 2a

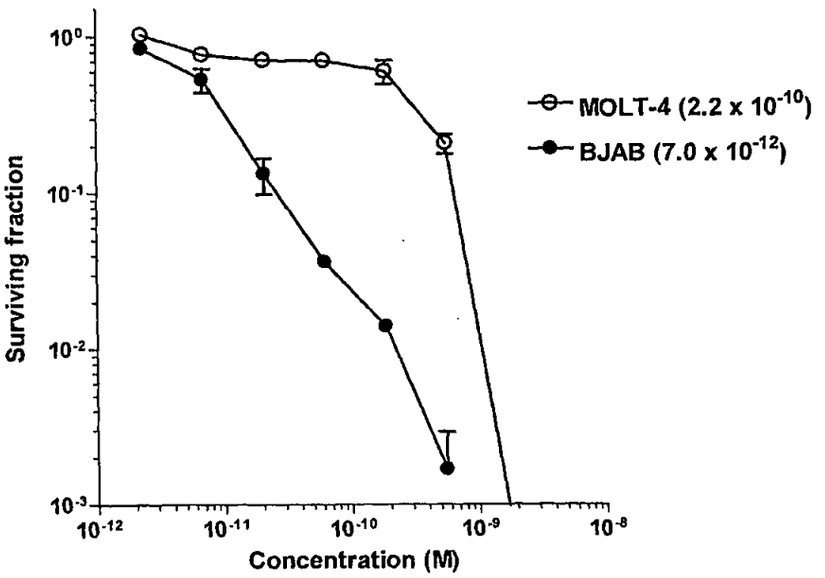


Figure 2b

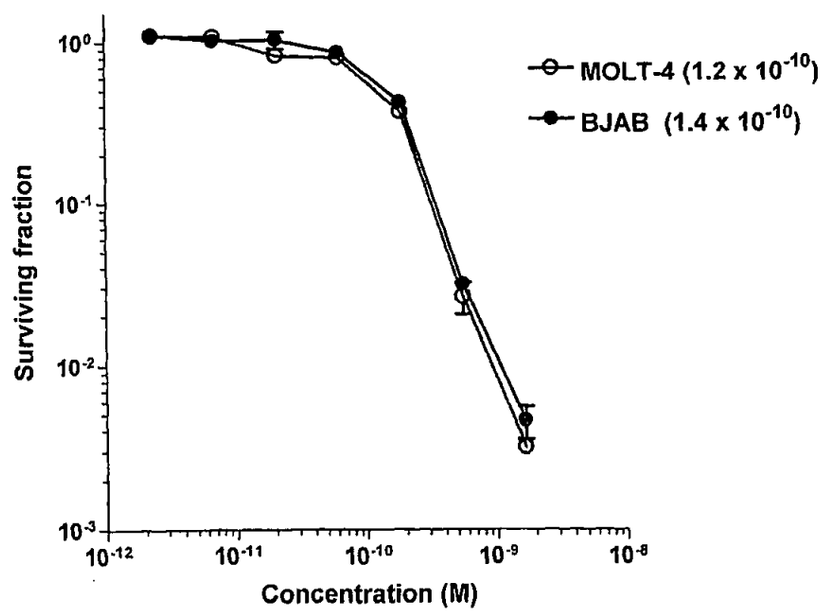


Figure 2c

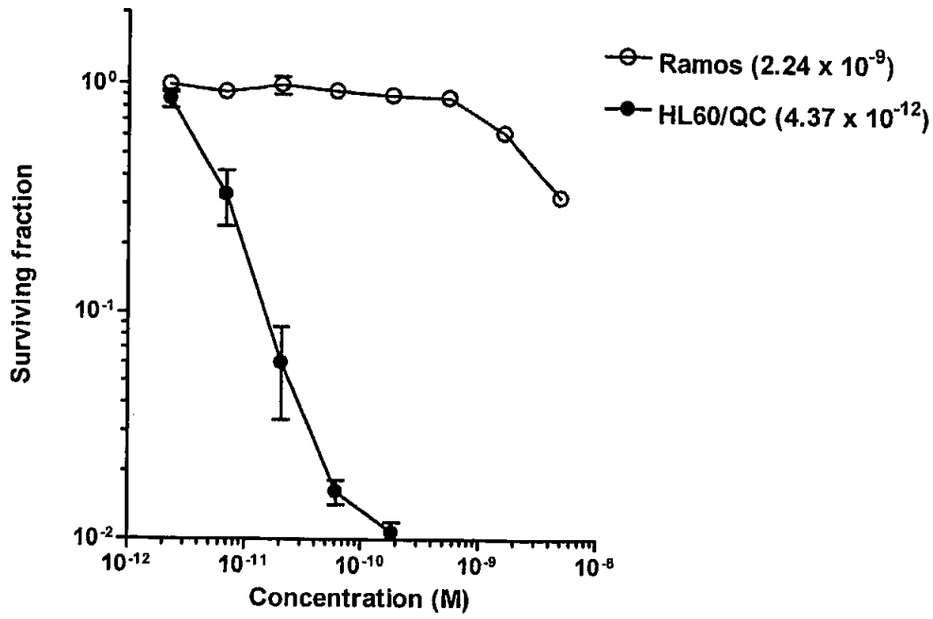


Figure 3a

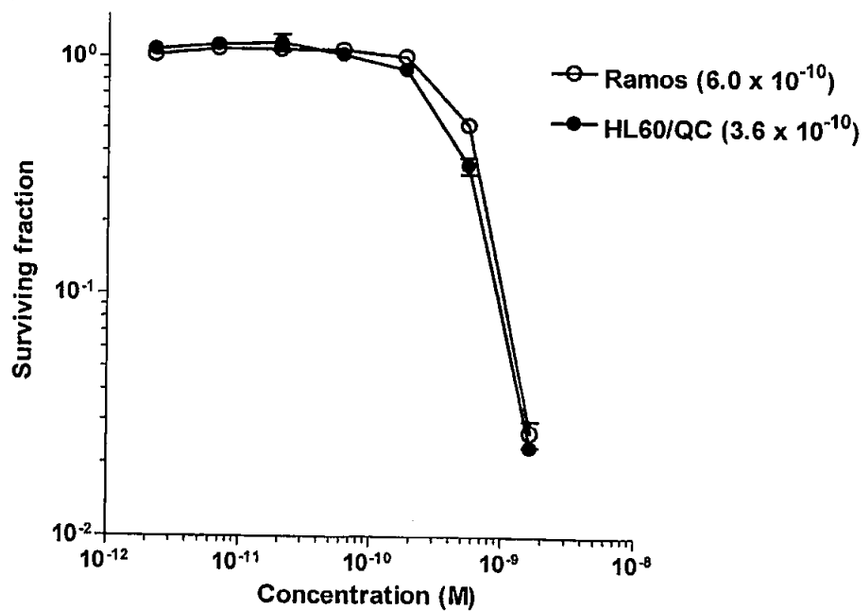


Figure 3b

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2007/085930 A1

(43) Fecha de publicación internacional
2 Agosto 2007 (02.08.2007)

(51) Clasificación Internacional de Patentes[7]: *C07D 487/04* (2006.01)

(21) Número de solicitud internacional: PCT/IB2007/000142

(22) Fecha de presentación internacional: 22 Enero 2007 (2.01.2007)

(25) Idioma de la presentación: Inglés

(26) Idioma de la publicación: Inglés

(30) Datos de prioridad:
06290154.1 25 Enero 2006 (25.01.2006) EP

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados excepto EE.UU.)*: **SANOFI-AVENTIS** [FR/FR]; 174, Avenue De France, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(solamente para EE.UU.)*: **GAUZY, Laurence** [FR/FR]; 13, Quai Jules Guesde, F-94400 Vitry Sur Seine (FR). **ZHAO, Robert** [US/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **DENG, Yonghong** [CN/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **LI, Wei** [CN/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **BOUCHARD, Hervé** [FR/FR]; 13, Quai Jules Guesde, F-94400 Vitry Sur Seine (FR). **CHARI, Ravi, V.J.** [US/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **COMMERCON, Alain** [FR/FR]; 13, Quai Jules Guesde, F-94400 Vitry Sur Seine (FR).

(74) Agente: **COLOMBET, Alain et al.**; CABINET LAVOIX, 2, Place D'estienne D'orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección nacional disponible)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección regional disponible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

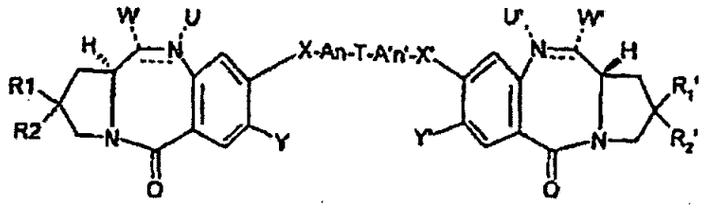
Publicada:

— *Con informe de búsqueda internacional.*

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, se hace referencia a "Notas de Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada índice regular del Boletín PCT.

WO 2007/085930 A1

(54) Título: AGENTES CITOTÓXICOS QUE COMPRENDEN NUEVOS DERIVADOS DE TOMAIMICINA Y SU USO TERAPÉUTICO



(I)

(57) Resumen: La presente invención se refiere a nuevos derivados de tomaimicina, a su procedimiento de preparación y a sus usos terapéuticos

AGENTES CITOTÓXICOS QUE COMPRENDEN NUEVOS DERIVADOS DE TOMAIMICINA

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos agentes citotóxicos y a su uso terapéutico. Más específicamente, la invención se refiere a nuevos agentes citotóxicos que comprenden derivados de tomaimicina y a su uso terapéutico. Estos nuevos agentes citotóxicos tienen utilidad terapéutica como resultado de la liberación de los derivados de tomaimicina en una población específica de células de una manera dirigida por medio de la asociación química del derivado de tomaimicina con un agente de unión a las células.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Se han descrito muchos intentos de dirigir específicamente conjugados anticuerpo-fármaco a células tumorales (Sela *et al.*, en *Immunoconjugates* 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose *et al.*, en *Targeted Drugs* 1-22 (E. Goldberg, ed. 1983); Diener et al, en *Antibody mediated delivery systems,* 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al, en *Antibody mediated delivery systems,* 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol et al, en *Antibody mediated delivery systems,* 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988); G.A. Pietersz & K. Krauer, 2, *J. Drug Targeting*, 183-215 (1994); R. V. J. Chari, 31 *Adv. Drug Delivery Revs.*, 89-104 (1998); W.A. Blattler & R.V.J. Chari, en *Anticancer Agents, Frontiers in Cancer Chemotherapy*, 317-338, ACS Symposium Series 796; e I. Ojima et al eds, *American Chemical Society* 2001}. Todas las referencias y patentes citadas en este texto se incorporan como referencia.

Se han conjugado fármacos citotóxicos, tales como metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C y clorambucilo, con varios anticuerpos monoclonales murinos. En algunos casos, las moléculas del fármaco se unieron a las moléculas del anticuerpo a través de una molécula portadora intermedia, tal como albúmina sérica (Garnett *et al.*, 46 *Cancer Res.* 2407-2412 (1986); Ohkawa et al 23, *Cancer Immunol. Immunother.* 81-86 (1986); Endo *et al.*, 47 *Cancer Res.* 1076-1080 (1980)), dextrano (Hurwitz *et al.*, 2 *Appl. Biochem.* 25-35 (1980); Manabi *et al.*, 34 *Biochem. Pharmacol.* 289-291 (1985); Dillman et al, 46 *Cancer Res.,* 4886-4891 (1986); Shoval et al, 85, *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 8276-8280 (1988)), o ácido poliglutámico (Tsukada et al, 73, *J. Natl. Canc. Inst.,* 721-729 (1984); Kato et al 27 *J. Med. Chem.,* 1602-1607 (1984);

Tsukada et al, 52, *Br. J. Cancer,* 111-116 (1985)).

Se ha empleado una amplia red de tecnologías de enlazadores para la preparación de tales inmunoconjugados y se han investigado tanto enlazadores escindibles como no escindibles. En la mayoría de los casos, el potencial citotóxico total de los fármacos sólo podía observarse, sin embargo, si las moléculas de fármaco se podían liberar de los conjugados en el lugar diana de forma no modificada.

Uno de los enlazadores escindibles que se ha empleado para la preparación de conjugados anticuerpo-fármaco es un enlazador lábil a ácidos basado en el ácido *cis*-aconítico que se aprovecha del medio ácido de los diferentes compartimentos intracelulares, tales como los endosomas encontrados durante la endocitosis mediada por receptores y los lisosomas. Shen y Ryser introdujeron este método para la preparación de conjugados de daunorubicina con vehículos macromoleculares (102 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1048-1054 (1981)). Yang y Reisfeld usaron la misma técnica para conjugar daunorubicina con un anticuerpo antimelanoma (80 *J. Natl. Canc. Inst.* 1154-1159 (1988)). Dillman *et al.* también usaron un enlazador lábil a ácidos de forma similar para preparar conjugados de daunorubicina con un anticuerpo anti-célula T (48 *Cancer Res.* 6097-6102 (1988)).

Un enfoque alternativo, explorado por Trouet *et al.*, implica unir la daunorubicina con un anticuerpo a través de un puente espaciador peptídico (79 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 626-629 (1982)). Esto se hizo con la premisa de que el fármaco libre podría liberarse de tal conjugado por acción de las peptidasas lisosomales.

Sin embargo, los ensayos de citotoxicidad *in vitro* han demostrado que los conjugados anticuerpo-fármaco raramente alcanzan la misma potencia citotóxica que los fármacos libres sin conjugar. Esto sugirió que los mecanismos a través de los que las moléculas de fármaco se liberan de los anticuerpos eran muy ineficaces. En el área de las inmunotoxinas, los conjugados formados mediante puentes disulfuro entre anticuerpos monoclonales y toxinas proteicas catalíticamente activas mostraron ser más citotóxicos que los conjugados que contenían otros enlazadores. Véanse Lambert *et al.*, 260 *J. Biol. Chem.* 12035-12041 (1985); Lambert *et al.*, en *Immunotoxins* 175-209 (A. Frankel, ed. 1988); Ghetie et al, 48, *Cancer Res.* 2610-2617 (1988). Esto se atribuyó a la elevada concentración intracelular de glutatión que contribuye a una escisión eficaz del enlace disulfuro entre una molécula de

anticuerpo y una toxina. A pesar de esto, solo se han descrito unos pocos ejemplos de la utilización de puentes disulfuro para la preparación de conjugados entre fármacos y macromoléculas. Shen *et al.* (260 *J. Biol. Chem.* 10905-10908 (1985)) describieron la conversión de metotrexato en un derivado de mercaptoetilamida seguido por conjugación con poli-D-lisina mediante un enlace disulfuro. Otro informe describió la preparación de un conjugado de la caliqueamicina, fármaco tóxico que contiene trisulfuro, con un anticuerpo (Hinman *et al.*, 53 *Cancer Res.* 3336-3342 (1993)).

Una razón para la falta de conjugados anticuerpo-fármaco unidos por disulfuro es la falta de disponibilidad de fármacos citotóxicos que tengan un resto que contiene un átomo de azufre que pueda utilizarse fácilmente para unir el fármaco a un anticuerpo a través de un puente disulfuro. Además, es difícil la modificación química de los fármacos existentes sin disminuir su potencial citotóxico.

Otra desventaja principal de los conjugados anticuerpo-fármaco existentes es su incapacidad para suministrar una concentración suficiente de fármaco en el lugar diana debido al número limitado de antígenos dirigidos y la citotoxicidad relativamente moderada de los fármacos canceroestáticos como metotrexato, daunorubicina y vincristina. Con el fin de obtener una citotoxicidad significativa, se hace necesaria la unión de un gran número de moléculas de fármaco, bien directamente al anticuerpo o mediante una molécula portadora polimérica. Sin embargo, tales anticuerpos modificados de forma importante presentan a menudo una unión debilitada con el antígeno diana y un aclaramiento rápido del flujo sanguíneo *in vivo*.

A pesar de las dificultades descritas anteriormente, se han descrito agentes citotóxicos útiles que comprenden restos de unión a las células y el grupo de fármacos citotóxicos conocidos como maitansinoides (documentos USP 5.208.020, USP 5.416.064 y R. V. J. Chari, 31 *Advanced Drug Delivery Reviews* 89-104 (1998)). De manera similar, también se han descrito agentes citotóxicos útiles que comprenden restos de unión a las células y análogos y derivados del potente antibiótico antitumoral CC-1065 (documentos USP 5.475.092, USP 5.585.499 y USP 6.756.397).

Los derivados de tomaimicina son pirrolo[1,4]benzodiazepinas (PBD), una clase conocida de compuestos que ejercen sus propiedades biológicas por medio de la unión covalente al N2 de guanina en el surco menor del ADN. Las PBD

incluyen varios agentes de unión al surco menor tales como antramicina, neotramicina y DC-81. Sin embargo, la actividad antitumoral de la tomaimicina está limitada debido a su toxicidad no específica para las células normales. De esta manera, existe la necesidad de aumentar la actividad terapéutica y disminuir los efectos tóxicos no específicos de los compuestos de tomaimicina. Los presentes inventores han demostrado que esta necesidad puede satisfacerse por la liberación dirigida de compuestos de tomaimicina por medio de su asociación con agentes de unión a las células. Además, existe la necesidad de crear derivados de tomaimicina que sean solubles y estables en soluciones acuosas. Además, la tomaimicina no es suficientemente potente como para usarse en conjugados de agentes de unión a las células.

Recientemente se han descrito algunos derivados de PBD y su actividad antitumoral en modelos preclínicos (documentos WO 00/12508 y WO2005/085260). Sin embargo, los ensayos clínicos iniciales realizados en seres humanos indican que los compuestos de esta clase son muy tóxicos, basándose en la baja dosis que puede administrarse a los seres humanos (I. Puzanov, Proc. AACR-NCI-EORTC International Conference, Philadelphia, USA 2005, Abstract #B117). Por lo tanto, es deseable proporcionar derivados alternativos que sean más potentes y/o puedan unirse a agentes de unión a las células.

Por consiguiente, es muy necesario un método para tratar enfermedades con derivados de tomaimicina en el que sus efectos colaterales se reduzcan sin comprometer su citotoxicidad.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Como se describe en una primera realización, un objeto de la presente invención es proporcionar derivados de tomaimicina que son altamente tóxicos pero que pueden usarse eficazmente en el tratamiento de muchas enfermedades.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar nuevos derivados de tomaimicina, que opcionalmente se pueden unir o unidos a un agente de unión a las células.

En un segundo modo de realización, la presente invención proporciona una composición terapéutica que comprende:

(A) una cantidad eficaz de uno o más derivados de tomaimicina que opcionalmente se pueden unir o unidos a un agente de unión a las células, y

grupos tioéter, grupos ácido lábiles, grupos fotolábiles, grupos peptidasa lábiles y grupos esterasa lábiles. Se prefieren los grupos disulfuro y tioéter.

Cuando el grupo de unión es un grupo que contiene tiol, sulfuro (o el denominado tioéter –S-) o disulfuro (-S-S-), la cadena lateral que tiene el grupo tiol, sulfuro o disulfuro puede ser lineal o ramificada, aromática o heterocíclica. Los especialistas en la técnica pueden identificar fácilmente cadenas laterales adecuadas.

Preferiblemente, dicho enlazador es de fórmula:

–G-D-(Z)p-S-Z'

en la que

G es un enlace sencillo o un doble enlace, –O-, -S- o –NR-;

D es un enlace sencillo o –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-;

donde E y F son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre –$(OCH_2CH_2)_i$Alquil$(OCH_2CH_2)_j$- lineal o ramificado, -Alquil$(OCH_2CH_2)_i$-Alquil-, -$(OCH_2CH_2)_i$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Cicloalquil$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Heterocíclico$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Aril$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Heteroaril$(OCH_2CH_2)_j$-, –Alquil-$(OCH_2CH_2)_i$Alquil$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alquil-$(OCH_2CH_2)_i$-, -Alquil-$(OCH_2CH_2)_i$Cicloalquil$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alquil$(OCH_2CH_2)_i$Heterocíclico$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alquil-$(OCH_2CH_2)_i$Aril$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alquil$(OCH_2CH_2)_i$Heteroaril$(OCH_2CH_2)_j$-, -Cicloalquil-Alquil-, -Alquil-Cicloalquil-, -Heterocíclico-Alquil-, -Alquil-Heterocíclico-, -Alquil-Aril-, -Aril-Alquil-, -Alquil-Heteroaril-, -Heteroaril-Alquil-;

donde i y j, iguales o diferentes, son números enteros y se eligen independientemente entre 0, 1 a 2000;

Z es -Alquil- lineal o ramificado;

p es 0 ó 1;

Z' representa H, un grupo protector de tiol tal como COR, R_{20} o SR_{20}, donde R_{20} representa H, metilo, Alquilo, Cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo, heteroarilo o un grupo heterocíclico, con la condición de que cuando Z' es H, dicho compuesto

esté en equilibrio con el compuesto correspondiente formado por ciclación intramolecular producida por la adición del grupo tiol –SH al enlace imina –NH= de uno de los restos PBD.

• n, n', iguales o diferentes, son 0 ó 1.

• q es 0, 1 ó 2,

• R, R' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre H, Alquilo, Arilo, estando cada uno de ellos opcionalmente sustituido con Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, Arilo, Het;

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

La presente invención se refiere a las siguientes realizaciones preferidas o a cualquier combinación de cualquiera de ellas:

- G es un enlace sencillo o –O- o –NR-;
- G es –O-;
- D es un enlace sencillo o –E-, -E-NR-CO-, -ECO-, -CO-E-;
- D es –E-, -E-NR-CO-;.
- D es -E-NR-CO-;
- E es –Alquil- lineal o ramificado, $-(OCH_2CH_2)_i-$ o –Alquil-heterocíclico;
- E es –Alquil- lineal o ramificado;
- Z es $-(CH_2)_2-C(CH_3)_2-$;
- p es 0 ó 1;
- Z' es H o SR_{20}, donde R_{20} representa Alquilo, arilo, un grupo heterocíclico o heteroarilo;
- Z' es H o SR_{20}, donde R_{20} representa Alquilo.

Los ejemplos específicos de los enlazadores que contienen tiol, sulfuro o disulfuro incluyen

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_y(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t(OCO)(R_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t(CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t(CONR_{19})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-furil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-tienil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$piperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-N-metilpiperazin--$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-furil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-tienil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-N-metilpiperazino-QSZ', o

$-O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-O(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-O(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-O-fenil-QSZ', -O-furil-QSZ', -O-oxazolil-QSZ', -O-tiazolil-QSZ', -O-tienil-QSZ', -O-imidazolil-QSZ', -O-morfolino-QSZ', -O-piperazino-QSZ', -O-N-metilpiperazino-QSZ',

$-OCO(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)_v(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-OCO-(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-OCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-OCO-fenil-QSZ', -OCO-furil-QSZ', -OCO-oxazolil-QSZ', -OCO-tiazolil-QSZ', -OCO-tienil-QSZ', -OCO-imidazolil-QSZ', -OCO-morfolino-QSZ', -OCO-piperazino-QSZ', -OCO-N-metilpiperazino-QSZ', o

$-CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-CO-(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-CO-fenil-QSZ', -CO-furil-QSZ', -CO-oxazolil-QSZ', -CO-tiazolil-QSZ', -CO-tienil-QSZ', -CO-imidazolil-QSZ', -CO-morfolino-QSZ', -CO-piperazino-QSZ', -CO-piperidino-QSZ', -CO-N-metilpiperazino-QSZ',

$-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

185

$-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO$-fenil-QSZ', $-NR_{19}CO$-furil-QSZ', $-NR_{19}CO$-oxazolil-QSZ', $-NR_{19}CO$-tiazolil-QSZ', $-NR_{19}CO$-tienil-QSZ', $-NR_{19}CO$-imidazolil-QSZ', $-NR_{19}CO$-morfolino-QSZ', $-NR_{19}CO$-piperazino-QSZ', $-NR_{19}CO$-piperidino-QSZ', $-NR_{19}CO$-N-metilpiperazino-QSZ',
$-NR_{19}$-fenil-QSZ', $-NR_{19}$-furil-QSZ', $-NR_{19}$-oxazolil-QSZ', $-NR_{19}$-tiazolil-QSZ', $-NR_{19}$-tienil-QSZ', $-NR_{19}$-imidazolil-QSZ', $-NR_{19}$-morfolino-QSZ', $-NR_{19}$-piperazino-QSZ', $-NR_{19}$-piperidino-QSZ', $-NR_{19}$-N-metilpiperazino-QSZ',
$-NR_{19}CO-NR_{12}$-fenil-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-oxazolil-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-tiazolil-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-tienil-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-piperidino-QSZ',

$-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-SCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-SCO-morfolino-QSZ', -SCO-piperazino-QSZ', -SCO-piperidino-QSZ', y -SCO-N-metilpiperazino-QSZ', donde:

Z' es H, un grupo protector de tiol tal como COR, R_{20}' o SR_{20}' donde R_{20}' representa H, alquilo, arilo, un grupo heterocíclico o heteroarilo,

donde Q es un enlace directo o un grupo alquilo lineal o alquilo ramificado que tiene 1-10 átomos de carbono o un espaciador de polietilenglicol con 2 a 20 unidades de repetición etileno oxi;

R_{19} y R_{12} son iguales o diferentes y son alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, o un grupo arilo o heterocíclico simple o sustituido, y R_{12} puede ser además H,

R_{13}, R_{14}, R_{15} y R_{16} son iguales o diferentes y son H o un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono,

R_{17} y R_{18} son H o alquilo,

u es un número entero de 1 a 10 y también puede ser 0,

t es un número entero de 1 a 10 y también puede ser 0,

y es un número entero de 1 a 20 y puede ser también 0,

Cuando un compuesto de fórmula (I) está en forma de un ión (por ejemplo

sulfonato), puede estar presente el contraión (por ejemplo Na^+ o K^+).

De acuerdo con un aspecto preferido, los compuestos de la invención son los de fórmula (I) en la que T= arilo opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, y/o enlazador(es) y A, A', X, X', U, U', W, W', m, m', n, n', ----, ⎯⎯ son como se han definido anteriormente.

De acuerdo con otro aspecto preferido, los compuestos de la invención se seleccionan entre el grupo que consiste en:

8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-metoxi-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[1,4-butanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[2,6-piridinadiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropiloxi)-2,6-piridinadiilbis-(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(3-aminopropiloxi)-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bencenodiilbis-(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-{5-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)propiloxi]-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)}-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

éster terc-butílico del ácido bis-{2-[(S)-2-metileno-7-metoxi-5-oxo-1,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi]-etil}-carbámico

8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-butoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-

(89

piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

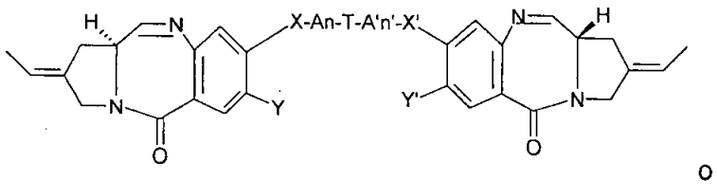
8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

así como los derivados de mercapto correspondientes,

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

Los compuestos preferidos son los de fórmula:



o

Como se usa en este documento, la expresión "enlazado a un agente de unión a las células" se refiere a la molécula conjugada que comprende al menos un derivado de tomaimicina unido a un agente de unión a las células mediante un grupo de unión adecuado, o un precursor del mismo; siendo los grupos de unión preferidos enlaces tiol o disulfuro, o precursores de los mismos.

Como se usa en este documento, el "precursor" de un grupo dado se refiere a cualquier grupo que pueda conducir a ese grupo mediante cualquier reacción de desprotección, modificación química o acoplamiento.

Como se usa en este documento, el término "paciente" se refiere a un animal, tal como un animal valioso para cría, compañía o conservación, o preferiblemente un ser humano o un niño que padece o que puede padecer una o más enfermedades y afecciones descritas en este documento.

Como se usa en este documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto de la presente invención que es eficaz para prevenir, reducir, eliminar, tratar o controlar los síntomas de las enfermedades y afecciones descritas en este documento. El término "controlar" pretende referirse a todos los procesos en los que existe un retraso, interrupción, detención o parada de la progresión de las enfermedades y afecciones descritas en este documento, pero no indica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas de la enfermedad o afección, y pretende incluir tratamiento profiláctico.

Como se usa en este documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos, materiales, excipientes, composiciones o formas de dosificación que, dentro del alcance del juicio médico, son adecuados para ponerse en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin provocar toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesivas u otras complicaciones problemáticas en proporción a una relación beneficio/riesgo razonable.

Como se usa en este documento, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos donde el compuesto parental se modifica preparando sales de ácidos o bases del mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o la sales de amonio cuaternario del compuesto parental formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales incluyen las obtenidas a partir de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico,

190

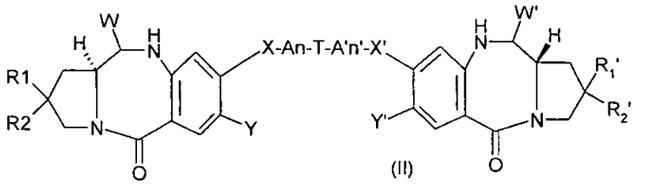
tartárico, cítrico, metanosulfónico, bencenosulfónico, glucurónico, glutámico, benzoico, salicílico, toluenosulfónico, oxálico, fumárico, maleico, láctico y similares. Otras sales de adición incluyen sales de amonio tales como trometamina, meglumina, epolamina, etc., sales de metales tales como sodio, potasio, calcio, cinc o magnesio.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto parental que contiene un resto básico o ácido por métodos químicos convencionales. En general, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada o del ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. En general, se prefieren medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Listas de sales adecuadas se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, página 1418, cuya descripción se incorpora en este documento como referencia.

Los compuestos de fórmula general (I) que tienen isómeros geométricos y estereoisómeros también son una parte de la invención.

Se sabe que el doble enlace N-10, C-11 de los derivados de tomaimicina de fórmula (I) puede convertirse fácilmente y de manera reversible en los aductos de imina correspondientes en presencia de agua, un alcohol, un tiol, una amina primaria o secundaria, urea y otros nucleófilos. Este proceso es reversible y puede regenerar fácilmente los derivados de tomaimicina correspondientes en presencia de un agente de deshidratación, en un disolvente orgánico no prótico, al vacío o a temperaturas elevadas (Z. Tozuka, 36, *J. Antibiotics*, 276 (1983).

Por lo tanto, esta invención también proporciona derivados reversibles de derivados de tomaimicina de fórmula general (II):



en la que A, X, Y, n, T, A', X', Y', n', R1, R2, R1', R2' son como se han definido en la fórmula (I) y W, W' son iguales o diferentes y se seleccionan entre el grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (por ejemplo un acetato), tal como -OCOR, -COOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como –OCONRR', un carbamato cíclico, tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, una urea tal como –

191

NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -SH, un sulfuro tal como -SR, un sulfóxido tal como -SOR, una sulfona tal como -SOOR, un sulfonato tal como $-SO_3^-$, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como –NRR', opcionalmente amina cíclica tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como –NRCOR, -NRCONRR', un azido tal como $-N_3$, un ciano, un halo, un trialquilo o triarilfosfonio, un grupo derivado de aminoácido. Preferiblemente, W y W' son iguales o diferentes y son OH, OMe, OEt, $NHCONH_2$, SMe.

Por lo tanto, los compuestos de fórmula (II) pueden considerarse como solvatos, incluyendo el agua cuando el disolvente es agua; estos solvatos pueden ser particularmente útiles.

De acuerdo con otro aspecto adicional, la presente invención también es de interés con el proceso de preparación de los compuestos de fórmula (I).

Los compuestos y procesos de la presente invención pueden prepararse por varias rutas bien conocidas por los especialistas en la técnica. Los compuestos pueden sintetizarse, por ejemplo, por aplicación o adaptación de los métodos que se describen a continuación, o variaciones de los mismos que puedan apreciarse por los especialistas en la técnica. Las modificaciones y sustituciones apropiadas serán muy obvias y se conocerán bien o podrán obtenerse fácilmente a partir de la bibliografía científica por los especialistas en la técnica.

En particular, tales métodos pueden encontrarse en R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH Publishers, 1999.

Se apreciará que los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricamente sustituidos, y pueden aislarse en formas ópticamente activa o racémica. Por lo tanto, se desean todas las formas quirales, diastereoméricas y racémicas y todas las formas isoméricas geométricas de una estructura, a menos que se indique específicamente la estereoquímica específica o la forma isomérica. Se sabe bien en la técnica cómo preparar y aislar tales formas ópticamente activas. Por ejemplo, pueden separarse mezclas de estereoisómeros por técnicas convencionales que incluyen, pero sin limitación, resolución de formas racémicas, cromatografía normal, de fase inversa y quiral, formación de sales preferencial, recristalización, y similares, o por síntesis quiral a partir de materiales de partida quirales o por síntesis deliberada de centros quirales diana.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante una diversidad de rutas sintéticas. Los reactivos y materiales de partida están disponibles

en el mercado, o se sintetizan fácilmente por técnicas bien conocidas por un especialista en la técnica. Todos los sustituyentes, a menos que se indique otra cosa, son como se han definido anteriormente.

En las reacciones descritas en adelante, puede ser necesario proteger los grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxi, amino, imino, tio o carboxi, cuando se desean en el producto final, para evitar su participación indeseada en las reacciones. Pueden usarse grupos protectores convencionales de acuerdo con la práctica convencional, para ejemplos, véase T.W. Greene y P. G. M. Wuts en *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3ª ed., John Wiley y Sons, 1999; J. F. W. McOmie en *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, 1973.

Algunas reacciones pueden realizarse en presencia de una base. No existe ninguna restricción particular sobre la naturaleza de la base a usar en esta reacción, y puede usarse aquí igualmente cualquier base usada convencionalmente en reacciones de este tipo, con la condición de que no afecte de forma adversa a las otras partes de la molécula. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen: hidróxido sódico, carbonato potásico, trietilamina, hidruros de metales alcalinos, tales como hidruro sódico e hidruro potásico; compuestos de alquillitio, tales como metillitio y butillitio; y alcóxidos de metales alcalinotérreos, tales como metóxido sódico y etóxido sódico.

Normalmente, las reacciones se realizan en un disolvente adecuado. Puede usarse una diversidad de disolventes, con la condición de que no afecte de forma adversa a la reacción o a los reactivos implicados. Los ejemplos de disolventes adecuados incluyen: hidrocarbonos, que pueden ser hidrocarbonos aromáticos, alifáticos o cicloalifáticos, tales como hexano, ciclohexano, benceno, tolueno y xileno; amidas, tales como dimetilformamida; alcoholes tales como etanol y metanol y éteres, tales como éter dietílico y tetrahidrofurano.

Las reacciones pueden realizarse en un amplio intervalo de temperaturas. En general, se encuentra conveniente realizar la reacción a una temperatura de -20ºC a 150ºC (más preferiblemente de aproximadamente la temperatura ambiente a 100ºC). El tiempo requerido para la reacción también puede variar ampliamente, dependiendo de muchos factores, en particular de la temperatura de reacción y de la naturaleza de los reactivos. Sin embargo, si la reacción se realiza en las condiciones preferidas indicadas anteriormente, normalmente será suficiente un periodo de 3 horas a 20 horas.

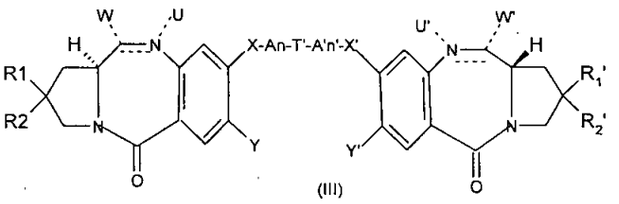
El compuesto preparado de esta manera puede recuperarse de la mezcla de reacción por medios convencionales. Por ejemplo, los compuestos pueden recuperarse

193

mediante retirada por destilación del disolvente de la mezcla de reacción o, si es necesario después de la retirada por destilación del disolvente de la mezcla de reacción, vertiendo el residuo en agua seguido de la extracción con un disolvente orgánico immiscible en agua y retirando por destilación el disolvente del extracto. Además, si se desea, el producto puede purificarse adicionalmente mediante diversas técnicas bien conocidas, tales como recristalización, reprecipitación o las diversas técnicas de cromatografía, en particular cromatografía en columna o cromatografía preparativa de capa fina.

El proceso de preparación de un compuesto de fórmula (I) de la invención es un objeto adicional de la presente invención.

De acuerdo con un primer aspecto, el proceso de preparación de los compuestos de fórmula (I) comprende la etapa de desproteger los compuestos correspondientes de fórmula (III):

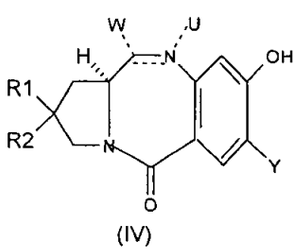


(III)

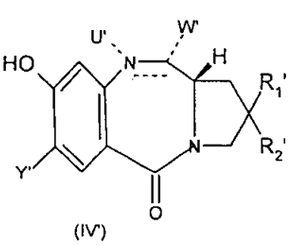
en la que Y, Y', X, A, A', X', n, n', W, W', U, U', ----, R1, R2, R1', R2', ---- son como se han definido en la fórmula (I) y T' se corresponde con T donde el/los grupo(s) funcional(es) se ha(n) protegido.

Preferiblemente, la función SH se protege y preferiblemente el grupo protector es acetilo, benzoílo, metanosulfonilo, metiltio, piridiltio, nitropiridiltio, triisopropilsililo (TIPS). En general, la etapa de desprotección se realiza usando condiciones clásicas tales como una base para retirar los grupos protectores de acetilo, benzoílo y metanosulfonilo, un agente reductor tal como ditiotreitol o tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) para escindir un grupo protector de metiltio o de manera conocida haciendo reaccionar los compuestos con un fluoruro de amonio para retirar el TIPS.

Los compuestos de fórmula (II) pueden obtenerse a partir del acoplamiento de compuestos correspondientes de fórmulas (IV), (IV') y (V):



(IV)



(IV')

Lg-An-T'-A'n'-Lg

(V)

donde Y, Y', A, A', n, n', T', W, W', U, U', ----, ⎯⎯, R1, R2, R1', R2' son como se han definido en la fórmula (III), y Lg es un grupo saliente tal como un halógeno, OMs, OTs o $OPPh_3^+$ (intermedio formado en una reacción de Mitsunobu)

Los compuestos de fórmula (IV) y (IV') son generalmente compuestos conocidos, como se describe por ejemplo en las solicitudes de patente WO 00/12508, WO 00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260, o están disponibles en el mercado, y/o están disponibles por síntesis total (M. Mori et al, 42 *Tetrahedron*, 3793-3806, 1986) o se producen por especies de Streptomyces, en particular, siguiendo el procedimiento de la patente de Francia Fr. 1.516.743 o pueden prepararse por aplicación o adaptación de los procedimientos ilustrativos dados en los ejemplos.

Los compuestos de fórmula (V) pueden obtenerse a partir de compuestos correspondientes de fórmula (VI):

HO-An-T'-A'n'-OH (VI)

en la que A, A', n, n', T' son como se han definido en la fórmula (III).

Esta reacción se realiza generalmente en presencia de PPh_3 y $CHal_4$ o por reacción con un clorosulfonato en presencia de una base tal como trietilamina o hidróxido potásico, preferiblemente trietilamina.

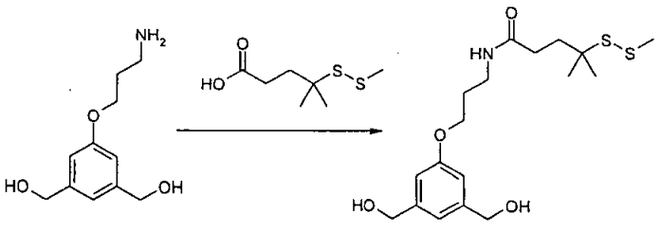
Los compuestos de fórmula (VI) pueden obtenerse a partir de compuestos correspondientes de fórmula (VII):

HO-An-T''-A'n'-OH (VII)

en la que A, A', n, n' son como se han definido en la fórmula (III) y T'' es un grupo precursor de T.

Un grupo precursor de T se refiere a cualquier grupo que pueda conducir a T mediante cualquier desprotección, modificación química o acoplamiento. Preferiblemente, T se obtiene por acoplamiento de T' con la porción complementaria, donde T' y la porción complementaria comprenden funciones que son reactivas entre sí, por ejemplo, T' comprende una función amina y la porción complementaria comprende una función ácido.

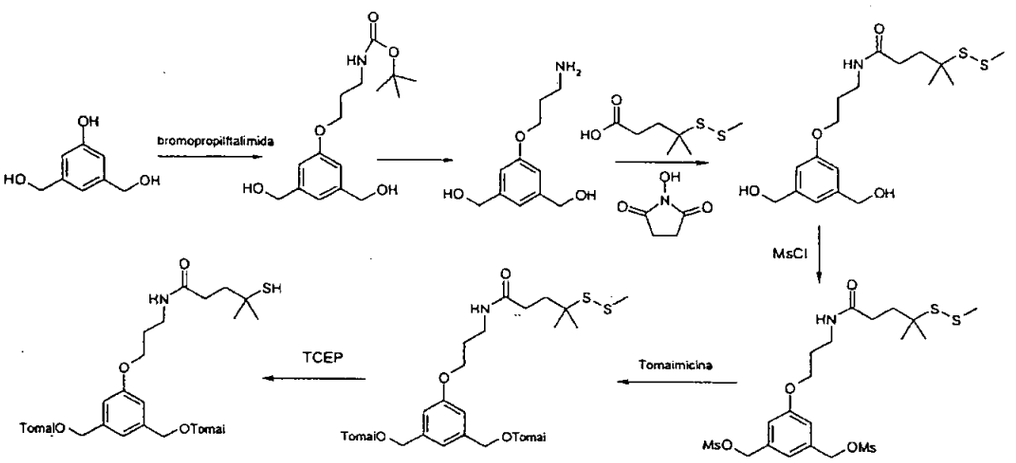
Un ejemplo representativo para esta reacción es:



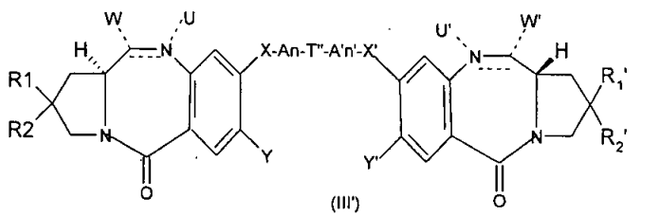
En general, esta reacción se realiza en presencia de N-hidroxisuccinimida y HOBT.

Los compuestos de fórmula (VII) pueden estar disponibles en el mercado o prepararse por adaptación o aplicación de métodos conocidos o de acuerdo con los ejemplos.

A continuación se da un esquema ejemplar, no limitante, para esta realización del proceso de la invención:



De acuerdo con un segundo aspecto, el compuesto de fórmula (I) puede obtenerse a partir del compuesto correspondiente de fórmula (III'):



en la que Y, Y', X, A, A', X', n, n', W, W', U, U', ----, ——, R1, R2, R1', R2' son

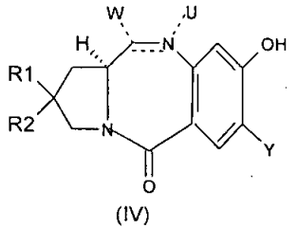
196

como se han definido en la fórmula (I) y T" es un grupo precursor opcionalmente protegido de T.

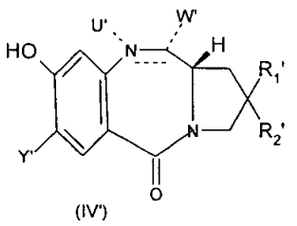
Un grupo precursor de T se refiere a cualquier grupo que pueda conducir a T por modificación química o acoplamiento. Preferiblemente, T se obtiene por acoplamiento de T' con la porción complementaria correspondiente, donde T' y la porción complementaria comprenden funciones que son reactivas entre sí, por ejemplo, T' comprende una función amina y la porción complementaria comprende una función ácido.

En general, esta reacción se realiza en presencia de: N-hidroxisuccinimida y HOBT.

El compuesto de fórmula (III') puede obtenerse por acoplamiento del compuesto correspondiente de fórmulas (IV), (IV') y (V'):



(IV)



(IV')

Lg-An-T"-A'n'-Lg

(V')

donde Y, Y', A, A', n, n', W, W', U, U', ----, ——, R1, R2, R1', R2' son como se han definido en la fórmula (III'), T" es un grupo precursor opcionalmente protegido de T y Lg es un grupo saliente, tal como halógeno o OMs, OTs o PPh_3^+ (intermedio formado en una reacción de Mitsunobu).

Los compuestos de fórmula (IV) y (IV') son generalmente compuestos conocidos y están disponibles por síntesis total (M. Mori et al, 42 *Tetrahedron*, 3793-3806, 1986) o se producen por especies de Streptomyces, en particular, siguiendo el procedimiento de la patente de Francia Fr. 1.516.743.

Los compuestos de fórmula (V') pueden obtenerse a partir de compuestos correspondientes de fórmula (VII):

HO-An-T"-A'n'-OH (VII)

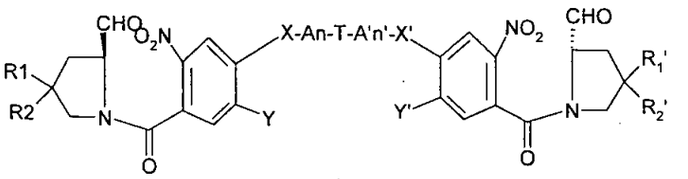
en la que A, A', n, n' son como se han definido en la fórmula (I), T" es un grupo precursor opcionalmente protegido de T'.

Esta reacción se realiza generalmente en presencia de PPh_3 y $CHal_4$.

Los compuestos de fórmula (VII) pueden estar disponibles en el mercado o pueden prepararse por adaptación o aplicación de métodos conocidos o de acuerdo

con los ejemplos.

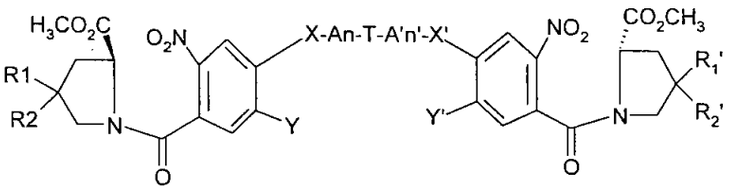
De acuerdo con un tercer aspecto, el proceso de preparación del compuesto de fórmula (I) comprende la etapa de ciclar el compuesto correspondiente de fórmula (VIII):



(VIII)

en la que Y, Y', X, A, A', X', n, n', R1, R2, R1', R2', T son como se han definido en la fórmula (I). En general, esta reacción se realiza en presencia de un reactivo tal como hidrosulfito sódico ($Na_2S_2O_4$), en un disolvente apropiado tal como una mezcla de THF y agua, seguido de la adición de metanol y AcCl.

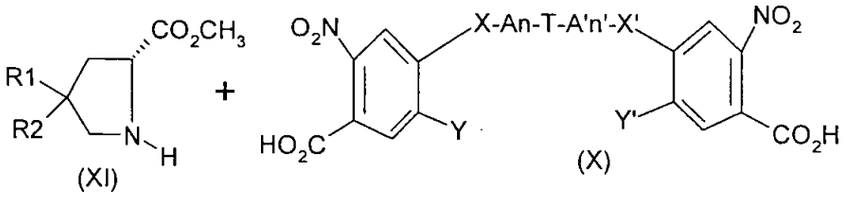
El compuesto de fórmula (VIII) puede obtenerse a partir del compuesto correspondiente de fórmula (IX):



(IX)

en la que Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T son como se han definido en la fórmula (I). En general, esta reacción se realiza en presencia de un reactivo tal como DIBAL-H en un disolvente apropiado, tal como tolueno.

El compuesto de fórmula (IX) puede obtenerse por acoplamiento de los compuestos correspondientes de fórmula (X) y (XI):



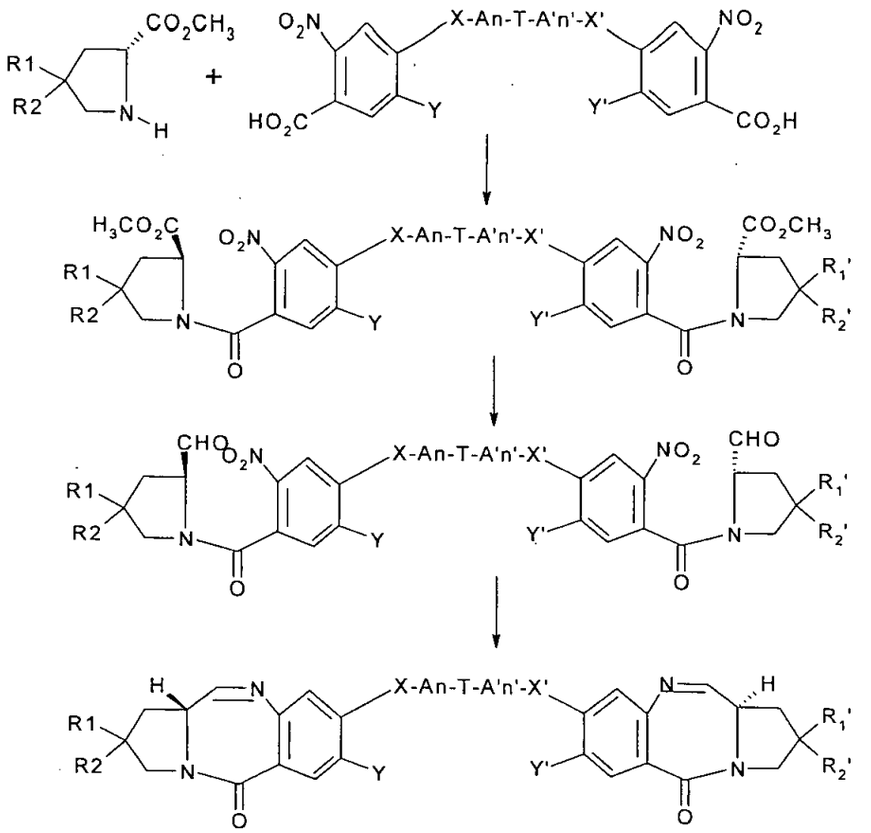
(XI) (X)

donde Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T son como se han definido en la fórmula (I).

En general, esta reacción se realiza mediante la adición a (X) de un reactivo

tal como cloruro de oxalilo en un disolvente apropiado, tal como DMF, seguido de adición de (XI) en un disolvente apropiado, tal como THF.

A continuación se da un esquema representativo:



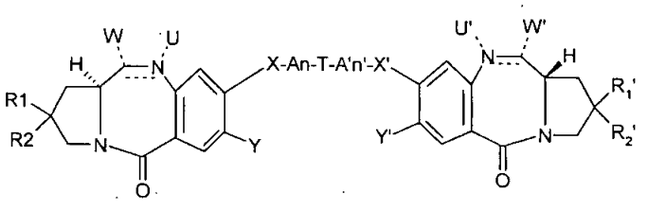
Las reacciones anteriores pueden realizarse por el especialista aplicando o adaptando los métodos ilustrados en los ejemplos que se muestran en lo sucesivo en este documento.

Además, el proceso de la invención también puede comprender la etapa adicional de aislar el compuesto de fórmula (I) y (II). Ésta puede realizarse por el especialista mediante cualquiera de los medios convencionales conocidos, tales como los métodos de recuperación descritos anteriormente.

Los productos de partida están disponibles en el mercado o pueden obtenerse aplicando o adaptando cualquiera de los métodos conocidos o los descritos en los ejemplos.

La síntesis también puede realizarse en un recipiente como una reacción multicomponente.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula conjugada que comprende al menos un derivado de tomaimicina unido a un agente de unión a las células a través de un grupo de unión. Dicho conjugado comprende uno o más derivados de tomaimicina de acuerdo con la invención que muestran un enlazador que comprende un grupo de unión, tal como –S- o –S-S-. Dicho grupo de unión se une covalentemente al agente de unión a las células con el enlazador del derivado de tomaimicina. De acuerdo con un aspecto preferido, dicho derivado de tomaimicina es de fórmula (I'):



(I')

en la que

---- representa un enlace sencillo opcional;

 representa un enlace sencillo o un doble enlace;

con la condición de que cuando  representa un enlace sencillo, U y U', iguales o diferentes, representan independientemente H, y W y W', iguales o diferentes, se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (por ejemplo un acetato), tal como -OCOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como –OCONRR', un carbamato cíclico, tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, una urea tal como –NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -SH, un sulfuro tal como -SR, un sulfóxido tal como -SOR, una sulfona tal como -SOOR, un sulfonato tal como $–SO_3^-$, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como –NRR', opcionalmente amina cíclica tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como –NRCOR, un azido tal como $–N_3$, un ciano, un halo, un trialquilo o triarilfosfonio, un grupo derivado de aminoácido; Preferiblemente W y W' son iguales o diferentes y son OH, OMe, OEt, $NHCONH_2$, SMe;

y cuando  representa un doble enlace, U y U' están ausentes y W y W' representan H;

• R1, R2, R1', R2' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre un Haluro o Alquilo opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het, $S(O)_qR$, o R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos un grupo que contiene un doble enlace =B y =B' respectivamente.

Preferiblemente, R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos un grupo que contiene un doble enlace =B y =B' respectivamente.

• B y B' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre Alquenilo que está opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het, $S(O)_qR$ o B y B' representan un átomo de oxígeno.

Preferiblemente, B=B'.

Más preferiblemente, B=B'= $=CH_2$ o $=CH-CH_3$,

• X, X' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre uno o más –O-, -NR-, -(C=O)-, $-S(O)_q-$.

Preferiblemente, X=X'.

Más preferiblemente, X=X'=O.

• A, A' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre Alquilo o Alquenilo, conteniendo cada uno de ellos opcionalmente un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno o un átomo de azufre y opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$, Arilo, Het, Alquilo, Alquenilo.

Preferiblemente, A=A'.

Más preferiblemente, A=A'=alquilo lineal sin sustituir.

• Y, Y' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre H, OR;

Preferiblemente, Y=Y'.

Más preferiblemente, Y=Y'=OAlquilo, más preferiblemente OMetilo.

• T es –Alquil-, -NR-, -O-, $-S(O)_q-$, o un grupo arilo de 4 a 10 miembros, cicloalquilo, un grupo heterocíclico o heteroarilo, estando cada uno de ellos opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, y sustituido con uno o más enlazadores.

Preferiblemente, T es un grupo arilo o heteroarilo de 4 a 10 miembros, más

preferiblemente fenilo o piridilo sustituido con uno o más enlazador(es).

Dicho enlazador comprende un grupo de unión. Los grupos de unión adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen grupos tiol, sulfuro, disulfuro, grupos tioéter, grupos ácido lábiles, grupos fotolábiles, grupos peptidasa lábiles y grupos esterasa lábiles. Se prefieren los grupos disulfuro y tioéter.

Cuando el grupo de unión es un grupo que contiene tiol-, sulfuro o disulfuro, la cadena lateral que tiene el grupo tiol o disulfuro puede ser lineal o ramificada, aromática o heterocíclica. Los especialistas en la técnica pueden identificar fácilmente cadenas laterales adecuadas. Preferiblemente, dicho enlazador es de fórmula:

$$-G\text{-}D\text{-}(Z)p\text{-}S\text{-}Z'$$

en la que

G es un enlace sencillo o un doble enlace, –O-, -S- o –NR-;

D es un enlace sencillo o –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-;

donde E y F son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre –$(OCH_2CH_2)_i$Alquil$(OCH_2CH_2)_j$- lineal o ramificado, -Alquil$(OCH_2CH_2)_i$-Alquil-, -$(OCH_2CH_2)_i$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Cicloalquil$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Heterocíclico$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Aril$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Heteroaril$(OCH_2CH_2)_j$-, –Alquil-$(OCH_2CH_2)_i$Alquil$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alquil-$(OCH_2CH_2)_i$-, -Alquil-$(OCH_2CH_2)_i$Cicloalquil$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alquil$(OCH_2CH_2)_i$Heterocíclico$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alquil-$(OCH_2CH_2)_i$Aril$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alquil$(OCH_2CH_2)_i$Heteroaril$(OCH_2CH_2)_j$-, -Cicloalquil-Alquil-, -Alquil-Cicloalquil-, -Heterocíclico-Alquil-, -Alquil-Heterocíclico-, -Alquil-Aril-, -Aril-Alquil-, -Alquil-Heteroaril-, -Heteroaril-Alquil-;

donde i y j, iguales o diferentes, son números enteros y se eligen independientemente entre 0, 1 a 2000;

Z es -Alquil- lineal o ramificado;

p es 0 ó 1;

Z' representa H, un grupo protector de tiol tal como COR, R_{20} o SR_{20}, donde R_{20}

representa H, metilo, Alquilo, Cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo, heteroarilo o un grupo heterocíclico, con la condición de que cuando Z' es H, dicho compuesto esté en equilibrio con el compuesto correspondiente formado por ciclación intramolecular producida por la adición del grupo tiol –SH al enlace imina –NH= de uno de los restos PBD.

• n, n', iguales o diferentes, son 0 ó 1, con m=m' y n=n'.

• q es 0, 1 ó 2,

• R, R' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre H, Alquilo, Arilo, estando cada uno de ellos opcionalmente sustituido con Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, Arilo, Het;

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros,

estando dicho derivado unido covalentemente a un agente de unión a las células a través de dicho enlazador.

La presente invención se refiere a las siguientes realizaciones preferidas o a cualquier combinación de cualquiera de ellas:

- G es un enlace sencillo o –O- o –NR-;
- G es –O-;
- D es un enlace sencillo o –E-, -E-NR-, -E-NR-CO-, -E-CO-, -CO-E-;.
- D es –E-, -E-NR-CO-, -CO-E-, -E-CO-;.
- D es -E-NR-CO-;
- E es –Alquil- lineal o ramificado, $-(OCH_2CH_2)_i-$ o –Alquil-heterocíclico;
- E es –Alquil- lineal o ramificado;
- Z es $-(CH_2)_2-C(CH_3)_2-$;
- p es 0 ó 1;
- Z' es H o SR_{20}, donde R_{20} representa Alquilo, arilo, un grupo heterocíclico o heteroarilo;

- Z' es H o SR_{20}, donde R_{20} representa Alquilo.

Los ejemplos específicos de los enlazadores que contienen tiol, sulfuro o disulfuro incluyen

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_y(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(OCO)(R_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CONR_{19})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-furil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-tienil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$piperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-N-metilpiperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-furil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-tienil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-N-metilpiperazino-QSZ', o

$-O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-O(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-O(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-O-fenil-QSZ', -O-furil-QSZ', -O-oxazolil-QSZ', -O-tiazolil-QSZ', -O-tienil-QSZ', -O-imidazolil-QSZ', -O-morfolino-QSZ', -O-piperazino-QSZ', -O-N-metilpiperazino-QSZ',

$-OCO(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)_v(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-OCO-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-OCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-OCO-fenil-QSZ', -OCO-furil-QSZ', -OCO-oxazolil-QSZ', -OCO-tiazolil-QSZ', -OCO-tienil-QSZ', -OCO-imidazolil-QSZ', -OCO-morfolino-QSZ', -OCO-piperazino-QSZ', -OCO-N-metilpiperazino-QSZ', o

$-CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-CO-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-CO-fenil-QSZ', -CO-furil-QSZ', -CO-oxazolil-QSZ', -CO-tiazolil-QSZ', -CO-tienil-QSZ', -CO-imidazolil-QSZ', -CO-morfolino-QSZ', -CO-piperazino-QSZ', -CO-piperidino-QSZ', -CO-N-metilpiperazino-QSZ',

$-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}$CO-fenil-QSZ', $-NR_{19}$CO-furil-QSZ', $-NR_{19}$CO-oxazolil-QSZ', $-NR_{19}$CO-tiazolil-QSZ', $-NR_{19}$CO-tienil-QSZ', $-NR_{19}$CO-imidazolil-QSZ', $-NR_{19}$CO-morfolino-QSZ', $-NR_{19}$CO-piperazino-QSZ', $-NR_{19}$CO-piperidino-QSZ', $-NR_{19}$CO-N-metilpiperazino-QSZ',
$-NR_{19}$-fenil-QSZ', $-NR_{19}$-furil-QSZ', $-NR_{19}$-oxazolil-QSZ', $-NR_{19}$-tiazolil-QSZ', $-NR_{19}$-tienil-QSZ', $-NR_{19}$-imidazolil-QSZ', $-NR_{19}$-morfolino-QSZ', $-NR_{19}$-piperazino-QSZ', $-NR_{19}$-piperidino-QSZ', $-NR_{19}$-N-metilpiperazino-QSZ',
$-NR_{19}CO-NR_{12}$-fenil-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-oxazolil-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-tiazolil-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-tienil-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-piperidino-QSZ',

$-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-SCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-SCO-morfolino-QSZ', -SCO-piperazino-QSZ', -SCO-piperidino-QSZ', y -SCO-N-metilpiperazino-QSZ', donde:

Z' es H, un grupo protector de tiol tal como COR, R_{20}' o SR_{20}' donde R_{20}' representa alquilo, arilo, grupo heterocíclico o heteroarilo;

donde Q es un enlace directo o un grupo alquilo lineal o alquilo ramificado que tiene de 1-10 átomos de carbono o un espaciador de polietilenglicol con 2 a 20 unidades de repetición etileno oxi;

R_{19} y R_{12} son iguales o diferentes y son alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, o un grupo arilo o

heterocíclico simple o sustituido, y R_{12} puede ser además H,

R_{13}, R_{14}, R_{15} y R_{16} son iguales o diferentes y son H o un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono,

R_{17}, y R_{18} son H o alquilo,

u es un número entero de 1 a 10 y también puede ser 0,

t es un número entero de 1 a 10 y también puede ser 0,

y es un número entero de 1 a 20 y puede ser también 0,

De acuerdo con este objeto, los compuestos representativos de fórmula (I') son:

- 8,8'-{5-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)propiloxi]-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)}-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

206

8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-butoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-

bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
así como los derivados de mercapto correspondientes,

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

Los agentes de unión a las células pueden ser de cualquier tipo e incluyen péptidos y no péptidos. En general, pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales) o un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión, linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas de transporte de nutrientes (tales como transferrina) o cualquier otra molécula o sustancia de unión a las células. Los ejemplos más específicos de agentes de unión a las células que pueden usarse incluyen: anticuerpos monoclonales; anticuerpos quiméricos; anticuerpos humanizados; anticuerpos totalmente humanos; anticuerpos monocatenarios; fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', $F(ab')_2$ y F_v {Parham, 131 *J. Immunol.* 2895-2902 (1983); Spring et al, 113 *J. Immunol.* 470-478 (1974); Nisonoff et al, 89 *Arch. Biochem. Biophys.* 230-244 (1960)}; interferones; péptidos; linfoquinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6; hormonas tales como insulina, TRH (hormonas liberadoras de tirotropina), MSH (hormona estimuladora de melanocitos), hormonas esteroideas, tales como andrógenos y estrógenos; factores de crecimiento y factores estimuladores de colonias tales como EGF, TGFα, factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF y GM-CSF {Burgess, 5 *Immunology Today* 155-158 (1984)}; vitaminas, tales como folato y transferrina {O'Keefe et al, 260 *J. Biol. Chem.* 932-937 (1985)}.

La expresión "agente de unión a las células" incluida en este documento también incluye agentes de unión a las células modificados, donde dicho agente de unión a las células se modifica por un agente de modificación para mejorar la reactividad de dicho agente de unión a las células con el grupo de unión del enlazador del derivado de tomaimicina. Dichos agentes de modificación incluyen N-sulfosuccinimidil-4-(5-nitro-2-piridilditio)butanoato (SSNPB), 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), N-hidroxisuccinimidil éster del ácido 4-(2-piridilditio)butanoico acid (SPDB) y similares

como se describe más adelante.

La tecnología de los anticuerpos monoclonales permite la producción de agentes de unión extremadamente selectivos en forma de anticuerpos monoclonales específicos. Son particularmente bien conocidos en la técnica las técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos por inmunización de ratones, ratas, hámsters o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés tal como la célula diana intacta, antígenos aislados a partir de la célula diana, virus enteros, virus enteros atenuados y proteínas virales tales como proteínas de la cubierta viral.

La selección del agente de unión a las células apropiado se elige dependiendo de la población celular particular que se vaya a fijar como diana, pero en general se prefieren los anticuerpos monoclonales si está disponible uno apropiado.

Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG_1 murino que se une específicamente al antígeno CD33 {J.D. Griffin et al 8 *Leukemia Res.*, 521 (1984)} y puede usarse si las células diana expresan CD33 como en la enfermedad de leucemia mielógena aguda (AML). Análogamente, el anticuerpo monoclonal anti-B4 es una IgG_1 murina que se une al antígeno CD19 en células B {Nadler et al, 131 *J. Immunol.* 244-250 (1983)} y puede usarse si las células diana son células B o células enfermas que expresan este antígeno tales como en linfoma no-Hodgkin o leucemia linfoblástica crónica. Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos MY9 y anti-B4 pueden ser murinos, quiméricos, humanizados o totalmente humanos.

Además, GM-CSF que se une a las células mielodes puede usarse como agente de unión a las células enfermas de la leucemia mielógena aguda. IL-2, que se une a células T activadas, puede usarse para la prevención del rechazo de injertos trasplantados, para la terapia y prevención de la enfermedad de injerto contra hospedador y para el tratamiento de la leucemia aguda de células T. MSH, que se une a los melanocitos, puede usarse para el tratamiento de melanoma.

Las moléculas conjugadas de la invención pueden formarse usando cualquier técnica. The derivados de tomaimicina de la invención pueden unirse a un anticuerpo u otro agente de unión a las células a través de un enlazador lábil a ácidos o por un enlazador fotolábil. Los derivados pueden condensarse con un péptido que tenga una secuencia adecuada y, posteriormente, unirse a un agente de unión a la célula para producir un enlazador lábil a peptidasa. Los conjugados

pueden prepararse de manera que contengan un grupo hidroxilo primario, que puede succinilarse y unirse a un agente de unión a las células para producir un conjugado que pueda escindirse por esterasas intracelulares para liberar el derivado libre. Preferiblemente, los derivados se sintetizan de manera que contengan un grupo tiol libre o protegido, y después uno o más derivados que contienen disulfuro o tiol se unen covalentemente al agente de unión a las células a través de un enlace disulfuro o un enlace tioéter.

En los documentos USP 5.416.064 y USP 5.475.092 se describen numerosos métodos de conjugación. El deriovado de tomaimicina se puede modificar para dar un grupo amino libre y luego unirse al anticuerpo o a otro agente de unión a las células mediante un enlazador lábil a ácidos o un enlazador fotolábil. Los derivados de tomaimicina con un grupo amino o carboxilo libre pueden condensarse con un péptido y, posteriormente, unirse a un agente de unión a las células para producir un enlazador lábil a peptidasas. The derivados de tomaimicina con un grupo hidroxilo libre en el enlazador pueden succinilarse y unirse a un agente de unión a las células para producir un conjugado que puede escindirse por esterasas intracelulares para liberar el fármaco libre. Más preferiblemente, los derivados de tomaimicina se tratan para crear un grupo tiol libre o protegido y luego los derivados de tomaimicina que contienen disulfuro o tiol se unen al agente de unión a la célula mediante enlaces disulfuro.

Son conjugados representativos de la invención anticuerpo-derivado de tomaimicina, fragmento de anticuerpo-derivado de tomaimicina, factor de crecimiento epidérmico (EGF)-derivado de tomaimicina, hormona estimuladora de melanocitos (MSH)-derivado de tomaimicina, hormona estimuladora del tiroides (TSH)-derivado de tomaimicina, estrógeno-derivado de tomaimicina, análogo de estrógeno-derivado de tomaimicina, andrógeno-derivado de tomaimicina, análogo de andrógeno-derivado de tomaimicina y folato-derivado de tomaimicina.

Los conjugados de derivado de tomaimicina y anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, hormonas proteicas o peptídicas, factores de crecimiento proteicos o peptídicos y otras proteínas se obtienen de la misma manera por métodos conocidos. Por ejemplo, los péptidos y anticuerpos pueden modificarse con reactivos de entrecruzamiento tales como 3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo, 4-(2-piridilditio)pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP), 4-succinimidyl-oxicarbonil-α-metil-α-(2-piridil ditio)-tolueno (SMPT), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato

(SDPB), piridil-ditiopropionato de succinimidilo (SPDP), N-hidrosuccinimidil éster del ácido 4-(2-piridilditio)butanoico (SPDB), 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-caboxilato de succinimidilo (SMCC), N-sulfosuccinimidil-3-(2-(5-nitro-piridilditio)butirato (SSNPB), 2-iminotiolano o anhídrido *S*-acetilsuccínico por métodos conocidos. Véanse, Carlsson *et al.*, 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978); Blattler *et al.*, 24 *Biochem.* 1517-1524 (1985); Lambert *et al.*, 22 *Biochem.* 3913-3920 (1983); Klotz *et al.*, 96 *Arch. Biochem. Biophys.* 605 (1962); y Liu et al, 18 *Biochem.* 690 (1979), Blakey y Thorpe, 1 *Antibody, Immunoconjugates & Radio-pharmaceuticals*, 1-16 (1988), Worrell et al 1 *Anti-Cancer Drug Design* 179-184 (1986). El agente de unión a la célula que contiene tiol libre o protegido obtenido de esta forma posteriormente se hace reaccionar con un derivado de tomaimicina que contiene disulfuro o tiol para producir los conjugados. Los conjugados se pueden purificar pr HPLC o por exclusión molecular.

Preferiblemente, los conjugados derivado de tomaimicina-anticuerpo monoclonal o derivado de tomaimicina-agente de unión a las células son los que están unidos mediante un enlace disulfuro, como se ha indicado anteriormente, que son capaces de liberar los derivados de tomaimicina. Tales conjugados de unión a la célula se preparan por métodos conocidos, tales como por modificación de los anticuerpos monoclonales con piridil-ditiopropionato de succinimidilo (SPDP) (Carlsson *et al.*, 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978)). El grupo tiopiridilo resultante después se desplaza por tratamiento con derivados de tomaimicina que contienen tiol para producir conjugados unidos por enlaces disulfuro. Alternativamente, en el caso de los arilditio-derivados de tomaimicina, la formación del conjugado de unión a las células se realiza por desplazamiento directo del aril-tiol del derivado de tomaimicina por grupos sulfhidrilo previamente introducidos en las moléculas de anticuerpo. Los conjugados que contienen de 1 a 10 fármacos de derivado de tomaimicina unidos mediante un puente disulfuro se preparan fácilmente por cualquier método.

Más específicamente, se trata una solución del anticuerpo modificado por ditio-nitropiridilo a una concentración de 2,5 mg/ml en solución tampón de fosfato potásico 0,05 M, a pH 7,5, que contiene EDTA 2 mM, con el derivado de tomaimicina que contiene tiol (1,3 eq. molares/grupo ditiopiridilo). La liberación de la tio-nitropiridina del anticuerpo modificado se sigue espectrofotométricamente a 325 nm y se completa en aproximadamente 16 horas. El conjugado derivado de tomaimicina-anticuerpo se purifica y se libera del fármaco sin reaccionar y otro material de bajo peso molecular por exclusión molecular a través de una columna de Sephadex G-25 o Sephacryl

S300. El número de restos de derivado de tomaimicina unidos por molécula de anticuerpo se puede determinar midiendo la relación entre la absorbancia a 230 nm y a 275 nm. Por este método se pueden unir mediante enlaces disulfuro una media de 1-10 moléculas de derivado de tomaimicina/molécula de anticuerpo.

El efecto de la conjugación sobre la afinidad de unión por las células que expresan el antígeno se puede determinar utilizando métodos descritos previamente por Liu et al., 93 Proc. Natl. Acad. Sci 8618-8623 (1996). La citotoxicidad de los derivados de tomaimicina y sus conjugados con anticuerpo contra líneas celulares se puede medir por retro-extrapolación de las curvas de proliferación celular como se describe en Goldmacher *et al.*, 135 *J. Immunol.* 3648-3651 (1985). La citotoxicidad de estos compuestos contra líneas de células adherentes se puede determinar por ensayos clonogénicos como se describe en Goldmacher *et al.*, 102 *J. Cell Biol.* 1312-1319 (1986).

Son conjugados representativos de la invención conjugados de derivados de tomaimicina con anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, factor de crecimiento epidérmico (EGF), hormona estimuladora de melanocitos (MSH), hormona estimuladora del tiroides (TSH), estrógenos, análogos de estrógenos, andrógenos y análogos de andrógenos.

A continuación se describen ejemplos representativos de la preparación de diversos conjugados de derivados y agentes de unión a las células.

Enlazadores disulfuro: Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG_1 murino que se une específicamente al antígeno CD33 {J.D. Griffin et al 8 Leukemia Res., 521 (1984)} y puede usarse si las células diana expresan CD33 como en la enfermedad de leucemia mielógena aguda (AML). Análogamente, el anticuerpo monoclonal anti-B4 es una IgG_1 murina que se une al antígeno CD19 en células B {Nadler et al, 131 J. Immunol. 244-250 (1983)} y puede usarse si las células diana son células B o células enfermas que expresan este antígeno tales como en linfoma no-Hodgkin o leucemia linfoblástica crónica.

Además, GM-CSF que se une a las células mieloides puede usarse como agente de unión a las células enfermas de la leucemia mielógena aguda. IL-2, que se une a células T activadas, puede usarse para la prevención del rechazo de injertos trasplantados, para la terapia y prevención de la enfermedad de injerto contra hospedador y para el tratamiento de la leucemia aguda de células T. MSH, que se une a los melanocitos, puede usarse para el tratamiento de melanoma.

El anticuerpo u otro agente de unión a las células se modifica con N-succinimidil-3-piridilditio propionato como se ha descrito previamente {J. Carlsson, H. Drevin & R. Axen, *Biochem. J.*, 173:723 (1978)} para introducir, en promedio, 4 grupos piridilditio por molécula de anticuerpo. El anticuerpo modificado se hace reaccionar con el derivado que contiene tiol para producir un conjugado unido por enlaces disulfuro.

Como alternativa, los conjugados pueden prepararse por aplicación y/o adaptación del método descrito en el documento WO2004/103272, cuyas enseñanzas se incluyen en este documento como referencia.

Enlazadores tioéter: Los derivados que contienen tiol de la presente invención pueden unirse a anticuerpos y otros agentes de unión a las células a través de un enlace tioéter como se ha descrito previamente (Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020). El anticuerpo u otro agente de unión a las células puede modificarse con un compuesto disponible en el mercado tal como 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato de *N*-succinimidilo (SMCC), *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amido-caproato), que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC). Estos reactivos de entrecruzamiento forman enlazadores no escindibles derivados de restos basados en maleimido.

Los reactivos de entrecruzamiento que comprenden un resto basado en haloacetilo incluyen *N*-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de *N*-succinimidilo (SIA), bromoacetato de *N*-succinimidilo (SBA) y 3-(bromo-acetamido)propionato de *N*-succinimidilo (SBAP). Estos reactivos de entrecruzamiento forman enlazadores no escindibles derivados de restos basados en haloacetilo.

Enlazadores Lábiles a Ácidos: Los derivados que contienen grupos amino de la presente invención pueden unirse a anticuerpos y otros agentes de unión a las células a través de un enlazador lábil a ácidos como se ha descrito previamente {W. A. Blattler et al, *Biochemistry* 24, 1517-1524 (1985); Patente de Estados Unidos N° 4.542.225, 4.569.789, 4.618.492, 4.764.368}.

Análogamente, un derivado que contiene grupos hidrazido de la presente invención puede unirse a la porción carbohidrato de anticuerpos y otros agentes de unión a las células a través de un enlazador de hidrazona lábil a ácidos {como ejemplos de enlazadores de hidrazona véase B. C. Laguzza et al, *J. Med. Chem.*,

32, 548-555 (1989); R. S. Greenfield et al, *Cancer Res.*, 50, 6600-6607 (1990)}.

Enlazadores Fotolábiles: Los derivados que contienen grupos amino de la presente invención pueden unirse a anticuerpos y otros agentes de unión a las células a través de un enlazador fotolábil como se ha descrito previamente {P. Senter et al, *Photochemistry y Photobiology*, 42, 231-237 (1985); Patente de Estados Unidos Nº 4.625.014}.

Enlazadores Lábiles a Peptidasas: Los derivados que contienen grupos amino de la presente invención también pueden unirse a agentes de unión a las células a través de espaciadores peptídicos. Se ha demostrado previamente que los espaciadores peptídicos cortos entre fármacos y soportes macromoleculares proteicos son estables en suero, pero se hidrolizan rápidamente por peptidasas intracelulares {A. Trouet et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 626-629 (1982)}. Los derivados que contienen grupos amino pueden condensarse con péptidos usando agentes de condensación tales como 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida-HCl (EDC-HCl) para dar un derivado peptídico que puede unirse a agentes de unión a las células.

Enlazadores Lábiles a Esterasas: Los derivados de la presente invención que llevan un grupo hidroxialquilo pueden succinilarse con anhídrido succínico y después unirse a un agente de unión a las células para producir un conjugado que puede escindirse por esterasas intracelulares liberando el fármaco libre. {Como ejemplos véase E. Aboud-Pirak et al, *Biochem Pharmacol.*, 38, 641-648 (1989)}.

Los conjugados preparados por los métodos anteriores pueden purificarse por técnicas de cromatografía convencionales tales como exclusión por tamaño, cromatografía de adsorción incluyendo, pero sin limitación, intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía sobre hidroxiapatita cerámica o Porapak, o por HPLC. También puede usarse la purificación por diálisis o diafiltración.

Preferiblemente, los conjugados entre anticuerpos monoclonales o agentes de unión a las células y derivados de la presente invención son los que se unen a través de un enlace disulfuro, como se ha descrito anteriormente. Tales conjugados de unión a la célula se preparan por métodos conocidos, tales como por modificación de los anticuerpos monoclonales con piridil-ditiopropionato de

succinimidilo (SPDP) {Carlsson *et al.*, 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978)}. El grupo tiopiridilo resultante se desplaza luego por tratamiento con un derivado que contiene tiol para producir conjugados enlazados por disulfuro. Por este método se preparan fácilmente conjugados que contienen de 1 a 10 derivados a través de un puente disulfuro. La conjugación por este método se describe con detalle en la Patente de Estados Unidos 5.585.499, que se incorpora como referencia.

De acuerdo con un aspecto preferido, el agente de unión a las células es un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal.

De acuerdo con otro aspecto preferido, el agente de unión a las células es un fragmento de anticuerpo con especificidad de antígeno, tal como sFV, Fab, Fab', o $F(ab')_2$.

De acuerdo con otro objeto, la presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula conjugada de la invención o un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otro objeto, la presente invención también se refiere a un método para destruir o inhibir el crecimiento de células, preferiblemente poblaciones celulares seleccionadas, que comprende poner en contacto células diana o tejidos que contienen células diana con una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

La población celular seleccionada consiste en células cancerosas y/o proliferativas.

De acuerdo con otro objeto, la presente invención también se refiere a un método de tratamiento, preferiblemente para el tratamiento selectivo de cánceres, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesite.

De acuerdo con la presente invención, "tratamiento selectivo de cánceres" se refiere a la destrucción de células cancerosas y/o proliferativas sustancialmente sin destruir células normales y/o no proliferativas.

De acuerdo con otro objeto, la presente invención también se refiere al uso de una molécula conjugada de la invención o un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cánceres.

El método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas puede ponerse en práctica *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Los ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de cultivos celulares para destruir todas las células excepto variantes deseadas que no expresen el antígeno diana; o para destruir variantes que expresan un antígeno indeseado.

Las condiciones de uso no clínico *in vitro* se determinan fácilmente por un especialista en la técnica.

Los ejemplos de usos *ex vivo* incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante en el mismo paciente para destruir células enfermas o malignas; y tratamientos de médula ósea antes de su trasplante para destruir células T competentes y prevenir la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD).

El tratamiento clínico *ex vivo* para retirar células tumorales o células linfoides de médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento de cánceres o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, o para retirar células T y otras células linfoides de médula ósea alogénica o de tejidos antes del trasplante para prevenir la GVHD, puede realizarse como se indica a continuación. Se recoge médula ósea del paciente u otro individuo y después se incuba en medio que contiene suero al que se añade el agente citotóxico de la invención, en concentraciones que varían de aproximadamente 10 μM a 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación (=dosis) se determinan fácilmente por el especialista en la técnica. Después de la incubación, las células de médula ósea se lavan con medio que contiene suero y se devuelven al paciente por infusión i.v. de acuerdo con métodos conocidos. En circunstancias en las que el paciente recibe otro tratamiento tal como un curso de quimioterapia ablativa o irradiación de todo el cuerpo entre el momento de la recolección de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de médula ósea se conservan congeladas en nitrógeno líquido usando un equipo médico convencional.

Para uso clínico *in vivo*, el agente citotóxico de la invención se suministrará como soluciones que se ensayan con respecto a la esterilidad y con respecto a los niveles de endotoxinas o como un sólido liofilizado que puede redisolverse en agua estéril para inyección. A continuación se proporcionan ejemplos de protocolos adecuados de administración de conjugados. Los conjugados se administran semanalmente durante 6 semanas como una embolada i.v. Las dosis en embolada se administran en 50 a 400 ml de solución salina normal a la que puede añadirse albúmina de suero humano (por ejemplo, de 0,5 a 1 ml de una solución concentrada

de albúmina de suero humano, 100 mg/ml). Las dosificaciones serán de aproximadamente 50 µg a 10 mg/kg de peso corporal por semana, i.v. (intervalo de 10 µg a 100 mg/kg por inyección). Seis semanas después de tratamiento, el paciente puede recibir un segundo curso de tratamiento. El especialista en la técnica puede determinar los protocolos clínicos específicos con respecto a la vía de administración, excipientes, diluyentes, dosificaciones, tiempos, etc., cuando lo permita la situación.

Los ejemplos de situaciones médicas que pueden tratarse de acuerdo con los métodos *in vivo* o *ex vivo* de destrucción de poblaciones celulares seleccionadas incluyen malignidad de cualquier tipo incluyendo, por ejemplo, cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario y órganos linfáticos; melanomas; enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazos de injertos tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante pulmonar, rechazo de trasplante cardiaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad de injerto contra hospedador; infecciones virales tales como infección por CMV, infección por VIH, SIDA etc.; infección bacteriana; e infecciones parasitarias tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y otras determinadas por un especialista en la técnica.

La identificación de los pacientes que necesitan tratamiento de las enfermedades y afecciones descritas en este documento está bien dentro de la capacidad y conocimiento del especialista en la técnica. Un veterinario o un médico especialistas en la técnica pueden identificar fácilmente, por medio del uso de ensayos clínicos, examen físico, historia médica/familiar o ensayos biológicos y diagnósticos, los sujetos que necesitan dicho tratamiento.

A cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse fácilmente por el médico a cargo del caso, como especialista en la técnica, por medio del uso de técnicas convencionales y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Para determinar la cantidad terapéuticamente eficaz, el médico a cargo del diagnóstico considera varios factores que incluyen, pero sin limitación: la especie del sujeto; sus dimensiones, edad y salud general; la enfermedad específica implicada; el grado de compromiso o gravedad de la enfermedad; la respuesta del sujeto individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el

uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

La cantidad de un compuesto de fórmula (I) o conjugado que se requiere para conseguir el efecto biológico deseado variará dependiendo de varios factores que incluyen las características químicas (por ejemplo, hidrofobia) de los compuestos empleados, la potencia de los compuestos, el tipo de enfermedad, la especie a la que pertenece el paciente, el estado de enfermedad del paciente, la vía de administración, la biodisponibilidad del compuesto por la vía elegida, todos los factores que dictan las cantidades de dosificación requeridas, la liberación y el régimen que se va a administrar.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción desfavorable cuando se administran a un animal o a un ser humano, según sea apropiado.

Como se usa en este documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier soporte, diluyente, adyuvante o vehículo, tales como agentes conservantes o antioxidantes, cargas, agentes disgregantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y para retrasar la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticas activas es conocido en la técnica. Excepto en caso de que algún medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, su uso en las composiciones terapéuticas está contemplado. En las composiciones también pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios como combinaciones terapéuticas adecuadas.

En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", como se usa en este documento, significa invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o la afección a la que se aplica tal término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto/medicamento de acuerdo con la presente invención eficaz para prevenir o tratar el estado patológico al que se hace referencia en este documento.

De acuerdo con la invención, el término "paciente" o "paciente que lo necesita" pretende hacer referencia a un animal o un ser humano que padece o que probablemente padecerá uno de los estados patológicos a los que se hace referencia en este documento. Preferiblemente, el paciente es un ser humano.

En términos generales, los compuestos de esta invención pueden proporcionarse en una solución acuosa de tampón fisiológico que contiene de 0,1 a 10 % p/v de compuesto para administración parenteral. Los intervalos de dosis típicas son de 1 μg/kg a 0,1 g/kg de peso corporal por día; un intervalo de dosis preferido es de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal por día o una dosis equivalente en un niño. La dosificación preferida de fármaco a administrar probablemente dependerá de variables tales como el tipo y grado de progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del compuesto, la vía de administración (intravenosa, intramuscular u otra), las propiedades farmacocinéticas del compuesto por la vía de administración elegida y la velocidad (embolada o infusión continua) y el programa de administración (número de repeticiones en un periodo de tiempo dado).

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en formas de dosificación unitarias, donde el término "dosis unitaria" significa una sola dosis que puede administrarse a un paciente, y que puede manipularse y envasarse fácilmente, permaneciendo como una dosis unitaria física y químicamente estable que comprende el propio compuesto activo, o como una composición farmacéuticamente aceptable, como se describe más adelante en este documento. Como tales, los intervalos típicos de las dosis diarias totales son de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal. A modo de pauta general, las dosis unitarias para los seres humanos varían de 1 mg a 3000 mg al día. Preferiblemente, el intervalo de dosis unitaria es de 1 a 500 mg administrados de una a seis veces al día, e incluso más preferiblemente de 10 mg a 500 mg una vez al día. Los compuestos proporcionados en este documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas por medio de su mezcla con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Estas composiciones de dosis unitarias pueden prepararse para uso por administración oral, particularmente en forma de comprimidos, cápsulas sencillas o cápsulas de gel blando; o por vía intranasal, particularmente en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles; o por vía dérmica, por ejemplo, tópicamente o en pomadas, cremas, lociones, geles o pulverizaciones, o por medio de parches transdérmicos.

Las composiciones pueden administrarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, como se describe en *Remington: The Science y Practice of Pharmacy*, 20ª ed.; Gennaro, A. R., Ed.; Lippincott Williams & Wilkins:

Philadelphia, PA, 2000.

Las formulaciones preferidas incluyen composiciones farmacéuticas en las que un compuesto de la presente invención se formula para administración oral o parenteral.

Para la administración oral, los comprimidos, píldoras, polvos, cápsulas, trociscos y similares pueden contener uno o más de cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina o goma de tragacanto; un diluyente tal como almidón o lactosa; un disgregante tal como almidón y derivados de celulosa; un lubricante tal como estearato de magnesio; un agente deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta o salicilato de metilo. Las cápsulas pueden estar en forma de una cápsula dura o una cápsula blanda, que generalmente se preparan a partir de mezclas de gelatina opcionalmente combinadas con plastificantes, así como una cápsula de almidón. Además, Las formas de dosificación unitarias pueden contener otros diversos materiales que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, goma laca o agentes entéricos. Otras formas de dosificación orales tales como jarabes o elixires pueden contener agentes edulcorantes, conservantes, tintes, colorantes y aromatizantes. Además, los compuestos activos pueden incorporarse en preparaciones y formulaciones de disolución rápida, de liberación modificada o de liberación sostenida, siendo preferiblemente dichas formulaciones de liberación sostenida bimodales. Los comprimidos preferidos contienen lactosa, almidón de maíz, silicato de magnesio, croscarmelosa sódica, povidona, estearato de magnesio o talco en cualquier combinación.

Las preparaciones líquidas para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Las composiciones líquidas también pueden incluir agentes aglutinantes, tampones, conservantes, agentes quelantes, edulcorantes, aromatizantes y colorantes, y similares. Los disolventes no acuosos incluyen alcoholes, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen mezclas de alcoholes y agua, medios tamponados y solución salina. En particular, pueden ser excipientes útiles para controlar la liberación de los compuestos activos polímeros biocompatibles y biodegradables de lactida, copolímeros de lactida/glicolida o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno. Los vehículos intravenosos pueden incluir fluidos y agentes para reponer nutrientes, agentes para

reponer electrólitos tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. Otros sistemas de liberación parenteral que podrían ser útiles para estos compuestos activos incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas.

Los modos alternativos de administración incluyen formulaciones para inhalación, que incluyen medios tales como polvo seco, aerosol o gotas. Pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato y desoxicolato, o soluciones oleosas para administración en forma de gotas nasales, o como un gel para aplicación intranasal. Las formulaciones para administración bucal incluyen, por ejemplo, grageas o pastillas y también pueden incluir una base aromatizada, tal como sacarosa y goma arábiga, y otros excipientes tales como glicocolato. Las formulaciones adecuadas para administración rectal preferiblemente se presentan como supositorios de una sola dosis, con un vehículo sólido, tal como manteca de cacao, y pueden incluir un salicilato. Las formulaciones para aplicación tópica a la piel preferiblemente toman la forma de una pomada, crema, loción, pasta, gel, pulverización, aerosol o aceite. Los vehículos que pueden usarse incluyen parafina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes o sus combinaciones. Las formulaciones adecuadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos y pueden ser emulsiones lipófilas o soluciones acuosas tamponadas, disueltas y/o dispersas en un polímero o un adhesivo.

FIGURAS

La Figura 1a representa la potencia *in vitro* de huB4-SPDB - compuesto del ejemplo 16 hacia células BJAB antígeno-positivas y células MOLT-4 antígeno-negativas.

La Figura 1b representa la potencia *in vitro* de huB4-SMCC - compuesto del ejemplo 16 hacia células BJAB antígeno-positivas y células MOLT-4 antígeno-negativas.

La Figura 1c representa la potencia *in vitro* del compuesto libre del ejemplo 16 hacia células BJAB y MOLT-4.

La Figura 2a representa la potencia *in vitro* de huB4-SPDB - compuesto del ejemplo 17 hacia células BJAB antígeno-positivas y células MOLT-4 antígeno-negativas.

La Figura 2b representa la potencia *in vitro* de huB4-SMCC - compuesto del ejemplo 17 hacia células BJAB antígeno-positivas y células MOLT-4 antígeno negativas.

La Figura 2c representa la potencia *in vitro* del compuesto libre del ejemplo 17 hacia células BJAB y MOLT-4.

La Figura 3a representa la potencia *in vitro* de huMy9-6-SPDB - compuesto del ejemplo 16 hacia células HL60/GC antígeno-positivas y células Ramos antígeno-negativas.

La Figura 3b representa la potencia *in vitro* del compuesto libre del ejemplo 16 hacia células HL60/GC y Ramos.

La invención se ilustra adicionalmente pero sin restricción por la descripción de los siguientes ejemplos.

Parte experimental

• Método A1: Cromatografía Líquida de Alta Presión - Espectrometría de Masas (LCMS)

Se usa un software Micromass MassLynx y el análisis se realiza en un HPLC Agilent 1100 series con una columna THERMO Hypersil Gold C18 de 3 μm (50 x 3 mm) usando un gradiente de elución con una mezcla de (A) acetonitrilo y (B) agua/ácido fórmico al 0,1% (gradiente: 5% de A:95% de B hasta 95% de A:5% de B durante 5 minutos, 95% de A:5% de B durante 0,5 minutos, 95% de A:5% de B disminuyendo a 5% de A:95% de B durante 1 minuto, 5% de A:95% de B durante 0,5 minutos) con un caudal de 0,8 ml/minuto; espectrómetro Waters-Micromass Plataforma I, Plataforma II o ZQ con Electronebulización (aislamiento positivo y negativo); Serie de Diodos en línea (190-490 nm); detector auxiliar Sedere (France) Model SEDEX 65 Evaporative Light Scattering (ELS) detector.

• Método A2: Cromatografía Líquida de Alta Presión - Espectrometría de Masas (LCMS)

• Método D: Espectros de masas por Ionización Química (CI)

Los espectros de masas por IQ se registraron usando un espectrómetro de masas Finnigan SSQ 7000 (amoniaco)

• Método E: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H (RMN)

Los espectros de ^1H RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Avance Drx-500, un espectrómetro Bruker Avance Drx-400 o un espectrómetro A Bruker Avance DRX-300.

Método F: Purificación por Cromatografía Líquida a Alta Presión (HPLC)

La purificación por HPLC se realizó sobre un Macherey Nagel VP 250/40 mm NUCLEODUR GRAVITY 100 - 10 C18 (número de catálogo 762250), eluyendo con una mezcla de (A) acetonitrilo y (B) agua/$HCOONH_4$ 0,01 M/NH_4OH a pH 9-10 (gradiente: 10% de A:90% de B durante 3 minutos, 10% de A:90% de B hasta 95% de A:5% de B durante 37 minutos, 95% de A:5% de B durante 8 minutos, 95% de A:de 5% de B a 10% de A:90% de B durante 1 minuto, 10% de A:90% de B durante 1 minuto) con un caudal de 70 ml/minuto.

Método G1: Cromatografía Líquida a Alta Presión-Espectrometría de masas (LCMS)

Se usa un software Micromass MassLynx y el análisis se realiza en un Acquity UPLC con una columna Acquity UPLC BEH C18 de 1,7 µm (2,1 x 100 mm) usando un gradiente de elución con una mezcla de (A) acetonitrilo y (B) agua/ácido fórmico al 0,1% (gradiente: 5% de A:95% de B hasta 95% de A:5% de B durante 4,7 minutos, 95% de A:5% de B disminuyendo a 5% de A:95% de B durante 0,5 minuto, 5% de A:95% de B durante 0,8 minutos) con un caudal de 1,1 ml/minuto; espectrómetro Quattro Premier con Electronebulización; Serie de Diodos en línea (210-400 nm).

Método G2: Cromatografía Líquida a Alta Presión-Espectrometría de Masas (LCMS)

Se usa un software Micromass MassLynx y el análisis se realiza sobre un Acquity UPLC con una columna Acquity UPLC BEH C18 de 1,7 µm (2,1 x 100 mm) usando un gradiente de elución con una mezcla de (A) acetonitrilo y (B) agua/ácido fórmico

al 0,1% (gradiente: 5% de A:95% de B hasta 95% de A:5% de B durante 10 minutos, 95% de A:5% de B disminuyendo a 5% de A:95% de B durante 1 minutos, 5% de A:95% de B durante 2 minutos) con un caudal de 0,6 ml/minuto caudal; espectrómetro Quattro Premier con Electronebulización; Serie de Diodos en línea (210-400 nm).

Método H: Método de purificación por Cromatografía Líquida a Alta Presión (HPLC) Se realizó purificación por HPLC en un Varian HPLC usando una columna Kromasil C18 de 16 µm (250 x 21,2 mm, PN A0490-250x212, Lote Nº DT0259, NS 9772196), eluyendo con una mezcla de (A) agua y (B) acetonitrilo con un caudal de 20 ml/minuto. La medida de la recolección fue de 80 segundos. Los espectros de masas de los compuestos se obtuvieron en un instrumento Bruker Esquire 3000. Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Avance que operaba a 400 MHz.

Gradientes para la elución de la columna:

1. Purificación de 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

55% de A:45% de B durante 8 minutos, 55% de A:de 45% de B a 50% de A:50% de B durante 14 minutos, 50% de A:50% de B a 10% de A:90% de B durante 4 minutos, 10% de A:90% de B durante 5 minutos, 10% de A:90% de B a 55% de A:45% de B durante 1 minuto, 55% de A:45% de B durante 3 minutos.

2. Purificación de 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

60% de A:40% de B durante 4 minutos, 60% de A:40% de B a 55% de A:45% de B durante 5 minutos, 55% de A:45% de B durante 4 minutos, 55% de A:45% de B a 50% de A:50% de B durante 13 minutos, 50% de A:50% de B a 10% de A:90% de B durante 10 segundos, 10% de A:90% de B durante 5 minutos, 10% de A:90% de B a 60% de A:40% de B durante 10 segundos, 60% de A:40% de B durante 3 minutos.

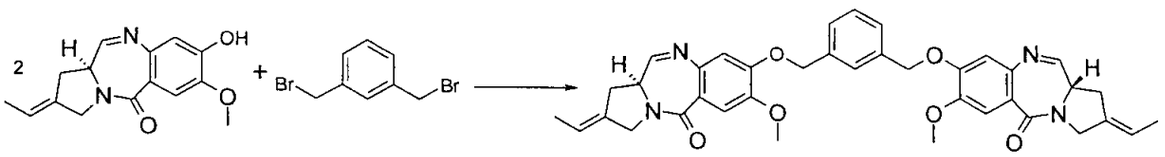
3. Purificación de 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

60% de A:40% de B durante 8 minutos, 60% de A:40% de B a 45% de A:55% de B durante 16 minutos, 45% de A:55% de B a 10% de A:90% de B durante 2 minutos, 10% de A:90% de B durante 5 minutos, 10% de A:90% de B a 60% de A:40% de B durante 1 minuto, 60% de A:40% de B durante 3 minutos.

4. Purificación de 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

65% de A:35% de B a 60% de A:40% de B durante 8 minutos, 60% de A:40% de B a 50% de A:50% de B durante 19 minutos, 50% de A:50% de B a 10% de A:90% de B durante 10 segundos, 10% de A:90% de B durante 5 minutos, 10% de A:90% de B a 65% de A:35% de B durante 10 segundos, 65% de A:35% de B durante 3 minutos.

- Ejemplo 1: 8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



Se añadieron carbonato potásico (22,8 mg), α,α'-dibromo-*m*-xileno (7,3 mg) y yoduro potásico (9,1 mg) a una solución agitada de pre-tomaimicina (15 mg) en dimetilformamida (0,5 ml). La reacción se agitó durante 20 h a 30ºC.

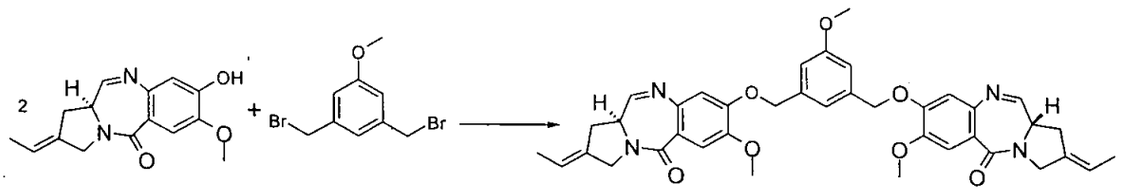
Los sólidos se retiraron por filtración, se lavaron dos veces con dimetilformamida (0,2 ml) y después se desecharon. A la segunda solución de dimetilformamida se le añadió agua (0,4 ml) y la solución resultante se inyectó para purificación por HPLC de acuerdo con el método B1. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron por evaporación centrífuga sobre un aparato Jouan Model RC10.10 para producir 8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] en forma de un polvo blanco (3,33 mg):

LC/MS (Método A1, Plataforma II): ES: m/z = 647 MH^+

Tiempo de retención = 3,53 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, $CDCl_3$-d1, δ en ppm): 1,75 (d, J = 7,0 Hz, 6H); 2,96 (m, 4H); 3,89 (m, 2H); 3,96 (s, 6H); 4,27 (s ancho, 4H); 5,17 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,23 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,60 (m, 2H); 6,85 (s, 2H); de 7,36 a 7,43 (m, 3H); 7, 51 (s ancho, 1H); 7,53 (s, 2H); 7,63 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

• Ejemplo 2: 8,8'-[5-metoxi-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



Puede prepararse 8,8'-[5-metoxi-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Ejemplo 1), partiendo de 1,3-bis-bromometil-5-metoxi-benceno:

LC/MS (Método A1, Plataforma II): ES: m/z = 677 MH^+

Tiempo de retención = 4,17 minutos

^{1}H R.M.N. (300 MHz, $CDCl_3$-d1, δ en ppm): 1,75 (d, J = 7,0 Hz, 6H); 2,96 (m, 4H); 3,81 (s, 3H); 3,89 (m, 2H); 3,96 (s, 6H); 4,26 (s ancho, 4H); 5,14 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,21 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,60 (m, 2H); 6,82 (s, 2H); 6,95 (s ancho, 2H); 7,07 (s ancho, 1H); 7,53 (s, 2H); 7,63 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

Puede prepararse 1,3-bis-bromometil-5-metoxi-benceno como se indica a continuación:



Se añadió tetrabromuro de carbono (663 mg) a una solución agitada de 1-

bromometil-3-hidroximetil-5-metoxi-benceno (420 mg) en diclorometano anhidro (10 ml) en una atmósfera de argón. Después de enfriar la solución resultante a 0ºC, se añadió gota a gota una solución de trifenilfosfina (500 mg) en diclorometano anhidro (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 h y después se concentró al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioFlash de 30 g, Si60 15-40 µm, eluyendo con diclorometano/heptano, 40:60) para dar 1,3-bis-bromometil-5-metoxi-benceno (170 mg):

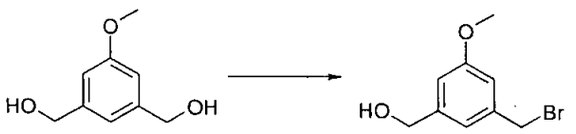
EI (Método C): m/z = 292 $M^{+\cdot}$

m/z = 213 $[M - Br]^{+}$

m/z = 134 $[213 - Br]^{+\cdot}$

1H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 3,77 (s, 3H); 4,65 (s, 4H); 6,98 (s ancho, 2H); 7,10 (s ancho, 1H)

Puede prepararse 1-bromometil-3-hidroximetil-5-metoxi-benceno como se indica a continuación:



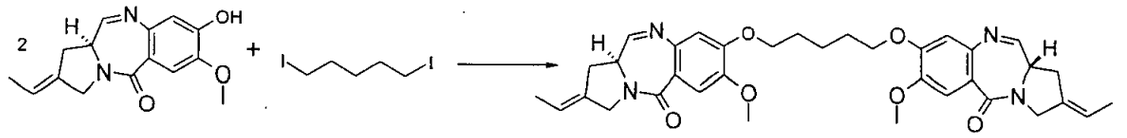
Se añadió tetrabromuro de carbono (3,47 g) a una solución agitada de 1,3-dihidroximetil-5-metoxi-benceno (800 mg) en diclorometano anhidro (16 ml) en una atmósfera de argón. Después de enfriar la solución resultante a 0ºC, se añadió gota a gota una solución de trifenilfosfina (2,68 g) en diclorometano anhidro (16 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 h y después se concentró al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioPrep de 90 g, Si60 15-40 µm, eluyendo con metanol/diclorometano, 4:96) para dar 1-bromometil-3-hidroximetil-5-metoxi-benceno (420 mg):

EI (Método C): m/z = 230 $M^{+\cdot}$

m/z = 151 $[M - Br]^{+}$

1H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 3,75 (s, 3H); 4,46 (d ancho, J = 5,5 Hz, 2H); 4,65 (s, 2H); 5,22 (t ancho, J = 5,5 Hz, 1H); 6,83 (s ancho, 1H); 6,88 (s ancho, 1H); 6,97 (s ancho, 1H)

• Ejemplo 3: 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



Se añadieron carbonato potásico (22,8 mg) y 1,5-diyodopentano (8,2 µl) a una solución agitada de pre-tomaimicina (15 mg) en dimetilformamida (0,5 ml). La reacción se agitó durante 20 h a temperatura ambiente y se añadió una porción adicional de carbonato potásico (8 mg). La reacción se agitó durante 20 h más a temperatura ambiente.

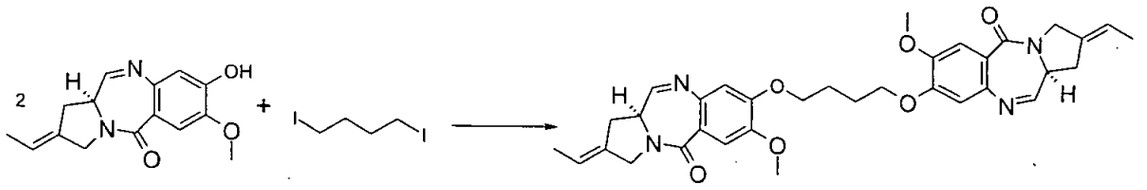
Los sólidos se retiraron por filtración y la solución de dimetilformamida se inyectó para purificación por HPLC de acuerdo con el método B2. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron por evaporación centrífuga sobre un aparato Jouan Model RC10.10 para producir 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] en forma de un polvo blanco (4 mg):

LC/MS (Método A2): ES: m/z = 613 MH^+

Tiempo de retención = 9,04 minutos

1H R.M.N. (500 MHz, $CDCl_3$-d1, δ en ppm): 1,66 (m parcialmente enmascarado, 2H); 1,75 (d ancho, J = 7,0 Hz, 6H); 1,96 (m, 4H); 2,97 (d ancho, J = 7,0 Hz, 4H); 3,89 (m, 2H); 3,94 (s, 6H); 4,06 (m, 2H); 4,13 (m, 2H); 4,26 (s ancho, 4H); 5,60 (m, 2H); 6,80 (s, 2H); 7,50 (s, 2H); 7,66 (d, J = 4,5 Hz, 2H)

• Ejemplo 4: 8,8'-[1,4-butanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



Puede prepararse 8,8'-[1,4-butanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

(Ejemplo 3), partiendo de 1,4-diyodobutano:

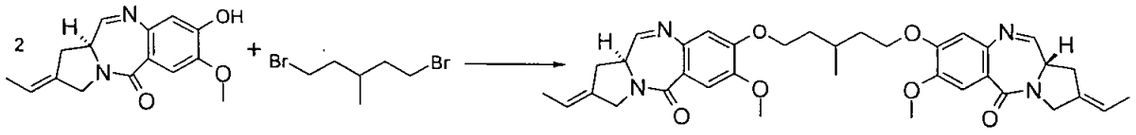
LC/MS (Método A1, Plataforma II): ES: m/z = 599 MH^+

m/z = 318,5 $(M + H + K)^{2+}/2$

Tiempo de retención = 3,23 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, $CDCl_3$-d1, δ en ppm): 1,75 (d ancho, J = 7,0 Hz, 6H); 2,10 (m, 4H); 2,98 (d ancho, J = 7,0 Hz, 4H); 3,90 (m, 2H); 3,93 (s, 6H); 4,11 (m, 2H); 4,20 (m, 2H); 4,27 (s ancho, 4H); 5,60 (m, 2H); 6,82 (s, 2H); 7,50 (s, 2H); 7,66 (d, J = 4,5 Hz, 2H)

• Ejemplo 5: 8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

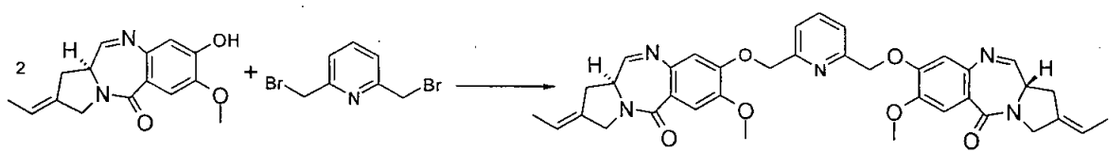


Puede prepararse 8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Ejemplo 1), partiendo de 1,5-dibromo-3-metilpentano:

LC/MS (Método A1, Plataforma II): ES: m/z = 627 MH^+

Tiempo de retención = 3,92 minutos

• Ejemplo 6: 8,8'-[2,6-piridinadiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



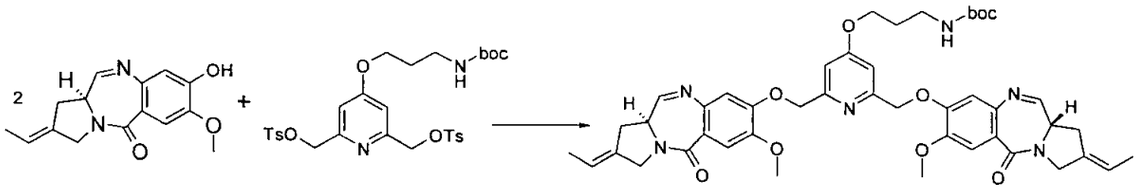
Puede prepararse 8,8'-[2,6-piridinadiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[1,3-benceno-diilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Ejemplo 1), partiendo de 2,6-bis-bromometil-piridina:

LC/MS (Método A1, ZQ): ES: m/z = 648 MH^+

Tiempo de retención = 3,21 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, $CDCl_3$-d1, δ en ppm): 1,75 (d ancho, J = 6,5 Hz, 6H); de 2,94 a 2,99 (m, 4H); 3,90 (m, 2H); 3,99 (s, 6H); 4,27 (s ancho, 4H); 5,32 (s, 4H); 5,60 (m, 2H); 6,86 (s, 2H); 7,48 (d, J = 8,0 Hz, 2H); 7,56 (s, 2H); 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H); 7,74 (t, J = 8,0 Hz, 1H).

• Ejemplo 7: Puede prepararse 8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropiloxi)-2,6-piridinadiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:



A una solución agitada de pre-tomaimicina (30 mg) en dimetilformamida (0,5 ml) se le añadieron carbonato potásico (45,7 mg), una solución de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(tosiloximetil)-piridina (41 mg) en dimetilformamida (0,5 ml) y yoduro potásico (18,3 mg). La reacción se agitó durante 20 h a 30ºC. Los sólidos se retiraron por filtración y se lavaron con dimetilformamida (0,2 ml). A la segunda solución de dimetilformamida se le añadió agua (0,5 ml) y se añadió ácido fórmico hasta que se produjo la completa disolución del precipitado. La solución resultante se inyectó para purificación por HPLC de acuerdo con el método B1. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron por evaporación centrífuga sobre un aparato Jouan Model RC10.10 para producir 8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropiloxi)-2,6-piridina-diilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (8,3 mg).

LC/MS (Método A1, Plataforma I): ES: m/z = 857 $MH^+ + 2\ H_2O$

m/z = 839 $MH^+ + H_2O$

m/z = 821 MH^+

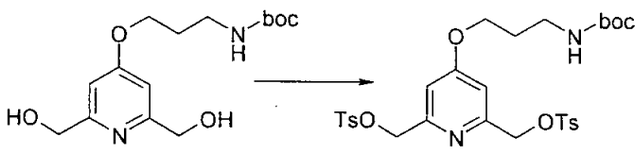
m/z = 721 $[M-C_5O_2H_8] + H^+$

Tiempo de retención = 3,67 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CD3CO2D-d4, δ en ppm): 1,41 (s, 9H); 1,71 (d, J = 6,5 Hz,

6H); 2,08 (m, 2H); 2,95 (m, 4H); 3,34 (m, 2H); 3,90 (s, 6H); 4,06 (m, 2H); 4,18 (m, 2H); de 4,24 a 4,36 (m, 4H); 4,43 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 5,50 (s ancho, 4H); 5,61 (m, 2H); de 6,80 a 7,70 (m muy ancho, 2H); 6,95 (s ancho, 2H); de 7,48 a 7,58 (m, 4H).

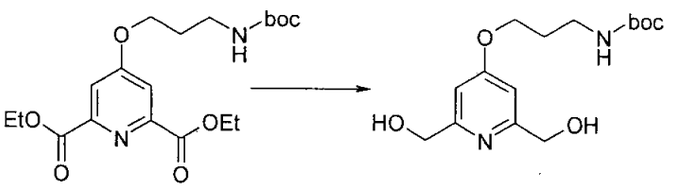
Puede prepararse 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(tosiloximetil)-piridina como se indica a continuación:



A una solución enfriada previamente (0ºC) de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (76 mg) en diclorometano (0,7 ml) se le añadió una solución de hidróxido potásico (30 mg) en agua (0,3 ml). Se añadió cloruro de tosilo (93,7 mg) y la mezcla heterogénea resultante se agitó vigorosamente durante 1 h y después se lavó en un embudo de decantación usando diclorometano y agua. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo tres veces con diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Interchrom Puriflash de 10 g, SiOH 15-35 μm), usando un gradiente de elución con una mezcla de heptano (A) y acetato de etilo (B) (gradiente: 90% de A:10% de B hasta 50% de A:50% de B) para dar 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(tosiloximetil)piridina (56 mg):

LC/MS (Método A1, Plataforma I): ES: m/z = 621 MH^+
Tiempo de retención = 4,90 minutos

Puede prepararse 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina como se indica a continuación:



A una solución de éster dietílico del ácido 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-

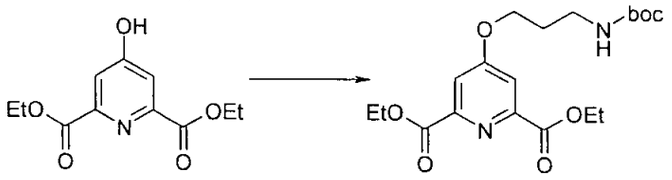
piridina-2,6-dicarboxílico (150 mg) en etanol absoluto (5 ml) se le añadieron borohidruro sódico (43 mg) y cloruro de calcio (128 mg). Después de agitar durante 4 h, cesó el desprendimiento de hidrógeno y la reacción se interrumpió con agua. El disolvente se evaporó a presión reducida. Después, el residuo se lavó en un embudo de decantación usando diclorometano y agua. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo tres veces con diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)piridina (80 mg):

LC/MS (Método A1, ZQ): ES m/z = 313 MH^+

Tiempo de retención = 1,90 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 1,37 (s, 9H); 1,84 (m, 2H); 3,08 (c, J = 6,5 Hz, 2H); 4,05 (t, J = 6,5 Hz, 2H); 4,45 (d, J = 6,0 Hz, 4H); 5,32 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 6,84 (s, 2H); 6,90 (t ancho, J = 6,5 Hz, 1H).

Puede prepararse éster dietílico del ácido 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico como se indica a continuación:



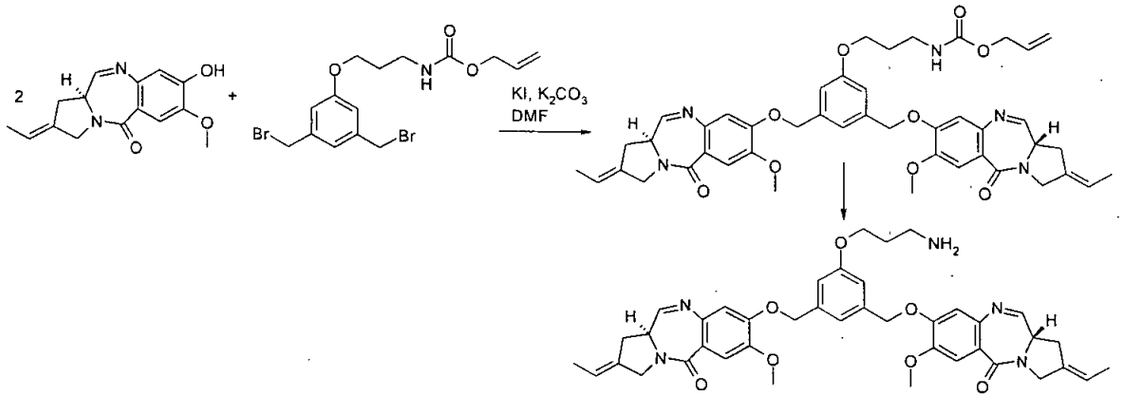
El éster dietílico del ácido quelidámico (Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U.; Vendrame, T. *J. Org. Chem.* 1989, *54*, 5988) (150 mg) se disolvió en dimetilformamida seca (2 ml). Se añadieron 3-(terc-butoxi-amino)-propilo bromuro (164 mg) y carbonato potásico (130 mg). La mezcla resultante se agitó durante 15 h a 70°C. La reacción se interrumpió con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y después se lavó en un embudo de decantación usando acetato de etilo. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Las soluciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioFlash de 30 g, Si60 15-40 μm), usando un gradiente de elución con una mezcla de heptano (A) y acetato de etilo (B) (gradiente: 60% de A:40% de B hasta 50% de A:50% de B) para dar éster dietílico del ácido 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico

(150 mg):

CI (Método D): m/z = 397 MH^+

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 1,34 (t, J = 7,0 Hz, 6H); 1,36 (s, 9H); 1,86 (m, 2H); 3,10 (c, J = 6,5 Hz, 2H); 4,21 (t, J = 6,5 Hz, 2H); 4,37 (c, J = 7,0 Hz, 4H); 6,89 (m ancho, 1H); 7,71 (s, 2H)

- Ejemplo 8: Puede prepararse 8,8'-[5-(3-aminopropiloxi)-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:



A una solución agitada de pre-tomaimicina (21 mg) en dimetilformamida (0,7 ml) se le añadieron carbonato potásico (32 mg), 1-(3-aliloxicarbonilamino-propiloxi)-3,5-bis-(bromometil)-benceno (16,2 mg) y yoduro potásico (12,8 mg). La reacción se agitó durante 20 h a 30ºC. Los sólidos se retiraron por filtración, se lavaron dos veces con dimetilformamida (0,2 ml) y después se desecharon. A la segunda solución de dimetilformamida se le añadió agua (0,5 ml) y el precipitado resultante se retiró por filtración, se lavó con agua y se secó por evaporación centrífuga sobre un aparato Jouan Model RC10.10.

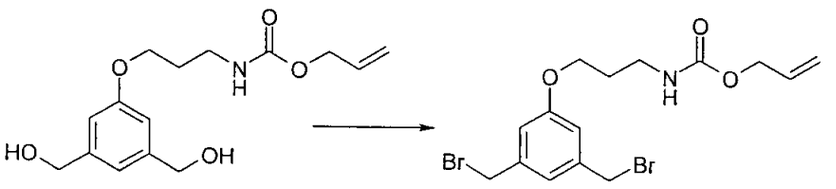
Al compuesto bruto (27 mg) disuelto en dimetilformamida (0,8 ml) se le añadieron tetraquis(trifenilfosfino)paladio (2 mg), trifenilfosfina (0,9 mg) y pirrolidina (5,6 μl). Después de agitar durante 15 h a 30ºC, se añadieron tetraquis(trifenilfosfino)paladio (2 mg), trifenilfosfina (1 mg) y pirrolidina (2,8 μl) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 h más. A la solución de dimetilformamida se le añadió agua (0,4 ml) y se añadió ácido fórmico hasta que se produjo la completa disolución del precipitado. La solución resultante se inyectó para purificación por

233

HPLC de acuerdo con el método B1. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron por evaporación centrífuga sobre un aparato Jouan Model RC10.10 para producir 8,8'-[5-(3-aminopropiloxi)-1,3-bencenodiilbis-(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (0,2 mg).

LC/MS (Método A1, Plataforma II): ES: m/z = 800 MH^+
Tiempo de retención = 2,84 minutos

Puede prepararse 1-(3-aliloxicarbonilamino-propiloxi)-3,5-bis-(bromometil)-benceno como se indica a continuación:

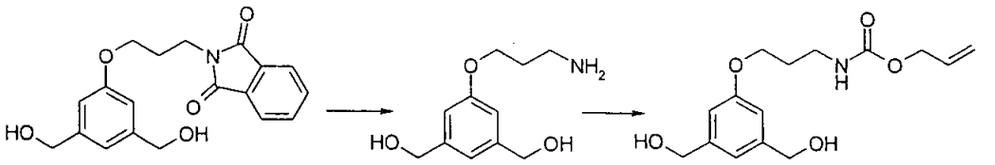


A una suspensión de 1-(3-aliloxicarbonilamino-propiloxi)-3,5-bis-(hidroxi-metil)-benceno (70 mg) en diclorometano (3 ml) se le añadieron tetrabromuro de carbono (248 mg) y una solución de trifenilfosfina (199 mg) en diclorometano (2 ml). Después de calentar a reflujo durante 3 h, la mezcla de reacción se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioFlash de 25 g, Si60 15-40 µm), eluyendo con diclorometano para dar 1-(3-aliloxicarbonilamino-propiloxi)-3,5-bis-(bromometil)-benceno (52 mg):

LC/MS (Método A1, Plataforma II): ES m/z = 420 MH^+
Tiempo de retención = 4,50 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 1,85 (m, 2H); 3,15 (c, J = 6,5 Hz, 2H); 3,99 (t, J = 6,5 Hz, 2H); 4,46 (d ancho, J = 5,5 Hz, 2H); 4,65 (s, 4H); 5,16 (d ancho, J = 11,0 Hz, 1H); 5,26 (d ancho, J = 17,5 Hz, 1H); 5,90 (m, 1H); 6,96 (d, J = 1,5 Hz, 2H); 7,09 (t, J = 1,5 Hz, 1H); 7,29 (t ancho, J = 6,5 Hz, 1H).

Puede prepararse 1-(3-aliloxicarbonilamino-propiloxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno como se indica a continuación:



Se disolvió 5-(3-ftalimido-propiloxi)-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno (1,45 g) en una mezcla de diclorometano y etanol (25 ml, 25:75). Se añadió hidrazina hidrato (0,62 ml) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h. El disolvente se retiró al vacío y el residuo se disolvió en diclorometano. El residuo insoluble se retiró por filtración y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioPrep de 70 g, Si60 15-40 μm), eluyendo con metanol/diclorometano, 20:80 y después hidróxido de amonio/metanol/diclorometano, 0,5:25:75 para dar 1-(3-amino-propiloxi)-3,5-bis-(hidroxi-metil)-benceno (1 g) adecuado para una transformación adicional.

Una muestra de 1-(3-amino-propiloxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (100 mg) se disolvió en metanol (5 ml). A la solución enfriada (0°C) se le añadió una solución de carbonato sódico (120 mg) en agua (5 ml) y cloroformiato de alilo (42 μl). Después de agitar durante 30 minutos a 0°C, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 h más. El disolvente se retiró al vacío Después, el residuo se lavó en un embudo de decantación usando acetato de etilo y agua. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las soluciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar 5-(3-aliloxicarbonilamino-propiloxi)-2,6-bis-(hidroximetil)benceno (75 mg):

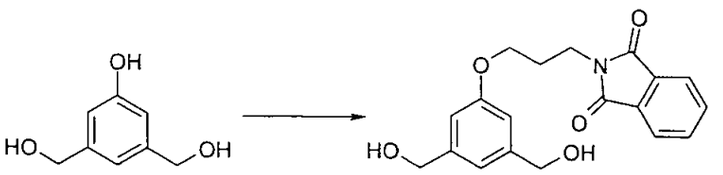
EI (Método C): m/z = 295 $M^{+\cdot}$

m/z = 142 $(M - C_8H_9O_3)^+$

m/z = 41 $C_3H_5^+$

^{1}H R.M.N. (300 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 1,85 (m, 2H); 3,14 (c, J = 6,5 Hz, 2H); 3,96 (t, J = 6,5 Hz, 2H); de 4,41 a 4,48 (m, 6H); 5,11 (t parcialmente enmascarado, J = 5,5 Hz, 2H); 5,16 (cd, J = 1,5 et 10,5 Hz, 1H); 5,26 (cd, J = 1,5 y 17,0 Hz, 1H); 5,90 (m, 1H); 6,72 (s ancho, 2H); 6,83 (s ancho, 1H); 7,26 (t ancho, J = 6,5 Hz, 1H)

Puede prepararse 5-(3-ftalimido-propiloxi)-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno como se indica a continuación:



Se mezclaron 3,5-Bis-hidroximetilfenol (Felder, D.; Gutiérrez Nava, M.; del Pilar Carreon, M.; Eckert, J.F.; Luccisano, M.; Schall, C.; Masson, P.; Gallani, J.L.; Heinrich, B.; Guillon, D.; Nierengarten, J.F. *Helv. Chimica Acta* 2002, *85*, 288) (2,35 g), N-(3-bromo-propil)-ftalimida (4,49 g) y carbonato potásico (10,53 g) en acetonitrilo (25 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 12 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se disolvió de nuevo en diclorometano y el residuo insoluble se retiró por filtración. El filtrado se lavó con agua, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioPrep de 90 g, Si60 15-40 μm), eluyendo con metanol/diclorometano, 4:96 para dar 5-(3-ftalimido-propiloxi)-1,3-bis-(hidroximetil)benceno (1,45 g):

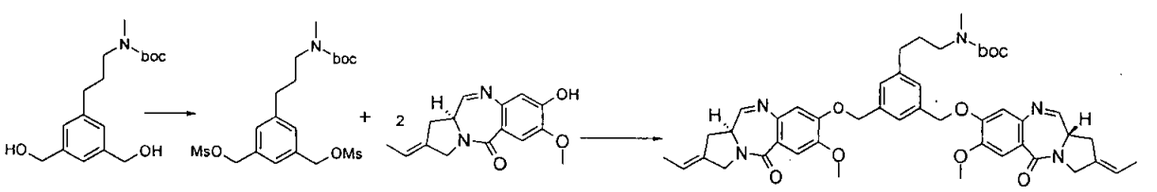
LC/MS (Método A1, Plataforma II): ES m/z = 342 MH^+

m/z = 324 ($MH^+ - H_2O$)

Tiempo de retención = 2,90 minutos

^{1}H R.M.N. (300 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 2,05 (m, 2H); 3,76 (t, J = 6,5 Hz, 2H); 3,99 (t, J = 6,5 Hz, 2H); 4,40 (d, J = 5,5 Hz, 4H); 5,09 (t, J = 5,5 Hz, 2H); 6,59 (s ancho, 2H); 6,82 (s ancho, 1H); de 7,80 a 7,90 (m, 4H)

• Ejemplo 9: Puede preparase 8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:



A una solución enfriada (0ºC) de 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno (50 mg) y trietilamina (113 μl) en diclorometano (2 ml) se

le añadió cloruro de metanosulfonilo (26 µl). Después de 30 minutos, la mezcla de reacción se lavó dos veces con agua y la solución de diclorometano resultante se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío para dar un aceite viscoso (50,3 mg).

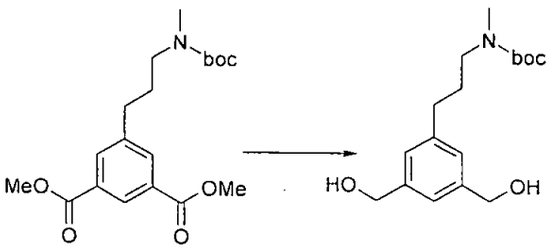
Una solución de pre-tomaimicina (15 mg) en dimetilformamida (0,5 ml) se añadió a una mezcla del compuesto bruto (13 mg), carbonato potásico (23 mg) y yoduro potásico (9 mg). La mezcla de reacción se agitó durante 20 h a 30ºC. Se añadió otra muestra del compuesto bruto (6 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 h más a 30ºC. Los sólidos se retiraron por filtración, se lavaron con dimetilformamida (0,2 ml) y después se desecharon. A la solución de dimetilformamida combinada se le añadieron agua (0,4 ml), una gota de ácido fórmico y una cantidad adicional de agua (1,5 ml).

Se filtró una muestra de la suspensión resultante (2 ml) y el sólido resultante se secó al vacío para dar 8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (3,1 mg):

LC/MS (Método A1, Plataforma II): ES: m/z = 818 MH^+

Tiempo de retención = 4,11 minutos

Puede prepararse 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno como se indica a continuación:



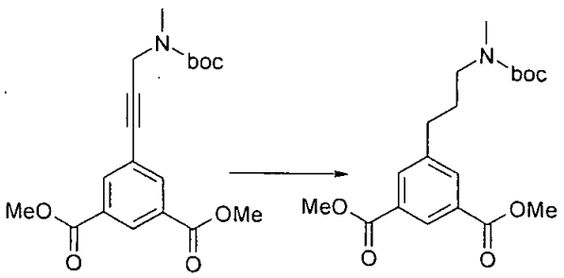
A una solución enfriada (-5ºC) de éster dietílico del ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-benceno-1,3-dicarboxílico (100 mg) en tetrahidrofurano (2 ml) se le añadió lentamente una solución 1 M de hidruro de litio y aluminio en éter dietílico (0,55 ml). 10 minutos después del final de la adición, se añadió sulfato sódico decahidrato hasta que cesó el desprendimiento de gas. El sólido se retiró por filtración, se lavó dos veces con acetato de etilo y las soluciones orgánicas combinadas se concentraron al vacío para dar 5-(N-metil-3-terc-

butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno (66,8 mg) en forma de un aceite viscoso:

CI (Método D): m/z = 327 MNH_4^+
m/z = 310 MH^+
m/z = 271 $(MNH_4^+ - C_4H_8)$

^{1}H R.M.N. (300 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 1,37 (s ancho, 9H); 1,75 (m, 2H); de 2,45 a 2,54 (m enmascarado, 2H); 2,77 (s, 3H); 3,18 (t, J = 7,0 Hz, 2H); 4,45 (d, J = 5,5 Hz, 4H); 5,08 (t, J = 5,5 Hz, 2H); 7,00 (s ancho, 2H); 7,08 (s ancho, 1H)

Puede prepararse éster dietílico del ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-benceno-1,3-dicarboxílico como se indica a continuación:



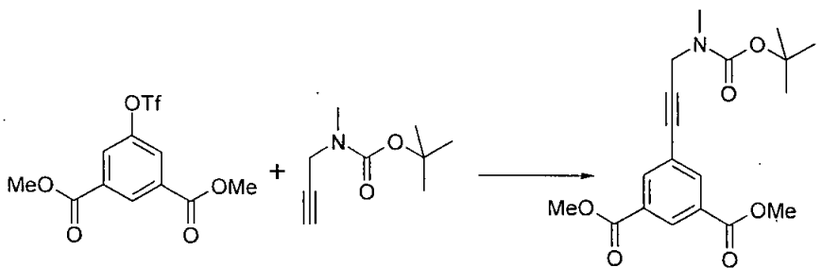
A una solución de éster dietílico del ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropin-1-il)-benceno-1,3-dicarboxílico (890 mg) en metanol (10 ml) se le añadió paladio al 10% sobre carbono (89 mg) y la solución se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de hidrógeno (1 bar) durante 18 h. El sólido se retiró por filtración y el disolvente se retiró al vacío para producir éster dietílico del ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-benceno-1,3-dicarboxílico (767 mg) en forma de un aceite amarillo:

EI (Método C): m/z = 365 $M^{+\cdot}$
m/z = 309 $(M - C_4H_8)^{+\cdot}$
m/z = 265 $(m/z = 309 - CO_2)^{+\cdot}$
m/z = 57 $C_4H_9^+$
m/z = 44 $C_2H_6N^+$

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 1,32 (s ancho, 9H); 1,79 (m, 2H); 2,70 (t, J = 7,0 Hz, 2H); 2,76 (s, 3H); 3,16 (m, 2H); 3,87 (s, 6H); 8,06 (d, J = 2,0 Hz, 2H);

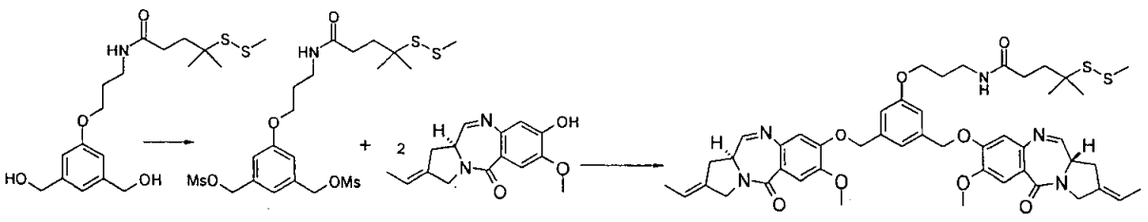
8,32 (t, J = 2,0 Hz, 1H)

Puede prepararse éster dietílico del ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropin-1-il)-benceno-1,3-dicarboxílico como se indica a continuación:



Se disolvió éster dimetílico del ácido 5-trifluorometanosulfoniloxi-isoftálico (Bodwell, G.J.; Fleming, J.J.; Mannion, M.R.; Miller, D.O. *J. Org. Chem.* 2000, *65 (17)*, 5360) (1 g) en 2 ml de acetonitrilo. Se añadieron N-Metil-N-terc-butoxicarbonil-propargilamina (Bradbury, B.J.; Baumgold, J.; Jacobsen, K.A. *J. Med. Chem.* 1990, *33 (2)*, 741) (643 mg), cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (205 mg), yoduro de cobre (56 mg) y trietilamina (591 mg). La mezcla resultante se agitó durante 15 h a temperatura ambiente. El disolvente se retiró por evaporación a presión reducida y después el residuo se lavó en un embudo de decantación usando acetato de etilo y agua. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo una vez con acetato de etilo. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro sódico, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Biotage FLASH 40+M de 100 g, SiOH 32-63 μm, eluyendo con acetato de etilo/heptano, 20:80) para dar éster dietílico del ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropin-1-il)-benceno-1,3-dicarboxílico (896 mg):
^{1}H R.M.N. (300 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 1,43 (s, 9H); 2,90 (s, 3H); 3,90 (s, 6H); 4,30 (s, 2H); 8,16 (d, J = 1,5 Hz, 2H); 8,42 (t, J = 1,5 Hz, 1H)

- Ejemplo 10: Puede prepararse 8,8'-{5-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)propiloxi]-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)}-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:



A una solución enfriada (0°C) de 1-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-propiloxi]-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (45 mg) y trietilamina (49 µl) en diclorometano (1,5 ml) se le añadió cloruro de metanosulfonilo (19 µl). Después de 30 minutos, la mezcla de reacción se lavó dos veces con agua y la solución de diclorometano resultante se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío para dar un aceite viscoso (39 mg).

A una solución de pre-tomaimicina (26 mg) en dimetilformamida (0,9 ml) se le añadieron carbonato potásico (40 mg), yoduro potásico (16 mg) y una muestra del compuesto bruto (31 mg). La mezcla de reacción se agitó durante 20 h a 30°C. Se añadió otra muestra del compuesto bruto (6 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 h más a 30°C. Los sólidos se retiraron por filtración, se lavaron con dimetilformamida (0,3 ml) y después se desecharon. A la segunda solución de dimetilformamida se le añadió agua (1,6 ml) y el sólido resultante se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Interchrom Puriflash de 2 g, SiOH 15-35 µm, eluyendo con diclorometano/metanol, 95:5) y después otra purificación por cromatografía sobre gel de sílice (columna Chromabond OH de 2 g, 45 µm, eluyendo con diclorometano para dar 8,8'-{5-[3-(4-metil-4-metildisulfanilpentanoil-amino)propiloxi]-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)}-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzo-diazepin-5-ona] (0,2 mg):

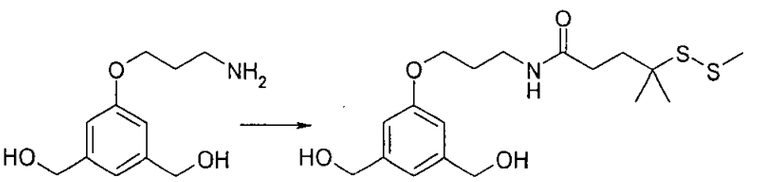
LC/MS (Método A1, Plataforma I): ES: m/z = 896 MH^+

Tiempo de retención = 4,09 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm): 1,29 (s, 6H); 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H); de 1,92 a 2,03 (m, 4H); 2,28 (m, 2H); 2,39 (s, 3H); 2,97 (m, 4H); 3,45 (c, J = 6,0 Hz, 2H); 3,89 (c, J = 5,5 Hz, 2H); 3,96 (s, 6H); 4,04 (t, J = 5,0 Hz, 2H); 4,27 (s ancho, 4H); 5,14 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,20 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,60 (m, 2H); 5,84 (t ancho, J = 6,0 Hz, 1H); 6,83 (s, 2H); 6,94 (s, 2H); 7,09 (s, 1H); 7,53 (s, 2H); 7,64 (d, J = 5,0 Hz, 2H).

240

1-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-propiloxi]-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno



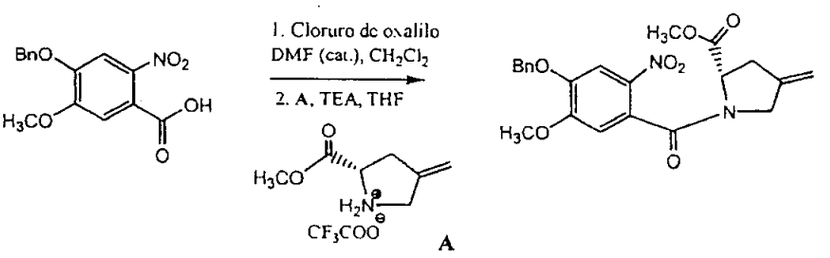
A una solución de 1-(3-amino-propiloxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (50 mg) en dimetilformamida (1 ml) se le añadieron ácido 4-metil-4-metildisulfanil-pentanoico (44 mg), N,N'-diisopropilcarbodiimida (35 ml) y 1-hidroxibenzotriazol hidrato (5,8 mg). Después de 15 h a temperatura ambiente, a la mezcla de reacción se le añadió agua y la solución acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro sódico, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Interchrom Puriflash de 5 g, SiOH 15-35 µm), eluyendo con metanol/diclorometano, 5:95 para dar 1-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-propiloxi]-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (48 mg):

LC/MS (Método A1, ZQ): ES m/z = 388 MH^+

Tiempo de retención = 3,03 minutos

^{1}H R.M.N. (300 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): 1,24 (s, 6H); de 1,76 a 1,87 (m, 4H); 2,16 (m, 2H); 2,40 (s, 3H); 3,19 (c, J = 6,5 Hz, 2H); 3,95 (t, J = 6,5 Hz, 2H); 4,44 (d ancho, J = 5,5 Hz, 4H); 5,12 (d, J = 5,5 Hz, 2H); 6,73 (s ancho, 2H); 6,83 (s ancho, 1H); 7,92 (t ancho, J = 5,5 Hz, 1H)

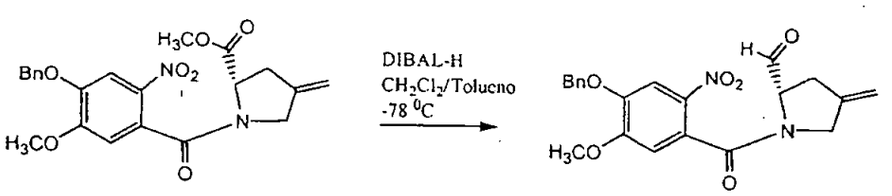
• Ejemplo 11: Preparación de productos de partida y/o intermedios



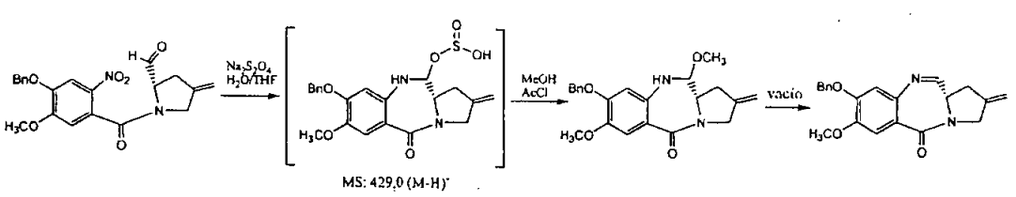
A

A una solución de ácido 4-benciloxi-5-metoxi-2-nitrobenzoico (4,8 g, 16 mmol) en diclorometano anhidro (80 ml) y THF (5 ml) se le añadieron cloruro de oxalilo (2,8 ml, 32 mmol) y DMF (30 µl, 0,38 mmol) a temperatura ambiente. Se formaron grandes cantidades de burbujas después de la adición de DMF. La mezcla se agitó durante una noche y después los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se co-evaporó una vez más mediante la adición de diclorometano anhidro para dar el cloruro de acetilo en forma de un sólido amarillo.

A una solución de éster metílico de 4-metileno-*L*-prolina, compuesto **A**, (3,95 g, 15,5 mmol) en THF anhidro (80 ml) se le añadió trietilamina (6,7 ml, 48 mmol) a 0°C. Después de 2 minutos, se añadió rápidamente el cloruro de acetilo anterior en THF anhidro (80 ml) durante 10 minutos mediante una cánula a la misma temperatura. La solución turbia amarilla obtenida se agitó a 0 ~ 5°C durante 30 minutos y después a temperatura ambiente durante 4 horas. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo dos veces y las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución al 2% de HCl y salmuera y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró y los disolventes se retiraron. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Hexanos/AcOEt, 1:1, 1:1,5) para dar éster metílico del ácido (2S)-4-(metileno)-1-[5-metoxi-2-nitro-4-(fenilmetoxi)-benzoil]-2-pirrolidinacarboxílico en forma de un sólido amarillo (5,6 g, r = 85%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): el compuesto aparece como un par de rotámeros distintos. δ 7,76 (s, 0,7H), 7,73 (s, 0,3H), 7,43-7,29 (m, 5H), 6,83 (s, 0,7H), 6,80 (s, 0,3H), 5,17 (s, 1,4H), 5,16 (s, 0,6H), 5,10-4,89 (m, 2,7H), 4,57 (d, J = 16 Hz, 0,3H), 4,19-4,12 (m, 0,7H), 3,95-3,77 (m, 6,3H), 3,57 (s, 1H), 3,06-2,96 (m, 1H), 2,73-2,62 (m, 1H); ^{13}C RMN (400 Hz, $CDCl_3$): 171,8, 171,7, 166,5, 166,2, 154,9, 154,4, 148,25, 148,18, 141,7, 141,3, 137,19, 137,13, 135,3, 135,2, 128,7, 128,43, 128,41, 127,5, 127,3, 109,5, 109,1, 109,0, 108,9, 71,3, 60,6, 58,1, 56,7, 56,5, 52,39, 52,37, 52,0, 50,2, 37,1, 35,5; MS (ESI): *m/z* 449,3 $(M + Na)^+$.



A una solución del éster (3,15 g, 7,39 mmol) en diclorometano anhidro (9 ml) y tolueno (27 ml) se le añadió gota a gota dibal-H (15 ml, 1,0 M en tolueno) mediante una bomba de jeringa durante 30 minutos a -78°C. La mezcla se mantuvo en agitación a -78°C durante 2 horas y el análisis por TLC (hexanos/AcOEt, 1:1,5) mostró que se había consumido todo el material de partida. La reacción se interrumpió con metanol (0,3 ml, 7,4 mmol) a -78°C y se añadió HCl al 5% (20 ml) seguido de la adición de AcOEt (50 ml). El baño de hielo seco/acetona se retiró y la mezcla se calentó a 0°C y se agitó durante 15 minutos. La capa acuosa se extrajo dos veces con AcOEt y las capas orgánicas combinadas se lavaron con HCl frío al 5% y salmuera y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Se filtró a través de celite y los disolventes se retiraron. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (Hexanos/AcOEt, 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 100% de AcOEt) para dar (2S)-4-(metileno)-1-[5-metoxi-2-nitro-4-(fenilmetoxi)benzoil]-2-pirrolidinacarboxaldehído en forma de un sólido amarillo esponjoso (2,69 g, r = 92%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): el compuesto aparece como un par de rotámeros distintos. δ 9,75 (s, 0,7H), 9,32 (s, 0,3H), 7,76 (s, 0,7H), 7,69 (s, 0,3H), 7,45-7,31 (m, 5H), 6,85 (s, 0,7H), 6,80 (s, 0,3H), 5,19-4,82 (m, 4,7H), 4,56 (d, J = 16 Hz, 0,3H), 4,14-3,79 (m, 5H), 2,99-2,68 (m, 2H); ^{13}C RMN (400 Hz, $CDCl_3$): 198,3, 197,1, 167,1, 155,0, 154,6, 148,4, 141,3, 140,4, 137,2; 135,2, 128,7, 128,5, 128,4, 127,5, 126,9, 126,6, 109,8, 109,4, 109,3, 109,2, 109,1, 71,3, 66,6, 64,3, 56,7, 56,6, 52,2, 50,6, 33,2, 31,9; MS (ESI): *m/z* 419,2 $(M + Na)^+$.

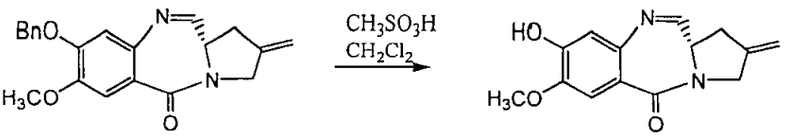


Procedimiento 1: A una solución de (2S)-4-(metileno)-1-[5-metoxi-2-nitro-4-(fenilmetoxi)benzoil]-2-pirrolidinacarboxaldehído (1,0 equivalente) en THF/H_2O (v/v, 1,7:1, 0,03 M) se le añadió en porciones hidrosulfito sódico (5~8 equivalente) durante 2 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se agitó adicionalmente durante 6~20 horas y se controló mediante análisis por TLC (1:2 de hexanos/AcOEt y 5:1 de CH_2Cl_2/MeOH). Después de que el aldehído se consumiera casi totalmente, la reacción se interrumpió con metanol (aproximadamente el mismo

volumen que el THF usado). Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío (temperatura <40ºC) y el sólido restante se puso a alto vacío para secarlo completamente. El sólido se suspendió en metanol anhidro (0,03 M) y se añadió gota a gota AcCl (8~10 equivalente) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 15 minutos, la solución turbia se filtró y el sólido se lavó con metanol anhidro. El filtrado amarillo transparente se agitó a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas y se inactivó con bicarbonato sódico saturado. Después de que se retirara la mayor parte del metanol por evaporación rotatoria, el material restante se diluyó con diclorometano y agua. La capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se filtraron. Los disolventes se retiraron y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexanos/AcOEt, 1:3, 1:5) para dar (11aS)-7-metoxi-2-metileno-8-(fenilmetoxi)-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona con un rendimiento de 70% a 85%. Los espectros de RMN son coherentes con la bibliografía indicada. MS (ESI): *m/z* 371,2 $(M + Na)^+$. MS (ESI, con CH_3OH): *m/z* 403,3 $(M + CH_3OH + Na)^+$. MS (ESI, con H_2O): *m/z* 389,2 $(M + H_2O + Na)^+$.

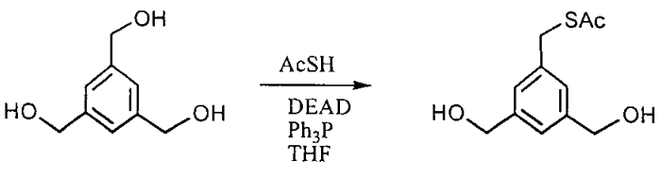
Procedimiento 2: A una solución de (2S)-4-(metileno)-1-[5-metoxi-2-nitro-4-(fenilmetoxi)benzoil]-2-pirrolidinacarboxaldehído (1,0 equivalente) en $MeOH/H_2O$ (v/v, 3,2:1, 0,03 M) se le añadió en porciones hidrosulfito sódico (6~8 equivalentes) durante 2 minutos a temperatura ambiente, seguido de la adición de hidrosulfato sódico (0,5~1,0 equivalentes). La mezcla se agitó adicionalmente durante 12~20 horas y se controló mediante análisis por TLC (1:2 de hexanos/AcOEt y 5:1 de CH_2Cl_2/MeOH). Después de que se consumiera casi todo el intermedio [MS (ESI): 459,0 $(M - H)^-$], la reacción se interrumpió con bicarbonato sódico saturado a pH 5~6. Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío (temperatura <40ºC) y el sólido restante se puso a alto vacío para secarlo completamente. El sólido se suspendió en metanol anhidro (0,03 M) y se añadió gota a gota AcCl (8~10 equivalentes) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 15 minutos, la solución turbia se filtró y el sólido se lavó con metanol anhidro. El filtrado amarillo transparente se agitó a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas y se inactivó con bicarbonato sódico saturado. Después de que se retirara la mayor parte del metanol por evaporación rotatoria, el material restante se diluyó con diclorometano y agua. La capa acuosa se extrajo con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se filtraron. Los disolventes

se retiraron y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexanos/AcOEt, 1:3, 1:5) para dar (11aS)-7-metoxi-2-metileno-8-(fenilmetoxi)-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona con un rendimiento de 65% a 80%.



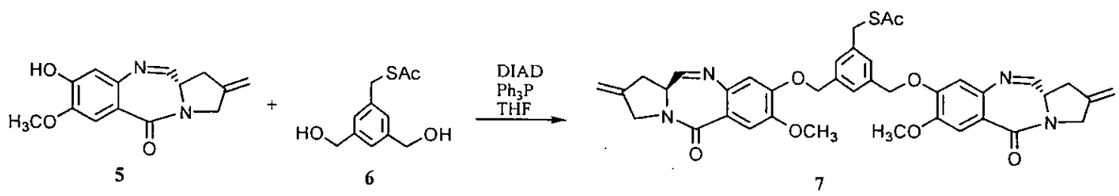
A una solución del material de partida (98 mg, 0,28 mmol) en diclorometano anhidro (2 ml) se le añadió una solución recién mezclada de ácido metanosulfónico (2 ml) en diclorometano anhidro (4 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas y se vertió en hielo (~30 g), se inactivó con $NaHCO_3$ saturado y se diluyó con diclorometano. La capa acuosa se extrajo una vez con diclorometano y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y los disolventes se retiraron. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (CH_2Cl_2/MeOH, 15:1) para dar el producto en forma de un sólido amarillo (29 mg). La capa acuosa anterior se agitó a temperatura ambiente durante una noche y se extrajo con diclorometano y posteriormente con AcOEt. El diclorometano combinado y el AcOEt se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y los disolventes se retiraron para dar (11aS)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona (25 mg). El rendimiento total es de 74%. ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7,65 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 7,48 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,35 (s a, 1H), 5,17 (t, J = 1,6 Hz, 1H), 5,14 (7, J = 1,6 Hz, 1H), 4,26 (s, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,87-3,83 (m, 1H), 3,12-3,05 (m, 1H), 2,91 (d, J = 16 Hz, 1H); MS (ESI): *m/z* 281,0 $(M + Na)^+$. MS (ESI, con agua): *m/z* 258,9 $(M + H)^+$, *m/z* 299,1 $(M + H_2O + Na)^+$.

- Ejemplo 12: 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



A una solución de trifenilfosfina (577 mg, 2,2 mmol) en THF anhidro (5 ml)

se le añadió gota a gota azodicarboxilato de dietilo (2,2 M en tolueno, 791 µl, 1,7 mmol) a 0°C. Después de un periodo de agitación a 0°C durante 50 minutos, se añadió gota a gota una solución de 1,3,5-tri(hidroximetil)benceno (269 mg, 1,6 mmol, preparada por reducción de 1,3,5-bencenotricarboxilato de trimetilo con hidruro de litio y aluminio en THF, co-evaporación con benceno seco y secado a alto vacío durante dos horas antes del uso) y ácido tioacético (108 µl, 1,45 mmol) en THF seco (4 ml). Después de 1 hora, el baño de hielo/agua se retiró y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida para dar 5-acetiltiometil-1,3-bis(hidroximetil)-benceno en forma de un sólido incoloro (110 mg). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7,13-6,99 (m, 3H), 4,45 (t ap., J = 20,4 Hz, 4H), 3,98 (t ap., J = 20,4 Hz, 4H), 3,73 (s a, 2H), 2,24 (t ap., J = 20,4 Hz, 3H); MS (ESI): *m/z* 249,0 $(M + Na)^+$.

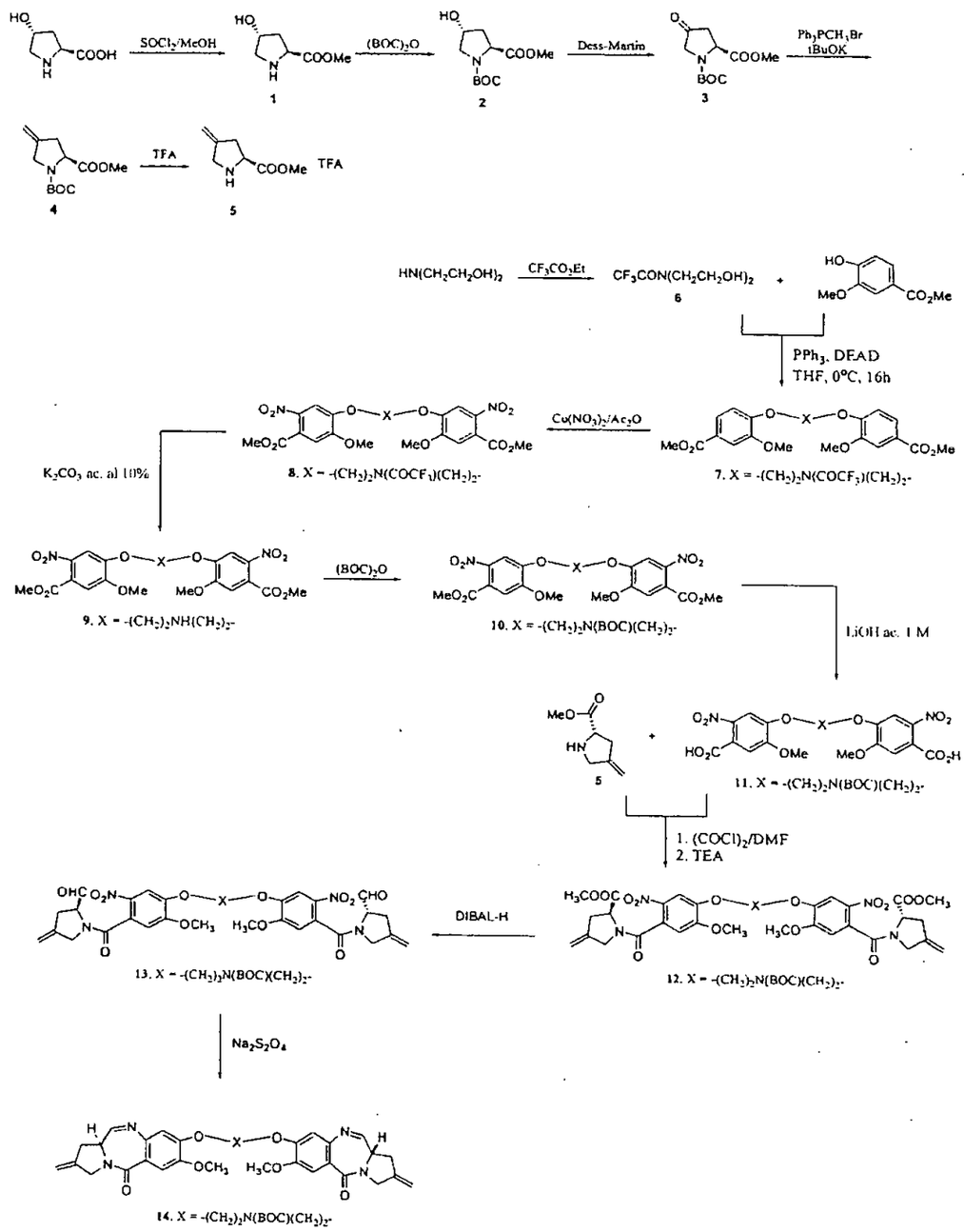


A una solución de trifenilfosfina (28 mg, 0,1 mmol) en THF anhidro (0,3 ml) se le añadió gota a gota azodicarboxilato de disopropilo (19 µl, 0,09 mmol) a 0°C. Después de agitar a 0°C durante 35 minutos, se añadió una solución de (11aS)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona, el compuesto **5,** (18 mg, 0,07 mmol, co-evaporado con benceno seco y secado a alto vacío durante dos horas antes del uso) en THF seco (0,2 ml). La mezcla se mantuvo en agitación durante 10 minutos antes de que se añadieran 5-acetiltiometil-1,3-bis(hidroximetil)-benceno y el compuesto **6,** (6,6 mg, 0,03 mmol, co-evaporado con benceno seco y secado a alto vacío durante dos horas antes del uso) en THF seco (0,2 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación a 0°C durante 35 minutos. El baño de hielo/agua se retiró y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 21 horas. Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida para formar el producto bruto que se purificó adicionalmente por HPLC preparativa (columna C18, CH_3CN/H_2O) para dar 0,7 mg de 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-

pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], compuesto **7**. MS (ESI, con H_2O): *m/z* 765,3 $(M + 2H_2O + Na)^+$, 747,3 $(M + H_2O + Na)^+$, 729,2 $(M + Na)^+$, 707,3 $(M + H)^+$, 663,2 $(M - Ac)^-$.

• Ejemplo 13 Éster terc-butílico del ácido bis-{2-[(S)-2-metileno-7-metoxi-5-oxo-1,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi]-etil}-carbámico

Esquema 1



Compuesto **1**. Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (5,6 ml, 76,3 mmol) a metanol seco (76 ml) a -20°C, seguido de la adición de *trans*-4-hidroxi-*L*-prolina (5,0 g, 38,1 mmol). La mezcla resultante se dejó calentar a ta y se agitó durante 20 h. El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se secó adicionalmente a alto vacío para proporcionar éster metílico de *trans*-4-hidroxi-*L*-prolina **1** en forma de un sólido blanco: ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ 2,18 – 2,23 (m, 2H), 3,06 (m, 1H), 3,32 – 3,36 (m, 2H), 3,76 (s, 3H), 4,42 (s a, 1H), 4,48 (dd, J = 5,4, 8,1 Hz, 1H), 5,56 (s a, 1H); EIMS *m/z* 146 ([M]$^+$+1).

Compuesto **2**. A una solución de éster metílico de *trans*-4-hidroxi-*L*-prolina **1** (4,48 g, 30,9 mmol) y bicarbonato sódico (1,56 g, 18,5 mmol) en DMF anhidra (42 ml) se le añadió una solución de $(BOC)_2O$ en DMF (20 ml) a 0°C en una atmósfera de argón. Después de agitar durante una noche a ta, la reacción se interrumpió mediante la adición de 100 ml de H_2O a 0°C y se extrajo con EtOAc (4 x 80 ml). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (100 ml), se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró con un evaporador rotatorio. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 1:1 de hexanos/EtOAc) para dar éster metílico de *trans*-4-hidroxi-*L*-prolina **2** protegido con N-BOC en forma de un aceite incoloro: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$, rotámeros) δ 1,38 y 1,43 (2 x s, 9H), 2,04 – 2,07 (m, 1H), 2,23 – 2,27 (m, 2H), 3,54 – 3,63 (m, 2H), 3,70 (s, 3H), 4,34 – 4,38 (m, 1H), 4,46 (s a, 1H).

Compuesto **3**. (Franco Manfre, Jean-Marc Kern, y Jean-Francois Biellmann *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2060-2065). El compuesto **2,** éster metílico de *trans*-4-hidroxi-*L*-prolina, protegido con N-BOC (3,24 g, 13,2 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (132 ml) y se enfrió a 0°C. Se añadieron piridina y peryodinano de Dess-Martin y la agitación se mantuvo hasta que el análisis por TLC no mostró ningún MP restante. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2, se lavó con $Na_2S_2O_3$ ac. al 10% (3 x 50 ml), HCl ac. 1 N (50 ml), $NaHCO_3$ ac. sat. (50 ml) y salmuera (50 ml), se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 7:3 de hexanos/EtOAc) dio el éster metílico de 4-oxo-*L*-prolina protegido con N-BOC **3** en forma de un aceite amarillo claro: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$, rotámeros) δ 1,44 (s, 9H), 2,53 – 2,57 (m, 1H), 2,85 – 2,96 (m, 1H), 3,72 y 3,74 (2 x s, 3H), 3,85 – 3,87 (m, 2H), 4,67 – 4,77 (m, 1H).

Compuesto **4**. (Kuei-Ying Lin, Mark Matteucci US 5414077) Una solución de *t*-butóxido potásico (2,51 g, 22,3 mmol) en THF anhidro (40 ml) se añadió a una suspensión de bromuro de metiltrifenilfosfonio (7,99 g, 22,3 mmol) en THF (40 ml) a 0°C. La suspensión de iluro amarillo resultante se agitó a 0°C durante 2 h antes de la adición de la solución de éster metílico de 4-oxo-*L*-prolina protegido con N-BOC **3** (2,72 g, 11,2 mmol) en THF (32 ml). Después de agitar a ta durante 1 h, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (100 ml), se lavó con H_2O (80 ml) y salmuera (80 ml), se secó ($MgSO_4$) y se concentró. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 9:1 de hexanos/EtOAc) produjo el éster metílico de 4-metileno-*L*-prolina protegido con N-BOC, compuesto **4,** en forma de un aceite incoloro: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$, rotámeros) δ 1,40 y 1,45 (2 x s, 9H), 2,58 – 2,62 (m, 1H), 2,88 – 2,98 (m, 1H), 3,69 y 3,70 (2 x s, 3H), 4,03 – 4,06 (m, 2H), 4,36 – 4,49 (m, 1H), 4,97 – 4,99 (m, 2H); EIMS *m/z* 264 ($[M]^+$+Na).

Compuesto **5**. El éster metílico de 4-metileno-*L*-prolina protegido con N-BOC, compuesto **4,** (0,8 g, 3,31 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (6,5 ml) y se enfrió a 0°C. Se añadió gota a gota una solución de ácido trifluoroacético (6,5 ml) en CH_2Cl_2 (6,5 ml) y la mezcla resultante se agitó a ta durante 1,5 h. Después de la retirada de los disolventes volátiles con un evaporador rotatorio, el residuo pardo se disolvió en 10 ml de H_2O y se lavó con Et_2O (3 x 5 ml). La solución acuosa se concentró y se secó adicionalmente a alto vacío para producir éster metílico de 4-metileno-*L*-prolina **5** en forma de la sal TFA: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$, rotámeros) δ 2,83 – 2,87 (m, 1H), 3,05 – 3,11 (m, 1H), 3,80 y 3,81 (2 x s, 3H), 4,00 – 4,10 (m, 2H), 4,55 (dd, *J* = 5,7, 5,7 Hz, 1H), 5,17 – 5,21 (m, 2H); ^{13}CRMN δ 34,0, 49,1, 53,8, 59,3, 111,7, 137,6, 169,8; EIMS *m/z* 142 ($[M]^+$+1).

Compuesto **6**. (Kamal, A.; et al *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4679-4688)
Se disolvió dietanolamina (3,57 g, 34 mmol) en metanol (20 ml) y se trató con Et_3N (4,7 ml, 34 mmol) y trifluoroacetato de etilo (4,90 g, 34 mmol) durante 20 h a ta, seguido de la adición de 1 ml más de CF_3COOEt. Después de 20 h más, la retirada de los disolventes volátiles a alto vacío produjo el compuesto N-trifluoroacetil-dietanolamina **6** en forma de un aceite amarillo claro, que se usó sin purificación adicional.

Compuesto **7**. Se añadió gota a gota azodicarboxilato de dietilo (7,66 g, 44 mmol) a una solución agitada de valinato de metilo (7,30 g, 40,1 mmol) y trifenilfosfina (15,67 g, 59,7 mmol) en THF anhidro (57 ml) a 0°C y la mezcla resultante se agitó durante 1 h a esta temperatura seguido de la adición de una solución de N-trifluoroacetil-dietanolamina **6** (7,30 g, 40,1 mmol) en THF anhidro (20 ml). Después de agitar durante una noche a ta, la reacción se interrumpió con H_2O (100 ml) y se extrajo con Et_2O (3 x 80 ml). Las capas de Et_2O combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, de 8:2 a 7:3 hexanos/EtOAc) produjo N-trifluorocetil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-fenoxi)etil]amina, compuesto **7,** en forma de un sólido blanco: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,81 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,87 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 4,04 – 4,08 (m, 4H), 4,28 – 4,32 (m, 4H), 6,84 y 6,85 (2 x d, J = 6,3 Hz, 2H), 7,50 y 7,51 (2 x d, J = 1,5 Hz, 2H), 7,61 (dd, J = 1,5, 6,3 Hz, 2H).

Compuesto **8**. Se añadió $Cu(NO_3)_2$ sólido·xH_2O (2,33 g, 12,41 mmol) a una solución agitada de N-trifluorocetil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-fenoxi)etil]amina **7** (2,62 g, 4,96 mmol) en anhídrido acético (50 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 h y a ta durante 2 h y después se vertió en 200 ml de hielo-agua. La agitación se mantuvo durante 1 h más. El precipitado amarillo resultante se recogió por filtración. La purificación adicional con cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 6:4 de hexanos/EtOAc) produjo N-trifluorocetil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-5-nitro-feniloxi)etil]amina, compuesto **8,** en forma de un sólido amarillo claro: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,86 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,886 (s, 3H), 3,890 (s, 3H), 4,04 – 4,09 (m, 4H), 4,30 – 4,35 (m, 4H), 6,98 y 6,99 (2 x s, 2H), 7,37 y 7,40 (2 x s, 2H).

Compuesto **9**. Una solución de N-trifluorocetil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-5-nitro-feniloxi)etil]amina **8** (2,58 g, 4,16 mmol) en THF-MeOH (1:2, 48 ml) se trató con K_2CO_3 ac. al 10% (16 ml) a ta durante 12 h. Después de la retirada de los materiales volátiles con un evaporador rotatorio, el residuo se diluyó con 100 ml de H_2O y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Las capas de EtOAc combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron, produciendo N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-5-nitro-feniloxi)etil]amina, compuesto **9,** en forma de un sólido amarillo, que se usó sin purificación adicional:

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,17 (t, J = 3,9 Hz, 4H), 3,89 (s, 6H), 3,93 (s, 6H), 4,19 (t, J = 3,9 Hz, 4H), 7,05 (s, 2H), 7,47 (s, 2H).

Compuesto **10**. Se suspendieron N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-5-nitrofenil-oxi)etil]amina, compuesto **9,** (bruto, 4,16 mmol) y $NaHCO_3$ (210 mg, 2,50 mmol) en THF, la mezcla se trató con $(BOC)_2O$ (999 mg, 4,58 mmol) a 0°C y la agitación se mantuvo a ta durante 3 h. Después de la retirada del THF, el residuo se repartió entre H_2O y EtOAc (100/100 ml). La capa acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (2 x 50 ml). Las capas de EtOAc combinadas se lavaron con salmuera (80 ml), se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 6:4 de hexanos/EtOAc) produjo N-terc-butoxicarbonil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-5-nitro-feniloxi)etil]amina, compuesto **10,** en forma de un sólido amarillo claro: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,44 (s, 9H), 3,77 (m, 4H), 3,83, 3,86 y 3,87(3 x s, 12H), 4,20 y 4,26 (2 x t, J = 3,9 Hz, 4H), 6,97 y 6,99 (2 x s, 2H), 7,36 y 7,40 (2 x s, 2H); EIMS *m/z* 646 ([M]$^+$+Na).

Compuesto **11**. Se suspendió N-terc-butoxicarbonil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metoxi-5-nitro-feniloxi)etil]amina, compuesto **10** (2,11 g, 3,39 mmol) en THF-MeOH-H_2O (3:1:1, 65 ml) y se trató con LiOH ac. 1 M (14 ml) a ta durante 3 h. Después de la retirada de los disolventes volátiles, el residuo se diluyó con H_2O (25 ml). La solución acuosa resultante se acidificó a pH ~ 1 con HCl concentrado. La N-terc-butoxicarbonil-N,N-di[2-(4-carboxi-2-metoxi-5-nitro-feniloxi)etil]amina que precipitó, compuesto **11,** se recogió por filtración, se lavó con H_2O y se secó adicionalmente a alto vacío: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$, rotámeros) δ 1,39 (s, 9H), 3,70 (m, 4H), 3,88 y 3,89(2 x s, 6H), 4,29 (m, 4H), 7,29 y 7,31 (2 x s, 2H), 7,63 (s, 2H), 13,60 (s a, 2H); ^{13}CRMN δ 27,8, 46,2 y 46,6, 56,3 y 56,4, 67,2, 79,2, 107,9 y 108,0, 111,3, 141,4 y 141,5, 149,1, 151,7, 154,5, 165,9; HRMS *m/z* calc. para $C_{25}H_{29}N_3O_{14}Na$ 618,1547, encontrado 618,1552 ([M]$^+$+Na).

Compuesto **12**. Se añadió una cantidad catalítica de DMF (2 gotas) a una solución de la N-terc-butoxicarbonil-N,N-di[2-(4-carboxi-2-metoxi-5-nitro-feniloxi)etil]amina 11 (194 mg, 0,33 mmol) y cloruro de oxalilo (72,7 µl, 0,81 mmol) en THF anhidro (6,5 ml) y la mezcla resultante se agitó a ta durante una noche. El exceso de THF y cloruro de oxalilo se retiró con un evaporador rotatorio. El cloruro de acetilo se

suspendió de nuevo en THF recién preparado (4 ml) y se añadió gota a gota a una solución de éster metílico de 4-metileno-*L*-prolina 5 (206,7 mg, 0,81 mmol), Et_3N (0,19 ml, 1,39 mmol) y H_2O (0,4 ml) en THF (1 ml) a 0°C en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se dejó calentar a ta y la agitación se mantuvo durante 2 h. Después de la retirada del THF, el residuo se repartió entre H_2O y EtOAc (10/10 ml). La capa acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (2 x 8 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 ml), se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 2:8 de hexanos/EtOAc) produjo éster terc-butílico del ácido bis{2-[5-metoxi-2-nitro-4-[(S)-4-metileno-2-metoxicarbonil-1-pirrolidinilcarbonil]-feniloxi]-etil}-carbámico **12** en forma de un aceite amarillo claro (rotámeros): ^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$, rotámeros) δ 1,46 (s, 9H), 2,68 – 2,75 (m, 2H), 2,99 – 3,10 (m, 2H), 3,60 – 4,28 (m, 24H), 4,56 – 5,12 (m, 6H), 6,78 – 6,83 (m, 2H), 7,63 – 7,71 (m, 2H); EIMS *m/z* 864 ($[M]^+$+Na).

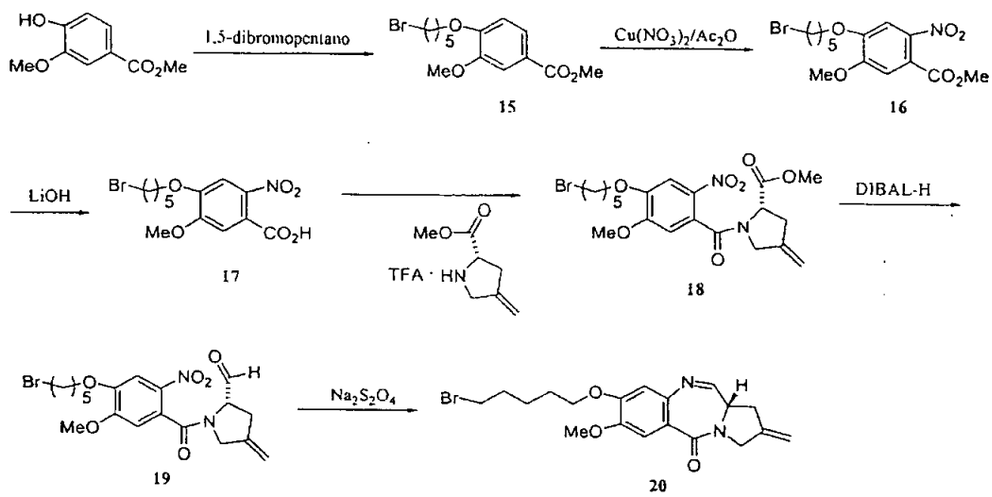
Compuesto **13**. A una solución agitada vigorosamente de éster terc-butílico del ácido bis{2-[5-metoxi-2-nitro-4-[(S)-4-metileno-2-metoxicarbonil-1-pirrolidinilcarbonil]feniloxi]-etil}-carbámico **12** (100 mg, 0,12 mmol) en tolueno anhidro (2,4 ml) se le añadió gota a gota una solución de DIBAL-H (480 µl de una solución 1 M en tolueno) a -78°C en una atmósfera de argón. Después de agitar la mezcla durante 45 min más, el exceso de reactivo se descompuso mediante la adición de cinco gotas de metanol seguido de HCl al 5% (4 ml). La mezcla resultante se dejó calentar a 0°C. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo de nuevo con CH_2Cl_2 (3 x 3 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 95:5 de $CHCl_3$/MeOH) produjo éster terc-butílico del ácido bis{2-[5-metoxi-2-nitro-4-[(S)-4-metileno-2-formil-1-pirrolidinilcarbonil]feniloxi]-etil}-carbámico **13** en forma de un aceite amarillo claro (84 mg, 91%).

Compuesto **14**. Una mezcla de éster terc-butílico del ácido bis{2-[5-metoxi-2-nitro-4-[(S)-4-metileno-2-formil-1-pirrolidinilcarbonil]feniloxi]-etil}-carbámico **13** (180 mg, 0,23 mmol), $Na_2S_2O_4$ (1,84 mmol, 8 equiv.), 3,5 ml de THF y 2,2 ml de H_2O se agitó a ta durante 20 h. Los disolventes se retiraron a alto vacío. El residuo se suspendió

de nuevo en MeOH (30 ml) y se añadió gota a AcCl hasta un valor de pH de ~2. La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h. La reacción se trató mediante la retirada de la mayor parte del MeOH y después se diluyó con EtOAc (25 ml). La solución de EtOAc se lavó con $NaHCO_3$ ac. sat. y salmuera, se secó ($MgSO_4$) y se concentró. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 97:3 de $CHCl_3$/MeOH) produjo éster terc-butílico del ácido bis-{2-[(S)-2-metileno-7-metoxi-5-oxo-1,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi]-etil}-carbámico **14** en forma de un sólido blanco (86 mg, 50%).

Ejemplo 14: (11aS)-7-(5-bromopentiloxi)-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona

Esquema 2



Compuesto **15**. A una solución de valinato de metilo (9,109 g, 50 mmol) en acetona (200 ml) se le añadieron K_2CO_3 (27,64 g, 200 mmol) y 1,5-dibromopentano (20,4 ml, 150 mmol). La mezcla resultante se calentó a reflujo. Después de 6 h, el análisis por TLC no mostró ningún material de partida restante. La mezcla se enfrió a ta y el sólido se retiró por filtración. El filtrado se concentró. La purificación por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 8:2 de hexanos/EtOAc) produjo éster metílico del ácido 4-(5-bromopentiloxi)-3-metoxi-benzoico **15** en forma de un sólido blanco (13,65 g, 82%): ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,60 – 1,66 (m, 2H), 1,85 – 1,97 (m, 4H), 3,42 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 4,06 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 6,85 (d, J = 6,3 Hz, 1H), 7,52 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,63 (dd, J = 6,3, 1,5 Hz, 1H);

EIMS *m/z* 353 y 355 ([M]$^+$+Na).

Compuesto **16**. Se añadió $Cu(NO_3)_2 \cdot xH_2O$ sólido (3,64 g, 19,42 mmol) a una solución agitada del éster metílico del ácido 4-(5-bromopentiloxi)-3-metoxi-benzoico **15** (5,36 g, 16,18 mmol) en anhídrido acético (81 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 h y a ta durante 2 h y después se vertió en 200 ml de hielo-agua. La agitación se mantuvo durante 1 h más. El precipitado amarillo resultante se recogió por filtración y se lavó con agua. Se secó adicionalmente a alto vacío para producir el compuesto éster metílico del ácido 4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoico **16** en forma de un sólido amarillo claro (5,98 g), que se usó directamente en la siguiente etapa: ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,59 – 1,70 (m, 2H), 1,85 – 1,98 (m, 4H), 3,43 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 4,08 (t, J = 4,8 Hz, 2H), 7,05 (s, 1H), 7,42 (s, 1H). EIMS *m/z* 398 y 400 ([M]$^+$+Na).

Compuesto **17**. Se suspendió éster metílico del ácido 4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoico **16** (5,98 g, 15,9 mmol) en THF-MeOH-H_2O (3:1:1, 157 ml) y se trató con LiOH ac. 1 M (31 ml) a ta durante 5 h. Después de la retirada de los disolventes volátiles, el residuo se diluyó con H_2O (70 ml). La solución acuosa resultante se acidificó a un valor de pH de ~2 con HCl concentrado. El ácido 4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoico precipitado **17** se recogió por filtración, se lavó con H_2O y se secó de nuevo a alto vacío (5,47 g): ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,64 – 1,68 (m, 2H), 1,87 – 1,98 (m, 4H), 3,43 (t, J = 4,8 Hz, 2H), 4,08 (s, 3H), 4,10 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 7,21 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 13,60 (s a, 1H); EIMS *m/z* 384 y 386 ([M]$^+$+Na).

Compuesto **18**. Se añadió una cantidad catalítica de DMF (2 gotas) a una solución del ácido 4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoico **17** (270 mg, 0,74 mmol) y cloruro de oxalilo (80 µl, 0,89 mmol) en THF anhidro (7,5 ml) y la mezcla resultante se agitó a ta durante una noche. El exceso de THF y cloruro de oxalilo se retiraron con un evaporador rotatorio. El cloruro de acetilo se suspendió de nuevo en THF recién preparado (6 ml) y se añadió gota a gota a una solución de éster metílico de 4-metileno-*L*-prolina **5** (228 mg, 0,89 mmol), Et_3N (0,32 ml, 2,31 mmol) y H_2O (0,15 ml) en THF (1,5 ml) a 0°C en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se dejó calentar a ta y la agitación se mantuvo durante 4 h. Después de la retirada de

THF, el residuo se repartió entre H_2O y EtOAc (20/20 ml). La capa acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (3 x 10 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 6:4 de hexanos/EtOAc) produjo éster metílico de 1-[4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoil]-4-metileno-*L*-prolina **18** en forma de un aceite amarillo claro (rotámeros): ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$, rotámeros) δ 1,62 – 1,68 (m, 2H), 1,86 – 1,98 (m, 4H), 2,64 – 2,75 (m, 1H), 2,99 – 3,08 (m, 1H), 3,43 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,59 – 3,96 (m, 7H), 4,05 – 4,21 (m, 3H), 4,57 – 4,61 y 4,90 – 5,12 (m, 3H), 6,80 y 6,83 (2 s, 1H), 7,64 y 7,67 (2 s, 1H); EIMS *m/z* 507 y 509 ($[M]^+$+Na).

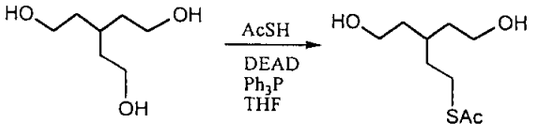
Compuesto **19**. A una solución agitada vigorosamente de éster metílico de 1-[4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoil]-4-metileno-*L*-prolina **18** (61 mg, 0,12 mmol) en tolueno anhidro – CH_2Cl_2 (3:1, 2,5 ml) se le añadió gota a gota una solución de DIBAL-H (188 µl de una solución 1 M en tolueno) a -78°C en una atmósfera de argón. Después de agitar la mezcla durante 45 min más, el exceso de reactivo se descompuso mediante la adición de tres gotas de metanol seguido de HCl al 5% (2 ml). La mezcla resultante se dejó calentar a 0°C. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo de nuevo con CH_2Cl_2 (3 x 2 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 1:1 de hexanos/EtOAc) produjo (S)-1-[4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoil]-4-metileno-2-pirrolidinacarboxaldehído **19** en forma de un aceite amarillo claro (44 mg, 80%).

Compuesto **20**. Una mezcla del (S)-1-[4-(5-bromopentiloxi)-5-metoxi-2-nitro-benzoil]-4-metileno-2-pirrolidinacarboxaldehído **19** (43,7 mg, 0,096 mmol), $Na_2S_2O_4$ (0,58 mmol, 6 equiv.), 1,5 ml de THF y 0,9 ml de H_2O se agitó a ta durante 18 h. Los disolventes se retiraron a alto vacío. El residuo se suspendió de nuevo en MeOH (6 ml) y se añadió gota a gota AcCl hasta un valor de pH de ~2. La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h. La reacción se trató mediante la retirada de la mayor parte del MeOH y después se diluyó con EtOAc (20 ml). La solución de EtOAc se lavó con $NaHCO_3$ ac. sat. y salmuera, se secó ($MgSO_4$) y se concentró. La purificación del residuo por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 98:2 de

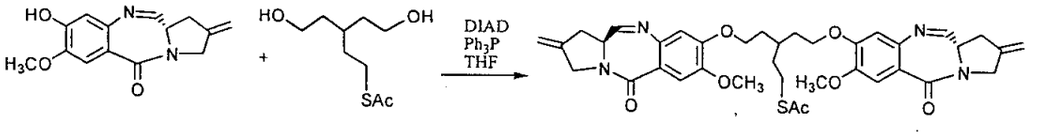
$CHCl_3$/MeOH) produjo (11aS)-7-(5-bromopentiloxi)-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona **20** en forma de un aceite amarillo claro (31 mg, 74%): ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,58 - 1,66 (m, 2H), 1,84 – 1,99 (m, 4H), 2,91 – 2,95 (m, 1H), 3,08 – 3,14 (m, 1H), 3,42 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,87 – 4,27 (m, 5H), 5,15 (s a, 1H), 5,18 (s a, 1H), 6,84 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,71 (d, J = 4,0 Hz, 1H); EIMS *m/z* 429 y 431 ([M]$^+$+Na).

Después, el compuesto **20** puede acoplarse a un resto de PBD preparado como en ejemplo 11 para formar un compuesto de la invención.

• Ejemplo 15: 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzo-diazepin-5-ona]



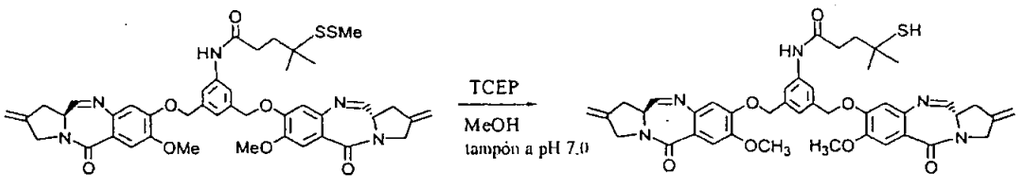
A una solución de trifenilfosfina (1,77 g, 6,8 mmol) en THF anhidro (15 ml) se le añadió gota a gota azodicarboxilato de dietilo (2,2 M en tolueno, 2,4 ml, 5,4 mmol) a 0ºC. Después de agitar a 0ºC durante 55 minutos, se añadió gota a gota una solución de 3-(2-hidroxietil)pentano-1,5-diol (740 mg, 5 mmol) y ácido tioacético (335 µl, 4,5 mmol) en THF seco (7 ml). Después de 1 hora, el baño de hielo/agua se retiró y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida ($CHCl_3$/MeOH, 20:1, 15:1, 10:1, 4:1) para dar 3-(2-acetiltioetil)pentano-1,5-diol en forma de un sólido blanco (350 mg) y se recuperó el material de partida triol (406 mg). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 3,65-3,63 (m, 4H), 3,45 (s a, 2H), 2,84-2,80 (m, 2H), 2,28 (s, 3H), 1,73-1,67 (m, 1H), 1,55-1,49 (m, 6H). MS (ESI): *m/z* 229,0 $(M + Na)^+$.



A una solución de trifenilfosfina (53 mg, 0,2 mmol) en THF anhidro (0,4 ml) se le

añadió gota a gota azodicarboxilato de disopropilo (36 µl, 0,17 mmol) a 0ºC. Después de agitar a 0ºC durante 25 minutos, se añadió una solución de (11aS)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona, el monómero PBD (38 mg, 0,14 mmol, co-evaporado con benceno seco y secado a alto vacío durante dos horas antes del uso) en THF seco (0,2 ml). La mezcla se mantuvo en agitación durante 10 minutos antes de que se añadiera el compuesto tioacetato (12 mg, 0,058 mmol, coevaporado con benceno seco y secado a alto vacío durante dos horas antes del uso) en THF seco (0,2 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación a 0ºC durante 35 minutos. El baño de hielo/agua se retiró y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. Los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida ($CHCl_3$/MeOH, 100:1, 50:1, 25:1, 20:1) para formar 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (19 mg, r = 47%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7,66 (d, J = 4,4 Hz, 2H), 7,46 (s, 2H), 6,78 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 5,14 (s, 2H), 4,26 (s, 4H), 4,17-4,09 (m, 4H), 3,88 (s, 6H), 3,87-3,83 (m, 2H), 3,13-3,06 (m, 2H), 2,94-2,90 (m, 4H), 2,29 (s, 3H), 1,95 (s a, 3H), 1,68 (s a, 4H). MS (ESI, con H_2O): *m/z* 745,3 $(M + 2H_2O + Na)^+$, 727,3 $(M + H_2O + Na)^+$, 709,2 $(M + Na)^+$.

• Ejemplo 16: Puede prepararse 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:



A una suspensión de hidrocloruro de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 52 mg, 0,18 mmol) en agua (0,3 ml) se le añadió gota a gota bicarbonato sódico saturado (~0,6 ml) para ajustar el valor del pH a 6~7. Después, se le añadió tampón fosfato (pH 7,0, 10 mM, Na_2HPO_4/H_3PO_4, 0,5 ml). Esta solución de TCEP obtenida se añadió a una mezcla de 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-

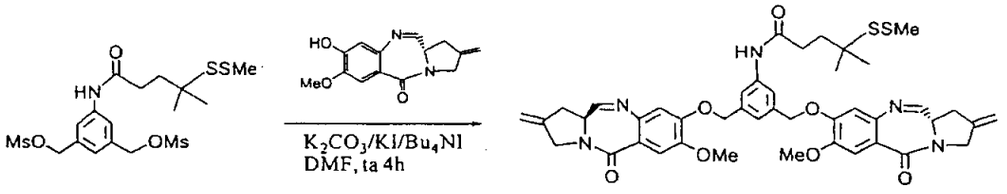
287

bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (29 mg, 0,036 mmol) en metanol (2,2 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se interrumpió con tampón fosfato (pH 6,5) y se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y los disolventes se retiraron a presión reducida para dar un sólido blanco. El sólido se disolvió en diclorometano/MeOH (2:1) y se evaporó de nuevo. Se añadió diclorometano y se evaporó. El residuo se puso a alto vació, se purificó mediante una columna C18 de fase inversa {CH_3CN/H_2O, el sólido se disolvió en CH_3CN/H_2O (3:1, 2 ml) y se agitó durante 30 minutos antes de cargarse sobre la columna} para formar 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoato)-amino-1,3-bencenodiilbis (metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (11 mg) en forma de un sólido blanco (método H).

MS (ESI): m/z = 786,3 MNa^+

m/z = 804,2 $MNa^+ + H_2O$

Puede prepararse 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:



A una solución de 5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bis-(mesiloximetil)-benceno (89 mg, 0,18 mmol) disuelto en DMF anhidra (2 ml) se le añadieron 8-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona (93 mg, 0,36 mmol), carbonato potásico en polvo (100 mg, 0,72 mmol), yoduro potásico en polvo (15 mg, 0,09 mmol) y yoduro de tetrabutilamonio (13 mg, 0,036 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar la mezcla durante una hora, se añadió una segunda porción de 8-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona (22 mg,

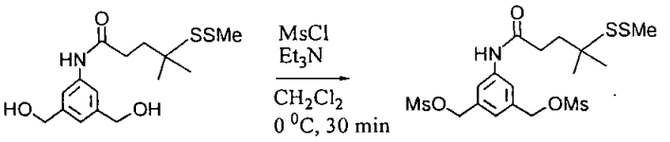
0,085 mmol). La solución se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas más. Después, la reacción se interrumpió con agua y se diluyó con diclorometano. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida seguido de alto vacío para retirar la DMF residual. Después, el residuo se purificó mediante una columna C18 de fase inversa (CH_3CN/H_2O) para formar 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (29 mg) en forma de un sólido blanco (método H).

MS (ESI): m/z = 832,2 MNa^+

m/z = 850,2 $MNa^+ + H_2O$

^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$-d1, en δ ppm): 7,67 (s a, 2H), 7,58-7,26 (m, 5H), 6,82 (s, 2H), 5,21-5,14 (m, 8H), 4,30 (s, 4H), 4,02-3,88 (m, 9H), 3,16-3,10 (m, 2H), 2,97-2,93 (m, 2H), 2,45-2,40 (m, 5H), 2,09-2,03 (m, 2H), 1,34 (s, 6H)

Puede prepararse 5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bis-(mesiloximetil)-benceno como se indica a continuación:



A una suspensión de 5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno (329 mg, 1,0 mmol) en diclorometano anhidro (7 ml) se le añadió gota a gota trietilamina (348 µl, 2,5 mmol) seguido de cloruro de metanosulfonilo (193 µl, 2,5 mmol) durante 10 minutos a -2°C. La solución se agitó a 0°C durante 30 minutos más y después se inactivó con una mezcla de hielo y agua. La mezcla se extrajo con diclorometano frío y las capas de diclorometano combinadas se lavaron con agua fría y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Se filtró y el filtrado se evaporó por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se purificó rápidamente mediante una columna corta de gel de sílice (Diclorometano/Hexanos/Acetato de etilo, 1:2:4) para formar 5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bis-(mesiloximetil)-benceno en forma de un aceite

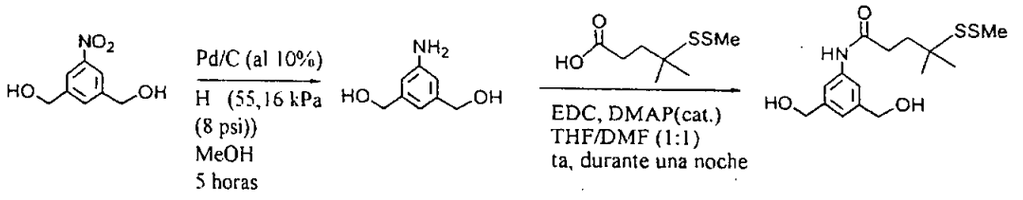
incoloro (410 mg).

MS (ESI): m/z = 508,0 MNa^+

m/z = 483,9 M-H

m/z = 519,9 M-H + $2H_2O$

Puede prepararse 5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno como se indica a continuación:



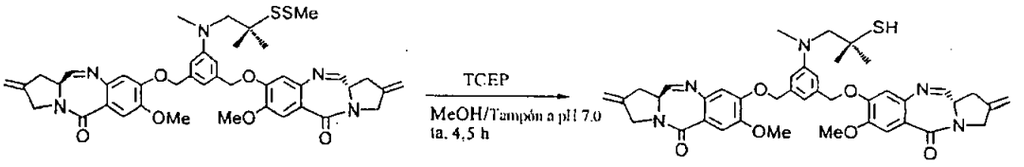
A una solución de 5-Nitro-*m*-xileno-α,α'-diol (890 mg, 5,4 mmol) en metanol (50 ml) se le añadió Pd/C (al 10%, 287 mg). Se introdujo una atmósfera de hidrógeno y la mezcla se hidrogenó a presión (H_2, 34,47-55,19 kPa (5~8 psi)) durante 5 horas a temperatura ambiente. La solución se filtró a través de celite y el filtrado se evaporó por evaporación rotatoria al vacío para dar 5-amino-*m*-xileno-α,α'-diol, que después se disolvió en THF (10 ml)/DMF (15 ml). Se añadió ácido 4-metilditio-4,4-dimetilbutanoico (1,05 g, 5,4 mmol) disuelto en THF (5 ml) a temperatura ambiente seguido de la adición de clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (2,1 g, 10,8 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (66 mg, 0,54 mmol). La mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante una noche y después se inactivó con cloruro de amonio al 10%, se extrajo con acetato de etilo, se lavó y se secó. Se filtró y los disolventes se retiraron por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (CH_2Cl_2/MeOH, 15:1, 10:1, 7:1) para formar 5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno en forma de un sólido blanco (729 mg).

MS (ESI): m/z = 352,1 MNa^+

^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$-d1, en δ ppm): 7,47 (s, 2H), 7,10 (s, 1H), 4,58 (s, 4H), 2,52-2,47 (m, 2H), 2,42 (s, 3H), 2,02-1,98 (m, 2H), 1,34 (s, 6H).

- Ejemplo 17: Puede prepararse 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-

tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:

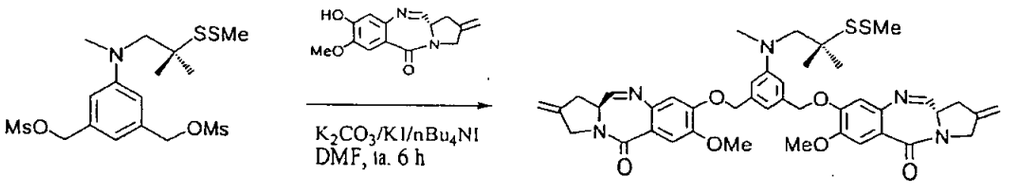


A una suspensión de hidrocloruro de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 64 mg, 0,22 mmol) en agua (0,05 ml) se le añadió gota a gota bicarbonato sódico saturado (~0,7 ml) para ajustar el valor del pH a 6~7. Después, se añadió tampón fosfato (pH 7,0, 10 mM, Na_2HPO_4/H_3PO_4, 0,8 ml). Esta solución de TCEP obtenida se añadió a una mezcla de 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (35 mg, 0,045 mmol) en metanol (5 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 4,5 horas. La reacción se interrumpió con tampón fosfato (pH 6,5) y se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y los disolventes se retiraron a presión reducida para dar un sólido blanco. El sólido se disolvió en diclorometano/MeOH (2:1) y se evaporó de nuevo. Se añadió diclorometano y se evaporó. El residuo se puso a alto vacío y se purificó mediante una columna C18 de fase inversa {CH_3CN/H_2O, el sólido se disolvió en CH_3CN/H_2O (3:1, 2 ml) y se agitó durante 30 minutos antes de cargarse sobre la columna} para formar 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (10,5 mg, r = 32%) en forma de un sólido blanco (método H).

MS (ESI): m/z = 758,2 MNa^+
m/z = 776,2 $MNa^+ + H_2O$
m/z = 794,3 $MNa^+ + 2H_2O$

Puede prepararse 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:

261



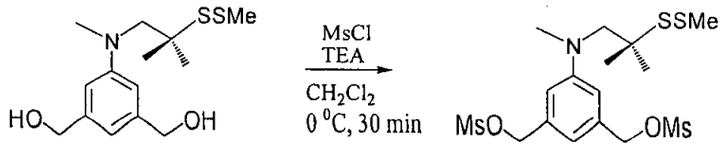
A una solución de 5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(mesiloximetil)-benceno (105 mg, 0,23 mmol) en DMF anhidra (2,5 ml) se le añadieron 8-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona (119 mg, 0,46 mmol), carbonato potásico en polvo (127 mg, 0,92 mmol), yoduro potásico en polvo (20 mg, 0,12 mmol) y yoduro de tetrabutilamonio (17 mg, 0,046 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar la mezcla durante 1,5 horas, se añadió la segunda porción de 8-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona (23 mg, 0,089 mmol). La solución se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 4,5 horas. Después, la reacción se interrumpió con agua y se diluyó con diclorometano. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. La solución se filtró, el filtrado se evaporó a presión reducida y después se sometió a alto vacío para retirar la DMF residual. El residuo se suspendió en CH_3CN/H_2O (10:1) y se filtró. El filtrado se evaporó y el producto bruto se purificó mediante una columna C18 de fase inversa (CH_3CN/H_2O) para formar 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)-amino-1,3-bencenodiil(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (39 mg) en forma de un sólido blanco (método H).

MS (ESI): m/z = 804,2 MNa^+
m/z = 822,2 $MNa^+ + H_2O$
m/z = 840,2 $MNa^+ + 2H_2O$

^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$-d1, en δ ppm): 7,64 (s a, 2H), 7,50 (s, 2H), 6,83-6,76 (m, 5H), 5,18-5,10 (m, 8H), 4,27 (s, 4H), 3,95 (s, 6H), 3,90-3,84 (m, 3H), 3,51 (s, 2H), 3,13-3,07 (m, 2H), 3,01 (s, 3H), 2,94-2,90 (m, 2H), 2,41 (s, 3H), 1,30 (s, 6H)

Puede prepararse 5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-

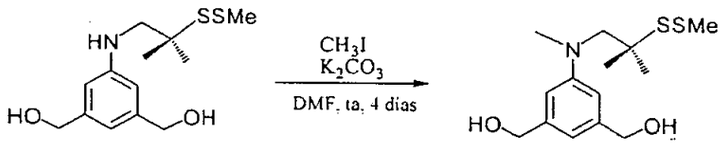
(mesiloximetil)-benceno como se indica a continuación:



A una solución de 5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno (135 mg, 0,45 mmol) en diclorometano anhidro (3 ml) se le añadió gota a gota trietilamina (153 µl, 1,1 mmol) seguido de cloruro de metanosulfonilo (87 µl, 1,1 mmol) durante 10 minutos a -2°C. La solución se agitó a 0°C durante 30 minutos más y después se inactivó con hielo/agua. La mezcla se extrajo con diclorometano frío y las capas de diclorometano combinadas se lavaron con agua fría y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después, se filtró y el filtrado se evaporó por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se purificó mediante una placa de TLC preparativa (hexanos/acetato de etilo, 1:1,5) para formar 5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(mesiloximetil)-benceno en forma de un aceite incoloro (105 mg)

MS (ESI): m/z = 480,0 MNa^+

Puede prepararse 5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno como se indica a continuación:



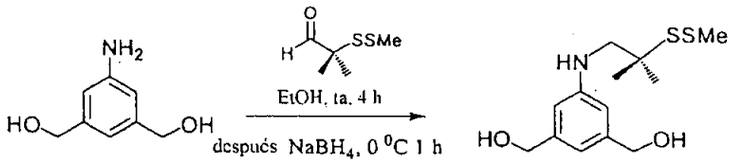
A una solución de 5-(N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno (226 mg, 0,78 mmol) en DMF (4 ml) se le añadió yodometano (149 µl, 2,4 mmol) seguido de carbonato potásico en polvo (108 mg, 0,78 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 días, la mezcla se inactivó con cloruro de amonio saturado y después se diluyó con diclorometano. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. La solución se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexanos/acetato de etilo, 1:2) para formar 5-(N-metil-

N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno en forma de una espuma incolora (152 mg)

MS (ESI): m/z = 324,1 MNa^+

^1H RMN (400 Hz, $CDCl_3$-d1, en δ ppm): 6,70 (s, 2H), 6,66 (s, 1H), 4,06 (s, 4H), 3,54 (s, 2H), 3,04 (s, 3H), 2,46 (s, 3H), 1,37 (s, 6H)

Puede prepararse 5-(N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno como se indica a continuación:

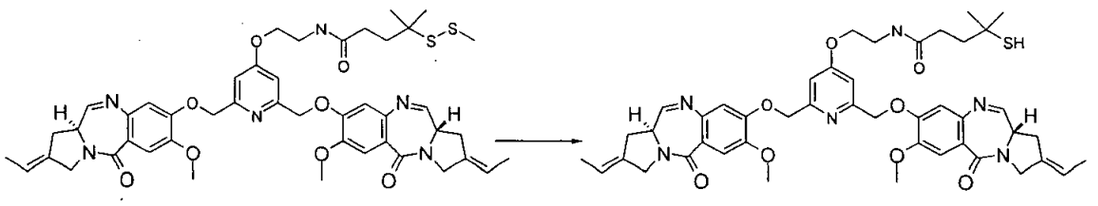


A una solución de 5-amino-1,3-bis-hidroxilmetil-benceno (765 mg, 5 mmol) en etanol absoluto (25 ml) se le añadió 2-(metilditio)-isobutiraldehído (751 mg, 5 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 horas, la solución se enfrió a 0°C con un baño de hielo/agua y se añadió borohidruro sódico (220 mg, 5,8 mmol). La mezcla se mantuvo en agitación a 0°C durante una hora y después se inactivó con ácido clorhídrico frío al 5% y se diluyó con diclorometano. Se añadió bicarbonato sódico saturado para hacer la solución ligeramente básica. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. La solución se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (CH_2Cl_2/MeOH, 15:1, 10:1) para formar 5-(N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno en forma de un aceite incoloro (832 mg)

MS (ESI): m/z = 310,0 MNa^+

Ejemplo 18:

Puede prepararse 8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:



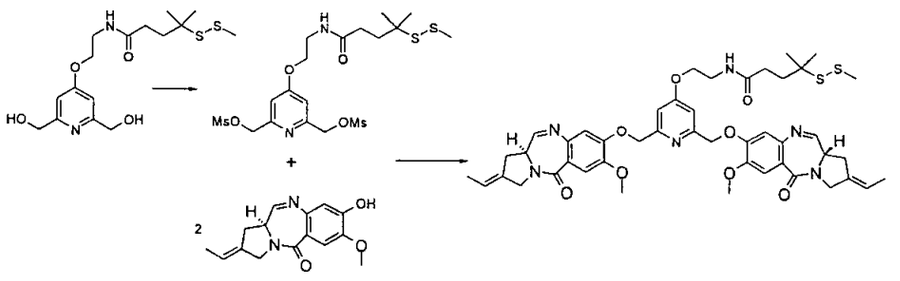
A una solución de 8,8'-[(4-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (60 mg) en metanol (1,6 ml) se le añadieron DMF (0,2 ml) y una solución de hidrocloruro de tris(2-carboxietil)fosfina (48 mg) en agua (0,2 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 18 h a temperatura ambiente y el disolvente se retiró al vacío para dar un residuo que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioFlash de 10 g, Si60 15-40 µm), usando un gradiente de elución con una mezcla 9:1 de metanol (A)/diclorometano/acetonitrilo (B), (gradiente: 100% de B disminuyendo hasta 10% de A:90% de B) para dar 8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (17 mg):

LC/MS (Método A1, ZQ): ES: m/z = 855 $MH^+ + H_2O$

m/z = 837 MH^+

Tiempo de retención = 3,70 minutos

Puede prepararse 8,8'-[(4-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:



A una solución enfriada (0ºC) de 4-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (360 mg) y trietilamina (810 µl) en diclorometano (4 ml) se le añadió una solución de cloruro de metanosulfonilo (298 µl) en diclorometano

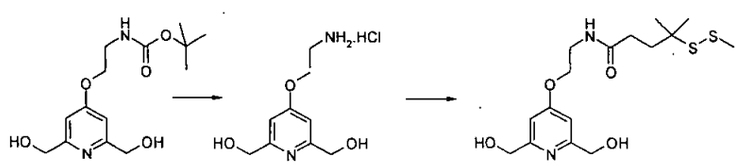
(4 ml). Después de 2 horas, se añadió agua. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo dos veces con diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Interchrom Puriflash de 20 g, SiOH 15-35 μm), usando un gradiente de elución con una mezcla de metanol (A)/diclorometano (B), (gradiente: 100% de B disminuyendo hasta 3% de A:97% de B) para dar 280 mg del compuesto mesilato.

A una solución de pre-tomaimicina (120 mg) en dimetilformamida (4 ml) se le añadieron carbonato potásico (244 mg), yoduro potásico (147 mg) y una muestra del compuesto mesilato (137 mg). La mezcla de reacción se agitó durante 20 h a 30ºC. Se añadió agua (20 ml) y el sólido resultante se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Interchrom Puriflash de 20 g, SiOH 15-35 μm), usando un gradiente de elución con una mezcla de metanol (A)/diclorometano (B), (gradiente: 100% de B disminuyendo hasta 6% de A:94% de B) para dar el compuesto bruto, que se disolvió en 1:1 de agua/acetonitrilo y después se concentró al vacío para dar 8,8'-[(4-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (120 mg):

LC/MS (Método A1, ZQ): ES: m/z = 919 $MH^+ + 2\ H_2O$
m/z = 901 $MH^+ + H_2O$
m/z = 883 MH^+
Tiempo de retención = 3,82 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm): δ = 1,28 (s, 6H); 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H); 1,94 (m, 2H); 2,29 (m, 2H); 2,39 (s, 3H); 2,97 (m, 4H); de 3,50 a 4,20 (m, 6H); 4,00 (s, 6H); 4,27 (s, 4H); 5,27 (m, 4H); 5,61 (m, 2H); 5,87 (t ancho, J = 5,5 Hz, 1H); 6,83 (s, 2H); 6,97 (s, 2H); 7,55 (s, 2H); 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

Puede prepararse 4-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina como se indica a continuación:



A una solución de 4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina

(656 mg) en dioxano (3,5 ml) se le añadió una solución de ácido clorhídrico 4 N en dioxano (5,5 ml). Después de 20 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró al vacío para dar un residuo (603 mg).

A una solución de una muestra del residuo anterior (150 mg) en dimetilformamida (3,5 ml) se le añadieron trietilamina (267 µl), ácido 4-metil-4-metildisulfanil-pentanoico (149 mg), N,N'-diisopropilcarbodiimida (119 µl) y 1-hidroxibenzotriazol hidrato (49 mg). Después de 15 h a temperatura ambiente, a la mezcla de reacción se le añadió agua y la solución acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro sódico, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Interchrom Puriflash de 20 g, SiOH 15-35 µm), usando un gradiente de elución con una mezcla de metanol (A)/diclorometano (B), (gradiente: 100% de B disminuyendo hasta 10% de A:90% de B) para dar 4-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (81 mg):

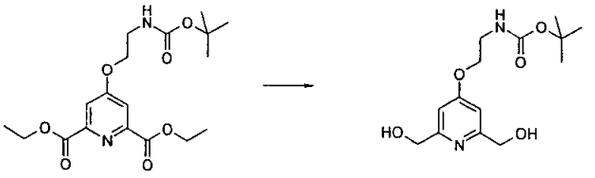
LC/MS (Método A3): ES m/z = 375 MH^+

m/z = 156 $C_7H_{10}NO_3^+$

Tiempo de retención = 2,2 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,22 (s, 6H); 1,79 (m, 2H); 2,19 (m, 2H); 2,39 (s, 3H); 3,43 (c, J = 5,5 Hz, 2H); 4,06 (t, J = 5,5 Hz, 2H); 4,45 (d ancho, J = 6,0 Hz, 4H); 5,33 (d, J = 6,0 Hz, 2H); 6,84 (s, 2H); 8,13 (t ancho, J = 5,5 Hz, 1H).

4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



Puede prepararse 4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina siguiendo el procedimiento para la preparación de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)piridina, partiendo de éster dietílico del ácido 4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico:

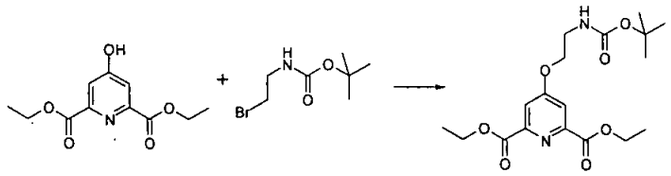
LC/MS (Método A3): ES m/z = 299 MH^+

m/z = 156 $C_7H_{10}NO_3^+$

Tiempo de retención = 1,7 minutos

^{1}H R.M.N. (300 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,39 (s, 9H); 3,32 (m parcialmente enmascarado, 2H); 4,03 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 4,46 (d, J = 6,0 Hz, 4H); 5,30 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 6,83 (s, 2H); 7,00 (t ancho, J = 6,0 Hz, 1H).

Éster dietílico del ácido 4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico



Puede prepararse Éster dietílico del ácido 4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster dietílico del ácido 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico, usando bromuro de 2-terc-butoxicarbonilamino-etilo:

LC/MS (Método A3): ES m/z = 383 MH^+

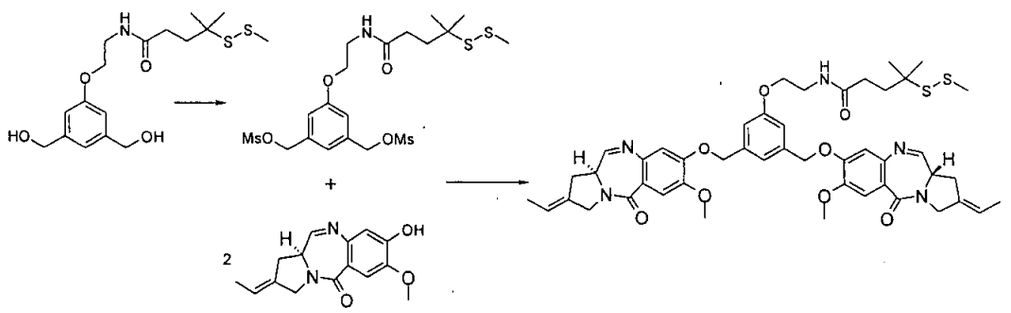
m/z = 240 $C_{11}H_{14}NO_5^+$

Tiempo de retención = 3,6 minutos

^{1}H R.M.N. (300 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,23 (t, J = 7,0 Hz, 6H); 1,37 (s, 9H); 3,33 (m parcialmente enmascarado, 2H); 4,22 (t, J = 5,5 Hz, 2H); 4,38 (c, J = 7,0 Hz, 4H); 7,01 (t ancho, J = 5,5 Hz, 1H); 7,71 (s, 2H).

Ejemplo 19:

8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



Puede prepararse 8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-

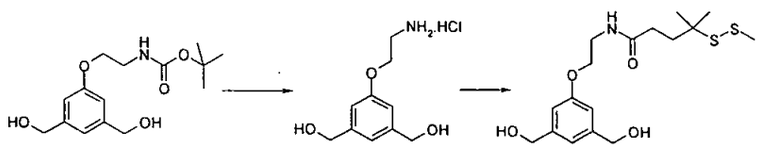
c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[(4-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-ona], partiendo de 1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno:

LC/MS (Método A1, Plataforma I): ES: m/z = 882 MH^+

Tiempo de retención = 4,13 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm): 1,30 (s, 6H); 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H); 1,96 (m, 2H); 2,31 (m, 2H); 2,40 (s, 3H); 2,97 (m, 4H); 3,66 (m, 2H); 3,89 (m, 2H); 3,97 (s, 6H); 4,04 (t, J = 5,5 Hz, 2H); 4,27 (s ancho, 4H); 5,14 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,19 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,61 (m, 2H); 5,93 (t, J = 6,0 Hz, 1H); 6,82 (s, 2H); 6,94 (s ancho, 2H); 7,09 (s ancho, 1H); 7,53 (s, 2H); 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

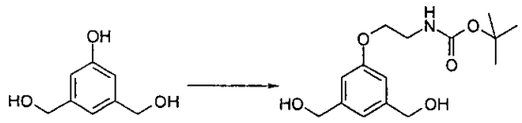
1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno



Puede prepararse 1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno siguiendo el procedimiento para la preparación de 4-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina, usando 1-(2- terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno:

^{1}H R.M.N. (400 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm): δ = 1,22 (s, 6H); 1,80 (m, 2H); 2,20 (m, 2H); 2,39 (s, 3H); 3,40 (c, J = 6,0 Hz, 2H); 3,95 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 4,44 (d, J = 6,0 Hz, 4H); 5,11 (t ancho, J = 6,0 Hz, 2H); 6,73 (s ancho, 2H); 6,84 (s ancho, 1H); 8,09 (t ancho, 1H).

1-(2- terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno



Puede prepararse 1-(2- terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno siguiendo el procedimiento para la preparación de 5-(3-ftalimido-propoxi)-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno, usando bromuro de 2-terc-butoxicarbonilamino-etilo:

LC/MS (Método A3): ES m/z = 298 MH^+

m/z = 242 $(M + 2H - tBu)^+$

m/z = 224 $(m/z = 242 - H_2O)^+$

m/z = 206 $(m/z = 224 - H_2O)^+$

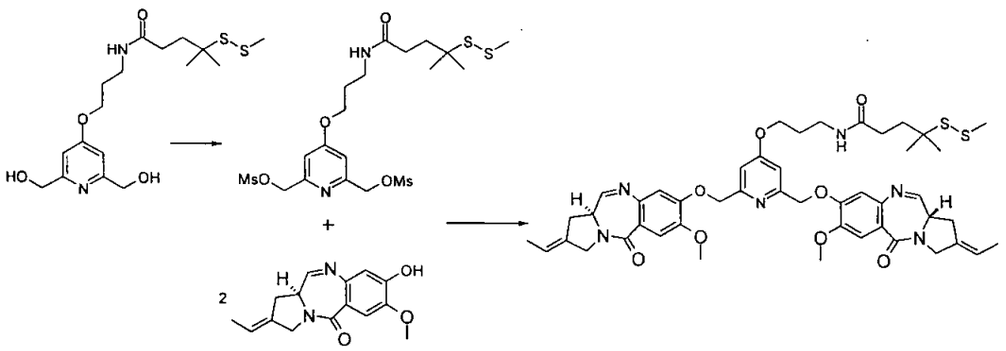
m/z = 162 $(m/z = 206 - CO_2)^+$

Tiempo de retención = 2,7 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,39 (s, 9H); 3,28 (c, J = 6,0 Hz, 2H); 3,91 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 4,44 (d, J = 6,0 Hz, 4H); 5,14 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 6,72 (s ancho, 2H); 6,83 (s ancho, 1H); 7,01 (t ancho, J = 7,0 Hz, 1H).

Ejemplo 20:

Puede prepararse 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:



A una solución enfriada (0°C) de 4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (55 mg) y trietilamina (99 µl) en diclorometano (2 ml) se le añadió cloruro de metanosulfonilo (36 µl). Después de 30 minutos, se añadió agua. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo dos veces con diclorometano. Las soluciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo (95 mg).

A una solución agitada de pre-tomaimicina (50 mg) en dimetilformamida (0,75 ml) se le añadieron carbonato potásico (114 mg), una solución del residuo anterior (55 mg) en dimetilformamida (1 ml) y yoduro potásico (46 mg). La reacción se agitó durante 20 h a 30°C. Los sólidos se retiraron por filtración y se lavaron con dimetilformamida. A la segunda solución de dimetilformamida se le añadió agua y se añadió ácido fórmico hasta que se produjo la completa disolución del precipitado.

La solución resultante se inyectó para purificación por HPLC de acuerdo con el método B. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron por evaporación centrífuga sobre un aparato Jouan Model RC10.10 para producir 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (13,5 mg).

LC/MS (Método A3): ES m/z = 897 MH^+

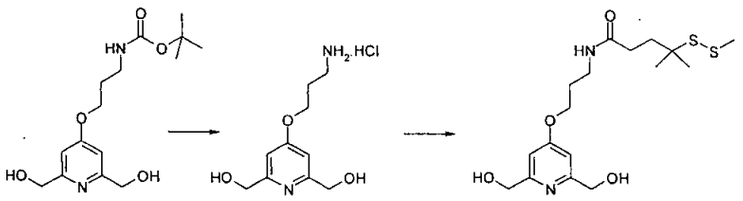
m/z = 664 $(M - C_{10}H_{20}NOS_2 + 2H)^+$

m/z = 234 $C_{10}H_{20}NOS_2^+$

Tiempo de retención = 3,7 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CD3COOD-d4, δ en ppm): δ = 1,25 (s, 6H); de 1,60 a 2,20 (m parcialmente enmascarado, 10H); 2,35 (m, 5H); de 2,80 a 4,44 (m, 14H); 3,91 (s, 6H); 5,40 (s, 4H); 5,62 (m, 2H); de 6,83 a 7,95 (m, 8H).

4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



Puede prepararse 4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina siguiendo el procedimiento para la preparación de 4-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina, usando 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

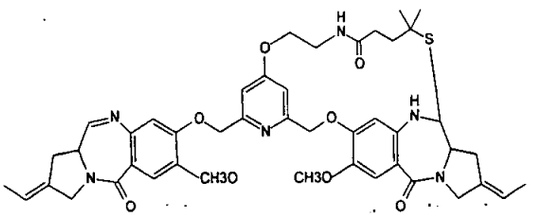
LC/MS (Método A3): ES m/z = 389 MH^+

m/z = 234 $(M - C_7H_8NO_3)^+$

m/z = 156 $C_7H_{10}NO_3^+$

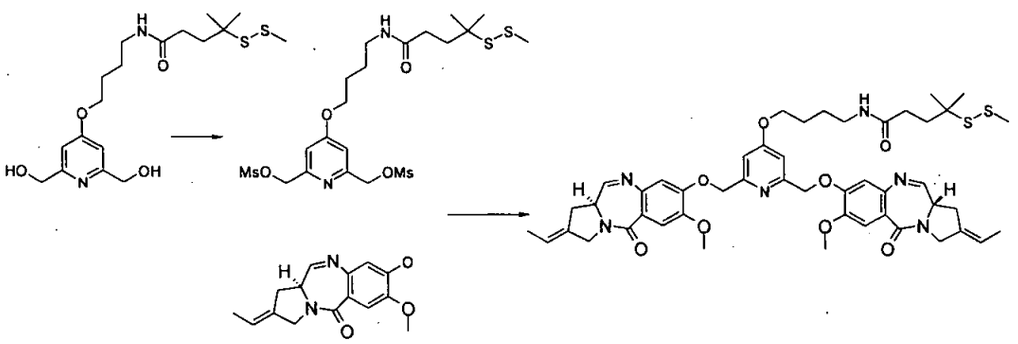
Tiempo de retención = 2,3 minutos

El derivado de tiol (SH) obtenido a partir del compuesto del ejemplo 20 está en equilibrio con el compuesto de fórmula:



Ejemplo 21:

8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-butoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



Puede prepararse 8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-butoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], usando 4-(4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-butoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

LC/MS (Método A1, Plataforma II): ES: m/z = 947 $MH^+ + 2\ H_2O$

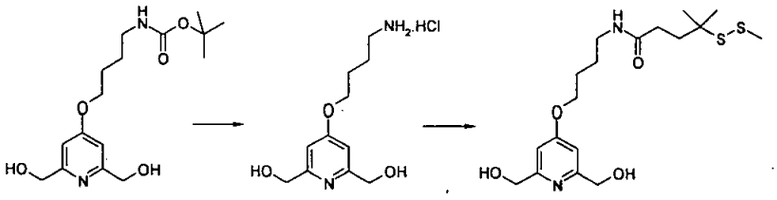
m/z = 929 $MH^+ + H_2O$

m/z = 911 MH^+

Tiempo de retención = 3,74 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CD3COOD-d4, δ en ppm): δ = 1,26 (s, 6H); de 1,59 a 1,76 (m, 8H); de 1,81 a 1,94 (m, 4H); 2,35 (m, 5H); de 2,80 a 4,40 (m, 14H); 3,92 (s, 6H); 5,39 (m, 4H); 5,50 (m, 2H); de 6,72 a 7,95 (m, 8H).

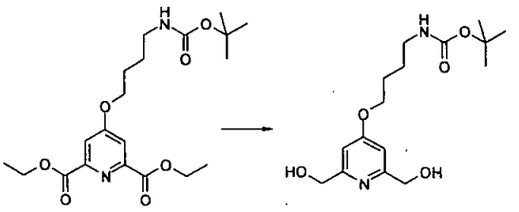
4-(4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-butoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



Puede prepararse 4-(4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-butoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina siguiendo el procedimiento para la preparación de 4-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina, usando 4-(4-terc-Butoxicarbonilamino-butoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

LC/MS (Método A3): ES m/z = 403 MH^+
m/z = 248 $(M - C_7H_8NO_3)^+$
m/z = 156 $C_7H_{10}NO_3^+$
Tiempo de retención = 2,3 minutos

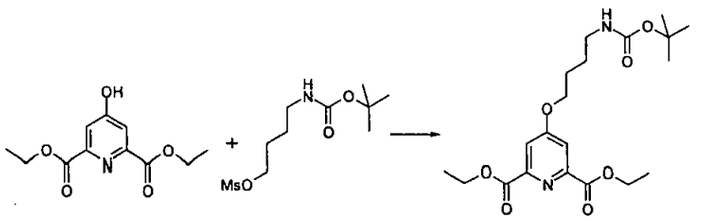
4-(4-terc-Butoxicarbonilamino-butoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



Puede prepararse 4-(4-terc-butoxicarbonilamino-butoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina siguiendo el procedimiento para la preparación de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)piridina, partiendo de éster dietílico del ácido 4-(4-terc-butoxicarbonilamino-butoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico:

LC/MS (Método A3): ES m/z = 411 MH^+
m/z = 355 $(M + 2H - tBu)^+$
m/z = 240 $C_{11}H_{14}NO_5^+$
Tiempo de retención = 3,9 minutos

Éster dietílico del ácido 4-(4-terc-butoxicarbonilamino-butoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico



Puede prepararse éster dietílico del ácido 4-(4-terc-butoxicarbonilamino-butoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster dietílico del ácido 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico, usando 4-terc-butoxicarbonilamino-butil éster del ácido metanosulfónico (Cazenave Gassiot, A.; Charton, J.; Girault-Mizzi, S.; Gilleron, P.; Debreu-Fontaine, M-A.; Sergheraert, C.; Melnyk, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15(21)*, 4828):

LC/MS (Método A3): ES m/z = 327 MH^+

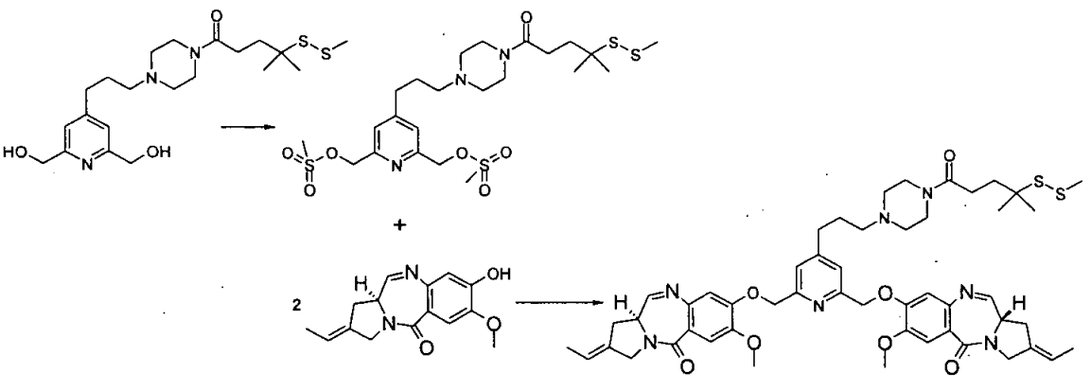
m/z = 271 $(M + 2H - tBu)^+$

m/z = 156 $C_7H_{10}NO_3^+$

Tiempo de retención = 2,0 minutos

Ejemplo 22:

8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

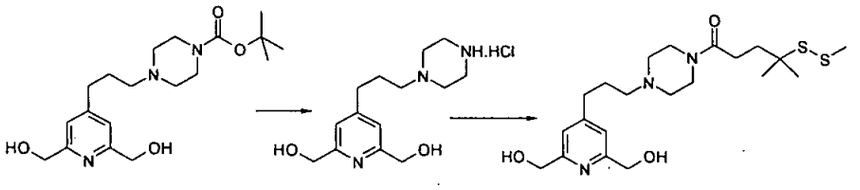


Puede prepararse 8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], usando 4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

LC/MS (Método A1, Plataforma II): ES: m/z = 950 MH^+
Tiempo de retención = 3,32 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3, δ en ppm): δ = 1,32 (s, 6H); 1,76 (d, J = 6,5 Hz, 6H); 1,80 (m, 2H); 1,94 (m, 2H); de 2,27 a 2,46 (m, 11H); 2,67 (m, 2H); 2,97 (m, 4H); de 3,40 a 3,70 (m, 4H); 3,90 (m, 2H); 4,00 (s, 6H); 4,27 (s ancho, 4H); 5,29 (s ancho, 4H); 5,60 (c ancho, J = 6,5 Hz, 2H); 6,86 (s, 2H); 7,30 (s, 2H); 7,56 (s, 2H); 7,65 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

Puede prepararse 4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina como se indica a continuación:



A una solución de 4-(3-(4-terc-Butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (610 mg) en dioxano (10 ml) se le añadió una solución de ácido clorhídrico 4 N en dioxano (2,5 ml). Después de 4 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró al vacío para dar un residuo (560 mg).

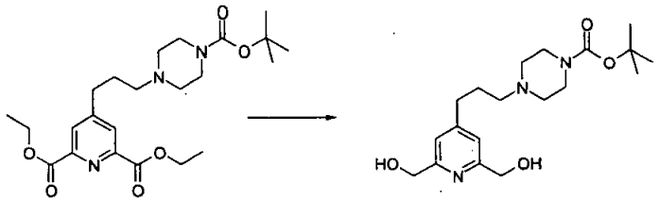
A una solución de una muestra del residuo anterior (160 mg) en dimetilformamida (2,5 ml) se le añadieron N,N-diisopropiletilamina (181 µl), ácido 4-metil-4-metildisulfanil-pentanoico (158 mg), N,N'-diisopropil-carbodiimida (88 µl) y 1-hidroxibenzotriazol hidrato (15 mg). Después de 15 h a temperatura ambiente, los sólidos se retiraron por filtración y la solución de dimetilformamida se inyectó para purificación por HPLC de acuerdo con el método F. Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron por liofilización para producir 4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (105 mg):

LC/MS (Método A3): ES m/z = 442 MH^+
m/z = 266 $(M + 2H - C_7H_{13}OS_2)^+$
Tiempo de retención = 2,3 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,27 (s, 6H); de 1,70 a 1,83 (m, 4H); de 2,25 a 2,39 (m, 8H); 2,40 (s, 3H); 2,63 (m, 2H); 3,43 (m, 4H); 4,49 (s, 4H); 5,28

(m ancho, 2H); 7,18 (s, 2H).

4-(3-(4-terc-Butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina

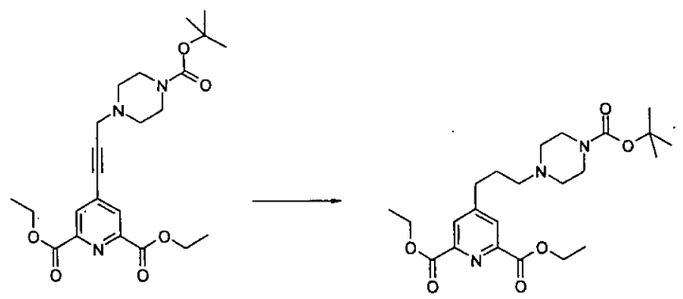


Puede prepararse 4-(3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina siguiendo el procedimiento para la preparación de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)piridina, partiendo de éster dietílico del ácido 4-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil]-piridina-2,6-dicarboxílico:

LC/MS (Método A3): ES m/z = 366 MH^+
m/z = 310 $(M + 2H - tBu)^+$
m/z = 266 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$
Tiempo de retención = 0,5 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,39 (s, 9H); 1,73 (m, 2H); 2,29 (m, 6H); 2,61 (m, 2H); 3,30 (m parcialmente enmascarado, 4H); 4,49 (d, J = 6,0 Hz, 4H); 5,30 (t ancho, J = 6,0 Hz, 2H); 7,18 (s, 2H).

Éster dietílico del ácido 4-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil]-piridina-2,6-dicarboxílico



Puede prepararse éster dietílico del ácido 4-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil]-piridina-2,6-dicarboxílico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster dietílico del ácido 5-(3-terc-butoxicarbonil-N-metil-amino-propil)-benceno-1,3-

dicarboxílico, partiendo de éster dietílico del ácido 4-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-prop-1-inil]-piridina-2,6-dicarboxílico:

LC/MS (Método A3): ES m/z = 450 MH^+

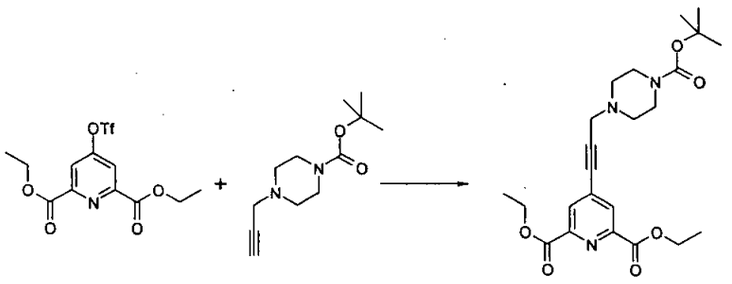
m/z = 394 $(M + 2H - tBu)^+$

m/z = 350 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$

Tiempo de retención = 2,4 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,35 (t, J = 7,0 Hz, 6H); 1,39 (s, 9H); 1,79 (m, 2H); 2,27 (m, 6H); 2,80 (m, 2H); 3,29 (m, 4H); 4,39 (c, J = 7,0 Hz, 4H); 8,12 (s, 2H).

Éster dietílico del ácido 4-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-prop-1-inil]-piridina-2,6-dicarboxílico



Puede prepararse éster dietílico del ácido 4-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-prop-1-inil]-piridina-2,6-dicarboxílico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster dietílico del ácido 5-(3-terc-butoxicarbonil-N-metil-amino-propin-1-il)-benceno-1,3-dicarboxílico, partiendo de éster dietílico del ácido 4-trifluorometanosulfoniloxi-piridina-2,6-dicarboxílico y 4-propargil-piperazina-1-carboxilato de terc-butilo (Zheng, H.; Weiner, L.M.; Bar-Am, O.; Epsztejn, S.; Cabantchik, Z.I.; Warshawsky, A.; Youdim, M.B.H.; y Fridkin, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *3*, 773)

EI (Método C) m/z = 445 $M^{+\cdot}$

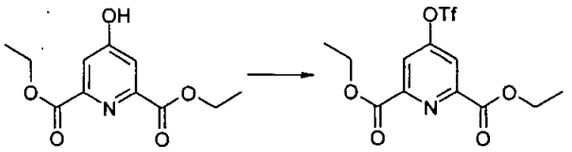
m/z = 388 $(M - C_4H_9)^+$

m/z = 344 $(m/z = 388 - CO_2)^+$

m/z = 57 $C_4H_9^+$

^{1}H R.M.N. (400 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm): δ = 1,46 (t, J = 7,0 Hz, 6H); 1,48 (s, 9H); 2,60 (m ancho, 4H); 3,52 (m ancho, 4H); 3,62 (s ancho, 2H); 4,49 (c, J = 7,0 Hz, 4H); 8,23 (s, 2H).

Puede preparase éster dietílico del ácido 4-trifluorometanosulfoniloxi-piridina-2,6-dicarboxílico como se indica a continuación:

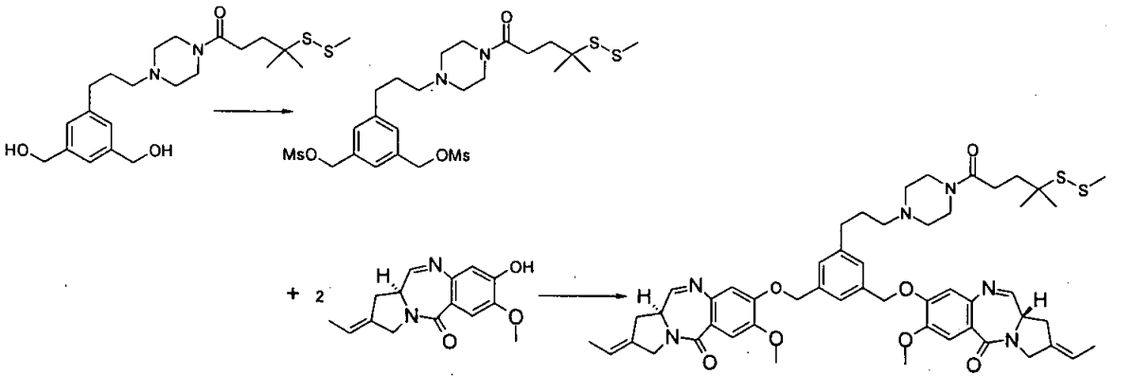


A una solución enfriada (0ºC) de éster dietílico del ácido quelidámico (Chaubet, F.; Nguyen van duong, M.; Gref, A.; Courtieu, J.; Crumbliss, A.L.; Gaudemer, A. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31(40)*, 5729-5732) (3,5 g) en piridina (35 ml) se le añadió gota a gota cloruro de trifluorometanosulfonilo (2,6 ml). Después, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadieron agua y acetato de etilo. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo dos veces acetato de etilo. Las soluciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioPrep de 90 g, Si60 15-40 µm), eluyendo con diclorometano para dar éster dietílico del ácido 4-trifluorometanosulfoniloxi-piridina-2,6-dicarboxílico (4,2 g).

LC/MS (Método A1, Plataforma I): ES m/z = 372 MH^+
Tiempo de retención = 4,38 minutos

Ejemplo 23:

8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



Puede prepararse 8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-

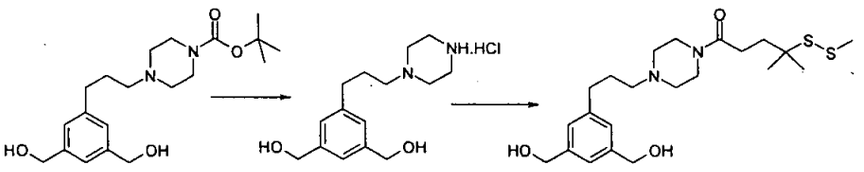
propil)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], usando 1-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno:

LC/MS (Método A3): ES m/z = 949 MH^+

m/z = 475,3 $(M + 2H)^{2+}$ /2

Tiempo de retención = 3,3 minutos

1-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno



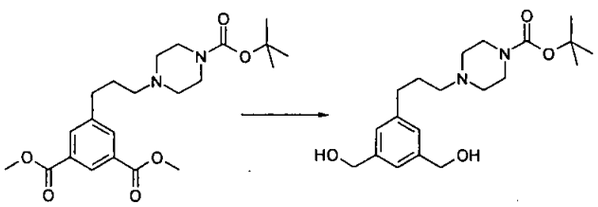
Puede prepararse 1-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno siguiendo el procedimiento para la preparación de 4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina, partiendo de 1-(3-(4-terc-Butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno:

LC/MS (Método A3): ES m/z = 441 MH^+

Tiempo de retención = 2,4 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,26 (s, 6H); 1,71 (m, 2H); 1,79 (m, 2H); de 2,22 a 2,40 (m, 8H); 2,39 (s, 3H); 2,58 (m, 2H); 3,44 (m, 4H); 4,45 (d, J = 6,0 Hz, 4H); 5,09 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 7,00 (s ancho, 2H); 7,08 (s ancho, 1H).

1-(3-(4-terc-Butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno



Puede prepararse 1-(3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil)-3,5-bis-

(hidroximetil)-benceno siguiendo el procedimiento para la preparación de 5-(3-terc-butoxicarbonil-N-metil-amino-propil)-1,3-bis-(hidroximetil)-benceno, partiendo de éster dimetílico del ácido 5-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil]-isoftálico:

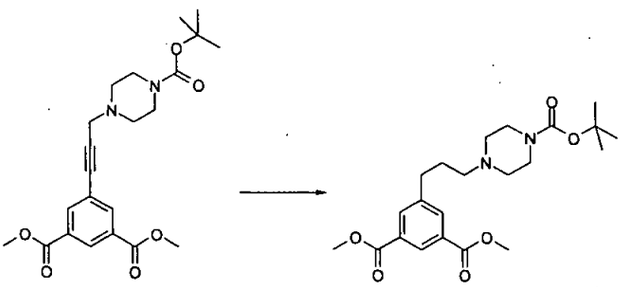
LC/MS (Método A3): ES m/z = 365 MH^+

m/z = 309 $(M + 2H - tBu)^+$

Tiempo de retención = 2,0 minutos

^{1}H R.M.N. (300 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,39 (s, 9H); 1,71 (m, 2H); 2,28 (m, 6H); 2,57 (m, 2H); 3,29 (m parcialmente enmascarado, 4H); 4,44 (d, J = 6,0 Hz, 4H); 5,08 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 7,00 (s ancho, 2H); 7,08 (s ancho, 1H).

Éster dimetílico del ácido 5-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil]-isoftálico



Puede prepararse éster dimetílico del ácido 5-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil]-isoftálico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster dietílico del ácido 5-(3-terc-butoxicarbonil-N-metil-amino-propil)-benceno-1,3-dicarboxílico, partiendo de éster dimetílico del ácido 5-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-prop-1-inil]-isoftálico:

LC/MS (Método A3): ES m/z = 421 MH^+

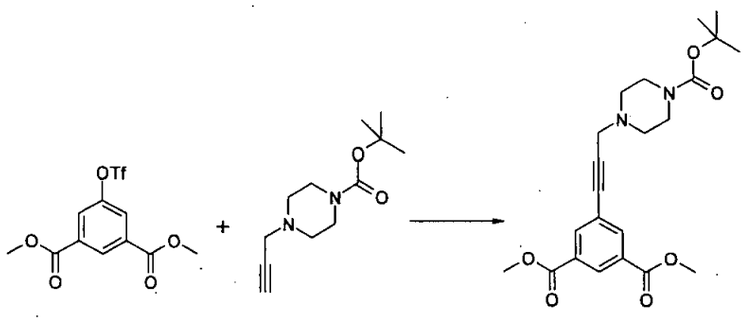
m/z = 365 $(M + 2H - tBu)^+$

m/z = 321 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$

Tiempo de retención = 2,7 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,39 (s, 9H); 1,74 (m, 2H); 2,28 (m, 6H); 2,75 (m, 2H); 3,30 (m parcialmente enmascarado, 4H); 3,89 (s, 6H); 8,08 (d, J = 2,0 Hz, 2H); 8,32 (t, J = 2,0 Hz, 1H).

Éster dimetílico del ácido 5-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-prop-1-inil]-isoftálico



Puede prepararse éster dimetílico del ácido 5-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-prop-1-inil]-isoftálico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster dietílico del ácido 5-(3-terc-butoxicarbonil-N-metil-amino-propin-1-il)-benceno-1,3-dicarboxílico, partiendo de 4-propargil-piperazina-1-carboxilato de terc-butilo:

LC/MS (Método A3): ES m/z = 417 MH^+

m/z = 361 $(M + 2H - tBu)^+$

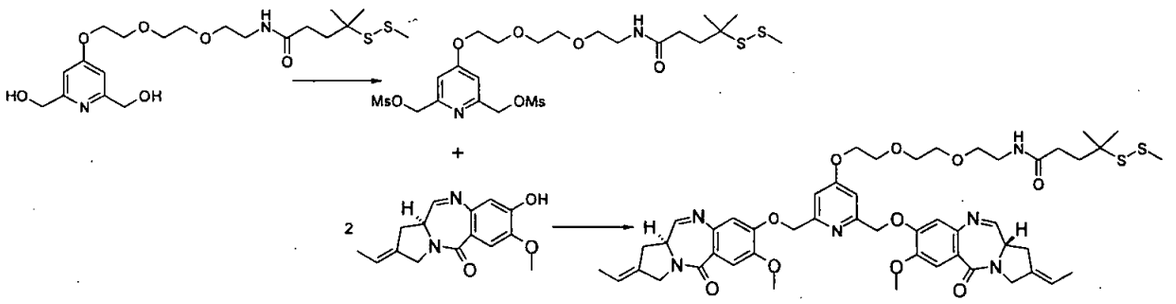
m/z = 317 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$

Tiempo de retención = 3,1 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,40 (s, 9H); 2,50 (m enmascarado, 4H); 3,35 (m, 4H); 3,61 (s, 2H); 3,90 (s, 6H); 8,14 (s ancho, 2H); 8,40 (s ancho, 1H).

Ejemplo 24:

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



Puede prepararse 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-

2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], usando 4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

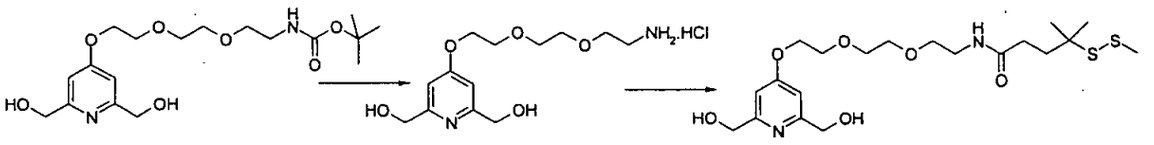
LC/MS (Método A3): ES m/z = 971 MH^+

m/z = 486,3 $(M + 2H)^{2+}$ /2

Tiempo de retención = 3,60 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm): δ = 1,28 (s, 6H); 1,76 (d, J = 6,5 Hz, 6H); 1,94 (m, 2H); 2,26 (m, 2H); 2,40 (s, 3H); 2,98 (m, 4H); de 3,36 a 3,95 (m, 12H); 4,00 (s, 6H); 4,18 (m, 2H); 4,28 (s ancho, 4H); 5,27 (m, 4H); 5,61 (m, 2H); 5,97 (m ancho, 1H); 6,84 (s, 2H); 7,01 (s ancho, 2H); 7,56 (s, 2H); 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



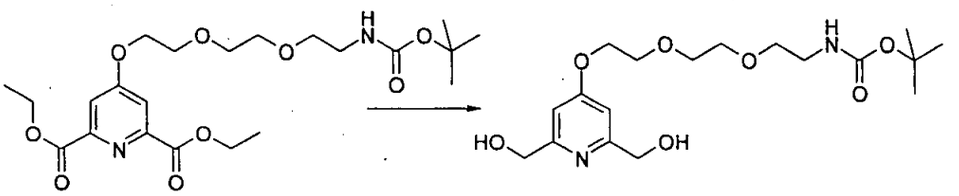
Puede prepararse 4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina siguiendo el procedimiento para la preparación de 4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina, partiendo de 4-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

LC/MS (Método A3): ES m/z = 463 MH^+

Tiempo de retención = 2,3 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,22 (s, 6H); 1,79 (m, 2H); 2,15 (m, 2H); 2,39 (s, 3H); 3,18 (c, J = 6,0 Hz, 2H); 3,40 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 3,52 (m, 2H); 3,60 (m, 2H); 3,76 (m, 2H); 4,18 (m, 2H); 4,45 (s, 4H); 5,32 (m ancho, 2H); 6,85 (s, 2H); 7,90 (t ancho, J = 6,0 Hz, 1H).

4-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



Puede prepararse 4-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina siguiendo el procedimiento para la preparación de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)piridina, partiendo de éster dietílico del ácido 4-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico:

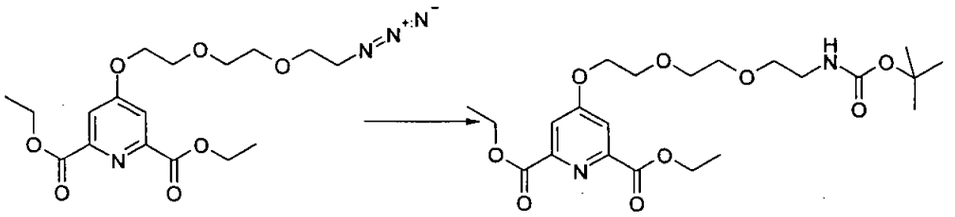
LC/MS (Método A3): ES m/z = 387 MH^+

m/z = 331 $(M + 2H - tBu)^+$

Tiempo de retención = 2,0 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,37 (s, 9H); 3,07 (c, J = 6,0 Hz, 2H); 3,39 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 3,51 (m, 2H); 3,59 (m, 2H); 3,73 (m, 2H); 4,18 (m, 2H); 4,45 (d, J = 6,0 Hz, 4H); 5,31 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 6,73 (t ancho, J = 6,0 Hz, 1H); 6,85 (s, 2H).

Puede prepararse éster dietílico del ácido 4-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico como se indica a continuación:



A una solución de éster dietílico del ácido 4-(2-{2-[2-azido-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico (Roy, B.C.; Santos, M.; Mallik, S.; D. Campiglia, A.D. *J. Org. Chem.* **2003**, *68(10)*, 3999) (900 mg) en acetato de etilo (18 ml) se le añadieron dicarbonato de di-terc-butilo (545 mg) y paladio al 10% sobre carbono (73 mg). La solución se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de hidrógeno (2 bar) durante 18 h. El sólido se retiró por filtración y el disolvente se retiró al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (Analogix Super Flash SiO_2 SF25-34 g), usando un gradiente de elución con una mezcla de diclorometano (A) y metanol (B) (gradiente: 100% de A disminuyendo hasta 97,5% de A:2,5% de B) para dar éster dietílico del ácido 4-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico (760 mg):

LC/MS (Método A3): ES m/z = 471 MH^+

m/z = 415 $(M + 2H - tBu)^+$

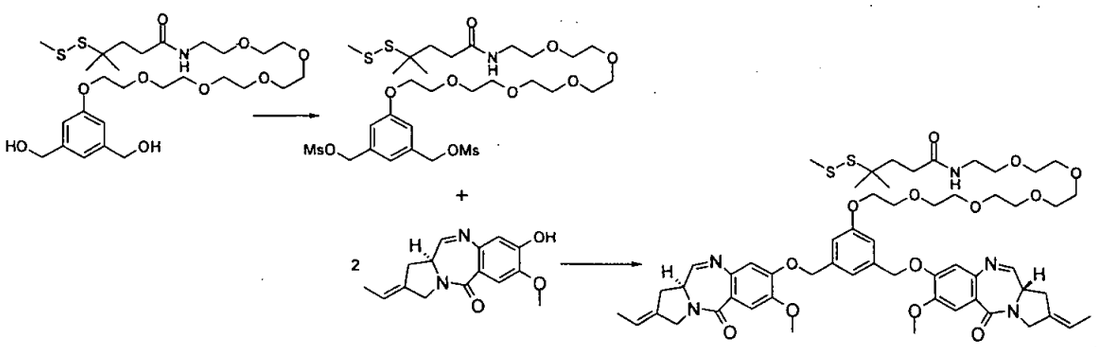
m/z = 371 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$

Tiempo de retención = 3,6 minutos

^{1}H R.M.N. (300 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,32 (t, J = 7,0 Hz, 6H); 1,36 (s, 9H); 3,04 (c, J = 6,0 Hz, 2H); 3,38 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 3,51 (m, 2H); 3,59 (m, 2H); 3,79 (m, 2H); 4,25 (m enmascarado, 2H); 4,29 (c, J = 7,0 Hz, 4H); 6,70 (t ancho, J = 6,0 Hz, 1H); 7,73 (s, 2H).

Ejemplo 25:

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



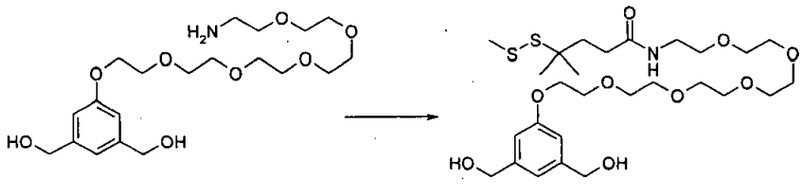
Puede prepararse 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], usando 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno:

LC/MS (Método A1, Plataforma II): ES: m/z = 1102 MH^+

Tiempo de retención = 4,49 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm): δ = 1,30 (s, 6H); 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H); 1,95 (m, 2H); 2,28 (m, 2H); 2,41 (s, 3H); 2,97 (m, 4H); de 3,33 a 3,96 (m, 24H); 3,96 (s, 6H); 4,12 (m, 2H); 4,27 (s ancho, 4H); de 5,07 a 5,24 (m, 4H); 5,60 (m, 2H); 6,21 (m ancho, 1H); 6,81 (s, 2H); 6,96 (s, 2H); 7,07 (s, 1H); 7,51 (s, 2H); 7,65 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno

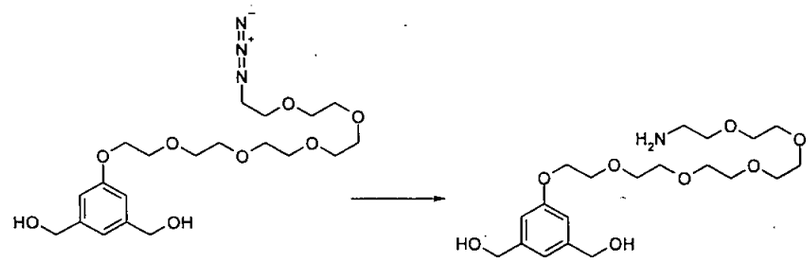


Puede prepararse 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno siguiendo el procedimiento para la preparación de 1-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno, partiendo de 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-amino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno:

LC/MS (Método G1): ES m/z = 594 MH^+

Tiempo de retención = 1,9 minutos.

Puede prepararse 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-amino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno como se indica a continuación:

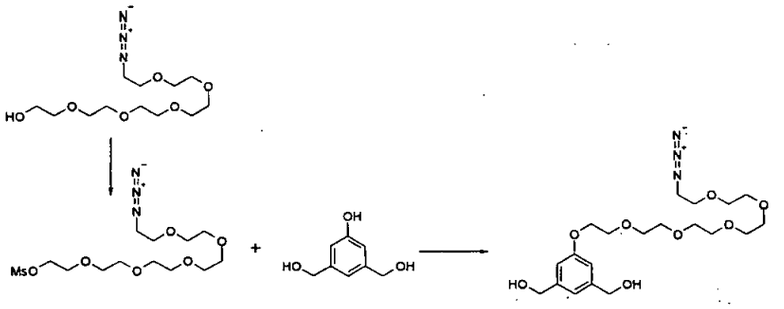


A una solución de 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azido-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (540 mg) en THF (5,5 ml) se le añadieron trifenilfosfina (320 mg) y agua (22 µl). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 18 h y el disolvente se retiró al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioFlash de 30 g, Si60 15-40 µm, eluyendo con 95:5 de diclorometano/metanol y después con 75:25:2,5 de diclorometano/metanol/NH_4OH para dar 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-amino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (430 mg):

LC/MS (Método A3): ES: m/z = 418 MH^+

Tiempo de retención = 1,3 y 1,7 minutos

Puede prepararse 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azido-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno como se indica a continuación:

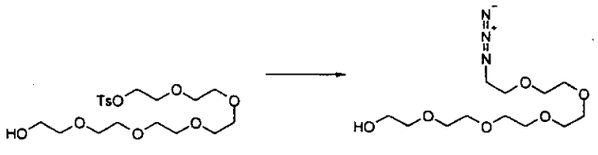


A una solución enfriada (0ºC) de 2-[2-(2-{2-[2-(2-Azido-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etanol (1,6 g) y trietilamina (1,45 ml) en diclorometano (40 ml) se le añadió cloruro de metanosulfonilo (617 µl). Después de 1 hora, se añadió agua. Las capas se separaron y la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró al vacío para dar un residuo (1,83 g).

Se mezclaron una muestra del residuo (1,4 g), 3,5-bis-hidroximetilfenol (510 mg) y carbonato potásico (686 mg) en dimetilformamida (8 ml) y la mezcla se calentó a 70ºC durante 15 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadió agua y la solución acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro sódico, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioPrep de 70 g, Si60 15-40 µm), eluyendo con una mezcla de metanol (A)/diclorometano (B), (gradiente: 2% de A:98% de B a 10% de A:90% de B) para dar 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azido-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (540 mg):

CI (Método D): m/z = 461 MNH_4^+

Puede prepararse 2-[2-(2-{2-[2-(2-azido-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etanol como se indica a continuación:



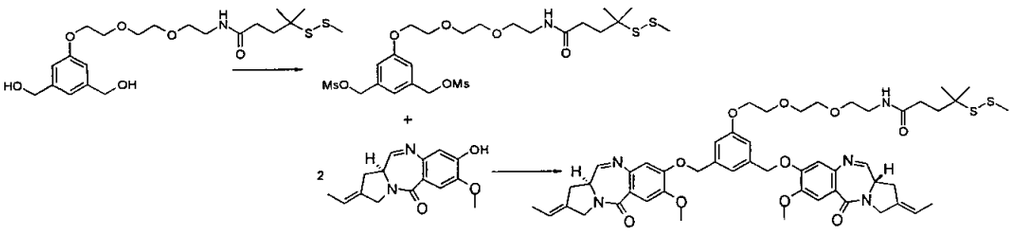
A una solución de 2-[2-(2-{2-[2-(2-tosiloxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etanol

(Loiseau, F. A.; Hii, K. K.; Hill, A. M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 639) (4,5 g) en dimetilformamida (30 ml) se le añadió azida sódica (0,89 g). La solución se agitó a 70°C durante 18 h y después el disolvente se retiró al vacío para dar un residuo. Se añadió diclorometano y el precipitado resultante se retiró por filtración. La capa orgánica se concentró al vacío para dar 2-[2-(2-{2-[2-(2-Azido-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etanol (3,1 g):

CI (Método D): m/z = 325 MNH_4^+

Ejemplo 26:

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



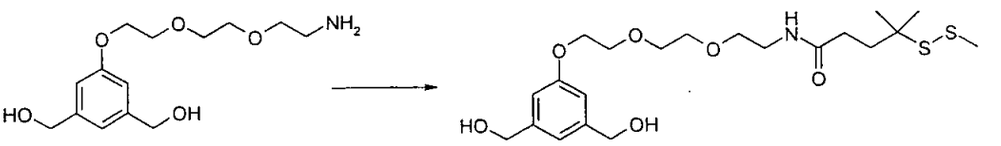
Puede prepararse 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], usando 1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno:

LC/MS (Método A1, Plataforma II): ES: m/z = 970 MH^+

Tiempo de retención = 3,89 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm): δ = 1,27 (s, 6H); 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H); 1,94 (m, 2H); 2,26 (m, 2H); 2,40 (s, 3H); 2,98 (m, 4H); de 3,35 a 3,92 (m, 12H); 3,96 (s, 6H); 4,15 (m, 2H); 4,28 (s ancho, 4H); de 5,10 a 5,23 (m, 4H); 5,60 (c ancho, J = 6,5 Hz, 2H); 6,05 (t ancho, J = 6,0 Hz, 1H); 6,81 (s, 2H); 6,98 (s, 2H); 7,09 (s, 1H); 7,53 (s, 2H); 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno



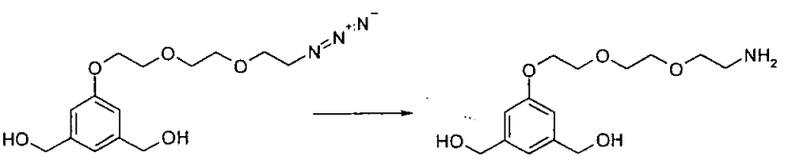
Puede prepararse 1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno siguiendo el procedimiento para la preparación de 1-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno, partiendo de 1-(2-{2-[2-amino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno:

LC/MS (Método A3): ES: m/z = 462 MH^+

m/z = 444 $(M + H - H_2O)^+$

Tiempo de retención = 3,0 minutos

1-(2-{2-[2-amino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno



Puede prepararse 1-(2-{2-[2-amino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno siguiendo el procedimiento para la preparación de 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-amino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno, partiendo de 1-(2-{2-[2-azido-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno:

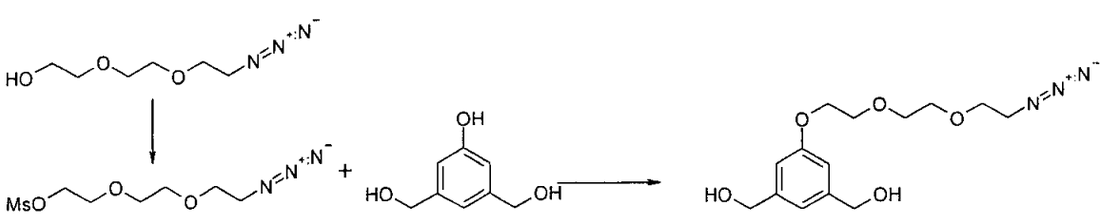
LC/MS (Método A3): ES: m/z = 286 MH^+

m/z = 268 $(M + H - H_2O)^+$

Tiempo de retención = 0,8 minutos

1-(2-{2-[2-azido-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno

Azido

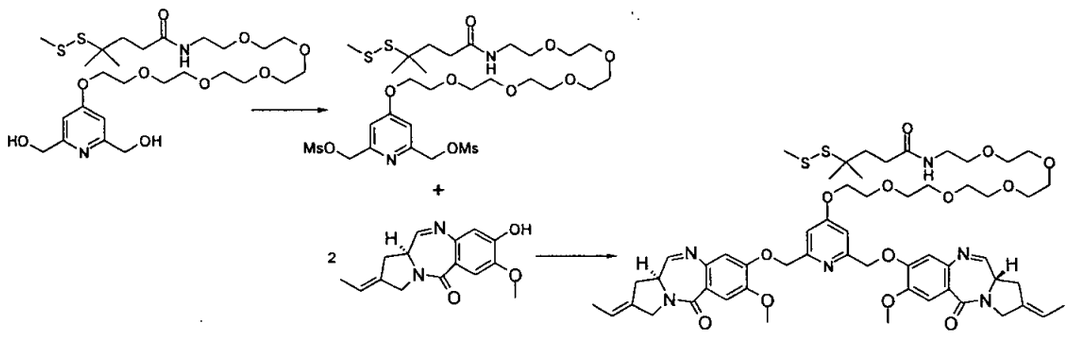


Puede prepararse 1-(2-{2-[2-azido-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno siguiendo el procedimiento para la preparación de 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azido-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno, partiendo de 2-[2-(2-Azido-etoxi)-etoxi]-etanol (Roy, B.C; Santos, M.; Mallik, S.; Campiglia, A.D. *J. Org. Chem.* **2003**, *68(10)*, 3999):

CI (Método D) m/z = 329 MNH_4^+.

Ejemplo 27:

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



Puede prepararse 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], usando 4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

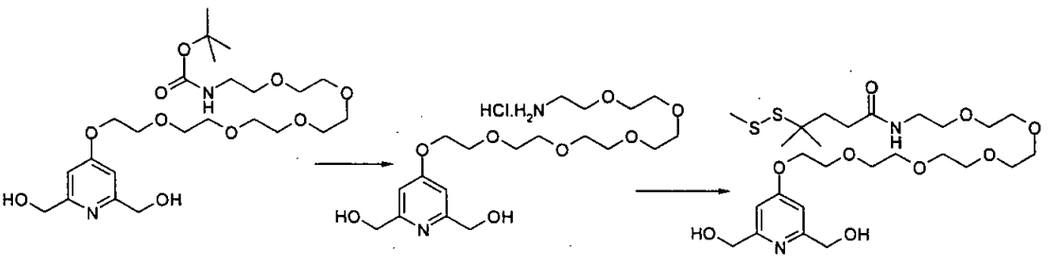
LC/MS (Método A3): ES: m/z = 1103 MH^+

m/z = 552 $(M + 2H)^{2+}$ /2

Tiempo de retención = 3,7 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm): δ = 1,29 (s, 6H); 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H); 1,94 (m, 2H); 2,28 (m, 2H); 2,40 (s, 3H); 2,97 (m, 4H); de 3,33 a 3,95 (m, 24H); 3,99 (s, 6H); 4,18 (m, 2H); 4,28 (s ancho, 4H); 5,27 (m, 4H); 5,60 (m, 2H); 6,19 (m ancho, 1H); 6,82 (s, 2H); 7,00 (s ancho, 2H); 7,55 (s, 2H); 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina

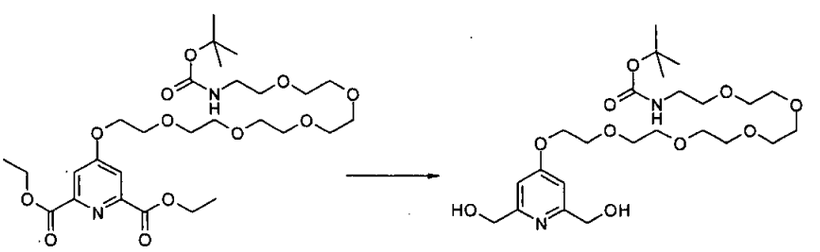


Puede prepararse 4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina siguiendo el procedimiento para la preparación de 4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina, partiendo de 4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

LC/MS (Método A3): ES: m/z = 596 MH^+

Tiempo de retención = 2,4 minutos

4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina

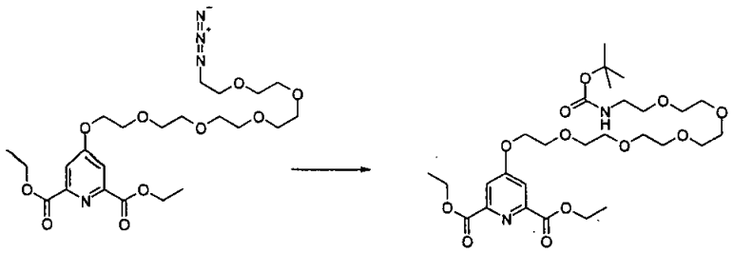


Puede prepararse 4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina siguiendo el procedimiento para la preparación de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)piridina, partiendo de éster dietílico del ácido 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-piridina-2,6-dicarboxílico:

LC/MS (Método A3): ES: m/z = 519 MH^+

Tiempo de retención = 2,2 minutos

Éster dietílico del ácido 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-piridina-2,6-dicarboxílico



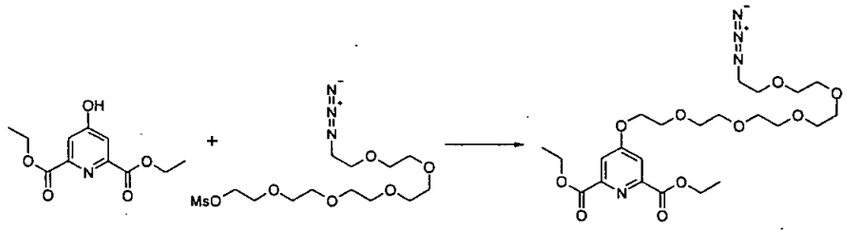
Puede prepararse éster dietílico del ácido 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-piridina-2,6-dicarboxílico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster dietílico del ácido 4-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridina-2,6-dicarboxílico, partiendo de éster dietílico del ácido 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-azido-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-piridina-2,6-dicarboxílico:

LC/MS (Método A3): ES: m/z = 603 MH^+

m/z = 271 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$

Tiempo de retención = 3,6 minutos

Puede prepararse éster dietílico del ácido 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-azido-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-piridina-2,6-dicarboxílico como se indica a continuación:



A una solución de éster dietílico del ácido quelidámico (1,03 g) en dimetilformamida (10 ml) se le añadieron 2-[2-(2-{2-[2-(2-azido-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etil éster del ácido metanosulfónico (1,82 g) y carbonato potásico (893 mg). La mezcla resultante se calentó a 70ºC durante 15 h y después se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió agua y la solución acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las soluciones orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro sódico, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioPrep de 70 g, Si60 15-40 µm), eluyendo con una mezcla de metanol (A)/diclorometano (B), (gradiente: 3% de A:97% de B a 5% de A:95% de B) para dar éster dietílico del ácido 4-{2-[2-(2-{2-[2-

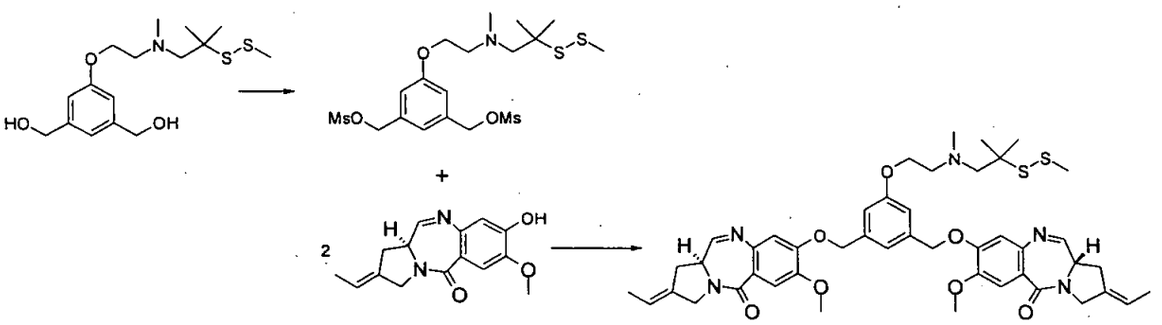
(2-azido-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-piridina-2,6-dicarboxílico (2,19 g):

LC/MS (Método A3): ES: m/z = 529 MH^+

Tiempo de retención = 3,4 minutos

Ejemplo 28:

8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



Puede prepararse 8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], usando 1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno:

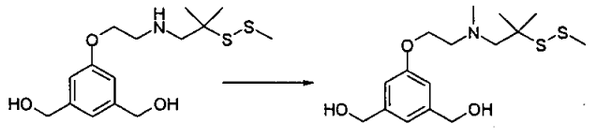
LC/MS (Método A1, Plataforma I): ES: m/z = 872 $MH^+ + H_2O$

m/z = 854 MH^+

Tiempo de retención = 3,40 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm): δ = 1,31 (s, 6H); 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H); 2,39 (s, 3H); 2,45 (s, 3H); 2,62 (s, 2H); 2,92 (t, J = 6,5 Hz, 2H); 2,97 (m, 4H); 3,89 (m, 2H); 3,96 (s, 6H); 4,06 (t, J = 6,5 Hz, 2H); 4,26 (s ancho, 4H); 5,12 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,19 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,60 (c ancho, J = 6,5 Hz, 2H); 6,82 (s, 2H); 6,95 (s ancho, 2H); 7,06 (s ancho, 1H); 7,52 (s, 2H); 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

Puede prepararse 1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno como se indica a continuación:



A una suspensión enfriada (5ºC) de 1-(2-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (280 mg) en formaldehído (228 µl) se le añadió ácido fórmico (319 µl). La mezcla resultante se calentó a 100ºC durante 1 h y 15 min y después se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron agua y hielo, seguido de una solución acuosa de hidróxido sódico hasta un valor de pH = 12. La solución acuosa resultante se extrajo tres veces con acetato de etilo y las soluciones orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron al vacío para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioFlash de 25 g, Si60 15-40 µm), eluyendo con una mezcla de metanol (A)/diclorometano (B), (gradiente: 2% de A:98% de B a 5% de A:95% de B) para dar 1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (210 mg):

LC/MS (Método A3): ES: m/z = 346 MH^+

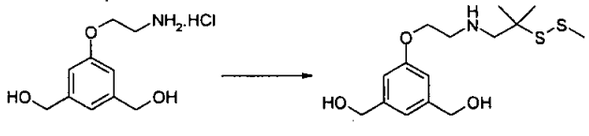
m/z = 212 $(M + 2H - C_5H_{11}S_2)^+$

m/z = 135 $C_5H_{11}S_2^+$

Tiempo de retención = 2,1 minutos

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,27 (s, 6H); 2,39 (s, 3H); 2,40 (s, 3H); 2,60 (s, 2H); 2,85 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 4,02 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 4,44 (d, J = 6,0 Hz, 4H); 5,10 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 6,72 (s ancho, 2H); 6,82 (s ancho, 1H).

Puede prepararse 1-(2-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno como se indica a continuación:



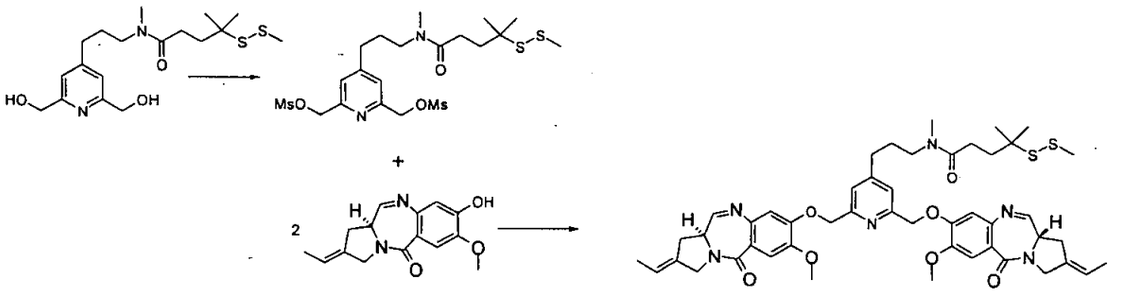
A una suspensión de hidrocloruro de 1-(2-amino-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (900 mg) en tetrahidrofurano (4,5 ml) se le añadió trietilamina (1,07 ml). Después de agitar durante 15 min, se añadieron 2-(metilditio)isobutiraldehído (530 ml) e isopropóxido de titanio (1,42 mg) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadieron etanol (9 ml) y cianoborohidruro sódico (242

mg) y la nueva mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Los sólidos se retiraron por filtración y el filtrado se concentró al vacío para dar un residuo. Después, el residuo se diluyó en acetato de etilo y los sólidos resultantes se retiraron por filtración. Después la solución orgánica se lavó con agua y con una solución acuosa saturada de cloruro sódico, se secó sobre magnesio y se concentró al vacío para dar un nuevo residuo que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (columna Merck SuperVarioFlash de 30 g, Si60 15-40 µm), eluyendo con una mezcla de metanol (A)/diclorometano (B), (gradiente: 4% de A:96% de B a 10% de A:90% de B) para dar 1-(2-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno (290 mg):

^{1}H R.M.N. (400 MHz, DMSO-d6, δ en ppm): δ = 1,27 (s, 6H); 1,82 (m ancho, 1H); 2,39 (s, 3H); 2,67 (s, 2H); 2,91 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 4,00 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 4,43 (d, J = 6,0 Hz, 4H); 5,10 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 6,73 (s ancho, 2H); 6,83 (s ancho, 1H).

Ejemplo 29:

8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

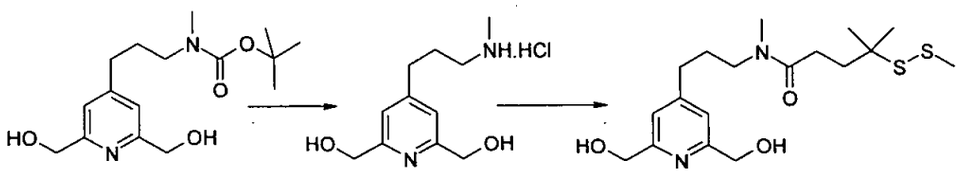


Puede prepararse 8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], usando 4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm): δ = 1,32 (s, 6H); 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H); 1,94 (m, 4H); de 2,20 a 4,30 (m, 18H); 4,00 (s, 6H); 4,27 (s ancho, 4H); de 5,21

a 5,68 (m, 6H); de 6,80 a 7,70 (m, 8H).

4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



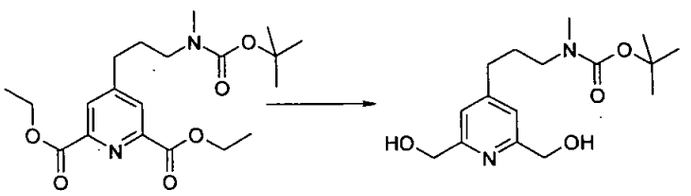
Puede prepararse 4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-2,6-bis-(hidroxi

metil)-piridina siguiendo el procedimiento para la preparación de 4-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina, usando 4-(3-(terc-Butoxicarbonil-metil-amino)-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

LC/MS (Método A3): ES: m/z = 387 MH^+

Tiempo de retención = 2,5 minutos

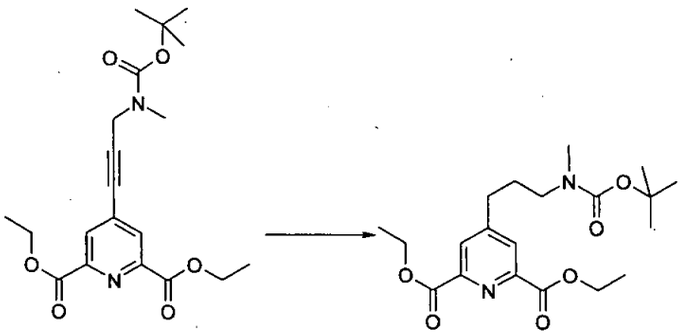
4-(3-(terc-Butoxicarbonil-metil-amino)-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



Puede prepararse 4-(3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina siguiendo el procedimiento para la preparación de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propoxi)-2,6-bis-(hidroximetil)piridina, usando éster dietílico del ácido 4-(3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-propil)-piridina-2,6-bis-dicarboxílico:

CI (Método D) m/z = 311 MH^+

Éster dietílico del ácido 4-(3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-propil)-piridina-2,6-bis-dicarboxílico



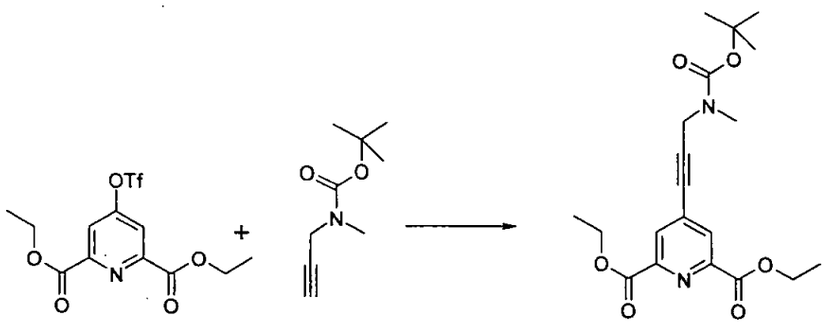
Puede prepararse éster dietílico del ácido 4-(3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-propil)-piridina-2,6-bis-dicarboxílico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster dietílico del ácido 5-(3-terc-butoxicarbonil-N-metil-amino-propil)-benceno-1,3-dicarboxílico, partiendo de éster dietílico del ácido 4-[3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-prop-1-inil]-piridina-2,6-dicarboxílico:

LC/MS (Método G2): ES: m/z = 395 MH^+

m/z = 339 $(M + 2H - tBu)^+$

Tiempo de retención = 7,5 minutos

Éster dietílico del ácido 4-[3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-prop-1-inil]-piridina-2,6-dicarboxílico



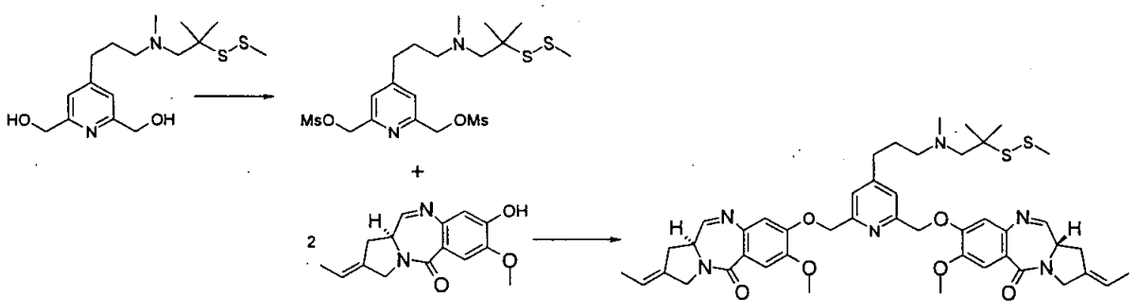
Puede prepararse éster dietílico del ácido 4-[3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-prop-1-inil]-piridina-2,6-dicarboxílico siguiendo el procedimiento para la preparación de éster dietílico del ácido 5-(3-terc-butoxicarbonil-N-metil-amino-propin-1-il)-benceno-1,3-dicarboxílico, partiendo de terc-butoxicarbonil-N-metil-propargilamina.

CI (Método D) m/z = 391 MH^+

Ejemplo 30:

8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-

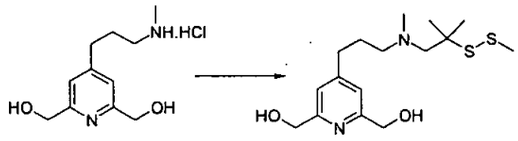
dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



Puede prepararse 8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], usando 4-{3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil}-2,6-bis-(hidroxi metil)-piridina:

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm): δ = 1,28 (s, 6H); 1,65 (m parcialmente enmascarado, 2H); 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H); 2,29 (s, 3H); 2,38 (s, 3H); 2,46 (m, 4H); 2,65 (m, 2H); 2,97 (m, 4H); 3,89 (m, 2H); 4,00 (s, 6H); 4,27 (s ancho, 4H); 5,29 (s, 4H); 5,60 (c ancho, J = 6,5 Hz, 2H); 6,86 (s, 2H); 7,30 (s, 2H); 7,55 (s, 2H); 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

4-{3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil}-2,6-bis-(hidroxi metil)-piridina



P-34409-034-3

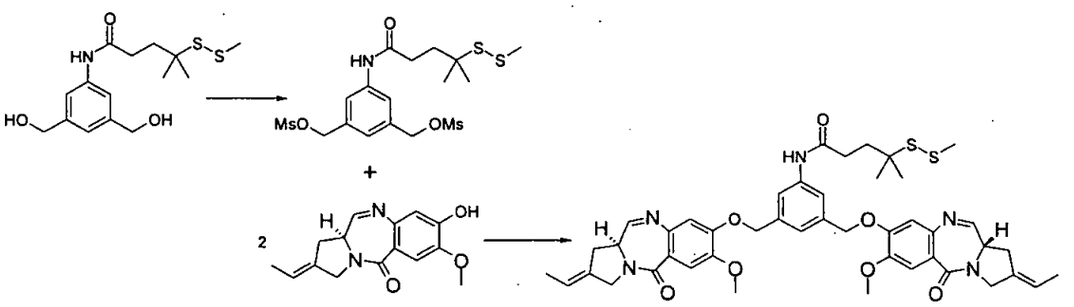
Puede prepararse 4-{3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil}-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina siguiendo el procedimiento para la preparación de 1-(2-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino-etoxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno, usando 4-{3-[metil-amino]-propil}-2,6-bis-(hidroxi metil)-piridina:

LC/MS (Método A1, Plataforma II): ES m/z = 345 MH^+

Tiempo de retención = 1,15 minutos

Ejemplo 31:

Puede prepararse 8,8'-[(1-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como se indica a continuación:



Puede prepararse 8,8'-[(1-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] siguiendo el procedimiento para la preparación de 8,8'-[(4-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], partiendo de (1-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido)-3,5-bis-(hidroximetil)-benceno:

LC/MS (Método A1, Plataforma I): ES: m/z = 838 MH^+

Tiempo de retención = 4,11 minutos

^{1}H R.M.N. (500 MHz, CDCl3-d1, δ en ppm): δ = 1,33 (s, 6H); 1,76 (d, J = 6,5 Hz, 6H); 2,03 (m, 2H); 2,43 (s, 3H); 2,46 (m, 2H); 2,97 (m, 4H); 3,89 (m, 2H); 3,95 (s, 6H); 4,27 (s ancho, 4H); 5,14 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,19 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,60 (c, J = 6,5 Hz, 2H); 6, 81 (s, 2H); de 7,20 a 7,60 (m, 6H); 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H)

Los derivados de mercapto correspondientes de los compuestos de los ejemplos 19-31 pueden prepararse por aplicación del procedimiento descrito en ejemplo 18.

• **Ejemplo A: Procedimiento general para la preparación de conjugados:**

Para la conjugación con derivados de tomaimicina se selecciona el anticuerpo anti-B4 que se une al antígeno CD19 expresado preferentemente en la superficie de células de linfoma humano.

En la primera etapa, el anticuerpo se hace reaccionar con el agente

modificador 5-nitro-2-piridilditiobutanoato de N-sulfosuccinimidilo (SSNPB) para introducir grupos nitropiridilditio. Una solución de anticuerpo huC242 a una concentración de 8 mg/ml en un tampón acuoso que contiene fosfato potásico 0,05 M, cloruro sódico 0,05 M y ácido etilendiaminatetraacético 2 mM (EDTA), pH 6,5 (65,6 ml) se trata con un exceso molar de 8 veces de una solución de SSNPB en dimetilacetamida (DMA). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 90 min. y después se introduce en una columna de exclusión molecular Sephadex G25 (50 mm x 35,5 mm, columna) que previamente se ha equilibrado en un tampón acuoso que contiene fosfato potásico 0,05 M, cloruro sódico 0,05 M y EDTA 2 mM, pH 7,5. Las fracciones modificadas que contienen anticuerpo se recogen y se reúnen para producir el producto. Una pequeña alícuota del anticuerpo modificado se trata con ditiotreitol para escindir el disulfuro de nitro-piridilo y la nitro-piridina-2-tiona liberada se ensaya espectrofotométricamente (ε_{323nm} = 4.299 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{280nm} = 565 $M^{-1}cm^{-1}$ para el compuesto y ε_{280nm} = 217.560 $M^{-1}cm^{-1}$ para el anticuerpo). Por molécula de anticuerpo típicamente se une una media de 4 a 6 moléculas de nitro-piridildisulfuro.

El anticuerpo modificado se diluye a 2,5 mg/ml en el tampón anterior a pH 7,5 y después se trata con una solución del derivado de tomaimicina en DMA, de tal forma que la concentración final de DMA en el tampón sea 20%. La mezcla de conjugación se agita a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se purifica por su paso a través de una columna de exclusión molecular Sephacril S300 (50 mm x 42 cm, columna que previamente se ha equilibrado en tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 6,5. Las fracciones que contienen anticuerpo monomérico-derivado de tomaimicina se reúnen y se dializan en el tampón PBS. El conjugado final se ensaya espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción que se determinan por separado para cada derivado de tomaimicina.

Conjugados SPDB-PBD y SMCC-PBD de los compuestos de la invención

huB4-SPDB – Compuesto del ejemplo 16

- Ejemplo A1: Para la conjugación con derivados de tomaimicina se selecciona el

anticuerpo anti-B4 que se une al antígeno CD19 expresado preferentemente en la superficie de células de linfoma humano.

El anticuerpo primero se modificó con N-hidroxisuccinimidil éster del ácido 4-(2-piridilditio)butanoico (SPDB) para inducir grupos piridilditio. Se añadió un exceso molar de 4,5 veces de SPDB (0,25 µmol, 81,1 µg) en dimetilacetamida (DMA) (50 µl) a una solución de huB4 (8 mg, 0,055 µmol) en tampón acuoso que contenía fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 50 mM y ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) 2 mM, pH 6,5 (0,95 ml). La concentración final de proteína fue 8 mg/ml con 5% de DMA en tampón. La modificación se dejó en rotación a temperatura ambiente durante 90 minutos, y después se purificó en una columna de exclusión molecular Sephadex G25 equilibrada en tampón acuoso que contenía fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 50 mM y EDTA 2 mM, pH 7,5. Una pequeña alícuota del anticuerpo modificado se trató con ditiotreitol (DTT) para escindir los grupos piridildisulfuro. El anticuerpo modificado y la piridinatiol liberada se ensayaron espectrofotométricamente (ε_{343} = 8.080 $M^{-1}cm^{-1}$ para la piridinatiol liberada, ε_{280} = 5100 $M^{-1}cm^{-1}$ para los grupos piridilditio modificados y ε_{280} = 222.960 $M^{-1}cm^{-1}$ para el anticuerpo). Se unieron 3,36 moléculas de piridildisulfuro, en promedio, por molécula de anticuerpo.

El anticuerpo modificado (2,29 mg, 0,016 µmol) se diluyó en el tampón anterior a pH 7,5 (732,8 µl) y DMA (91,6 µl, 10% v/v) y después se trató con una solución de 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis (metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Compuesto del ejemplo 16) (0,157 µmol, 0,12 mg) en DMA (91,6 µl, 10% v/v). La concentración final de proteína fue 2,5 mg/ml con 20% de DMA en tampón. La conjugación se dejó en rotación a temperatura ambiente durante una noche y después se clarificó por sedimentación (13.200 RPM durante 4 min). El sobrenadante después se purificó en una columna de exclusión molecular Sephadex G25 equilibrada en tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 6,5. El conjugado purificado se dializó en tampón PBS pH 6,5 (dilución ~1:650) con cuatro cambios de tampón. El conjugado se clarificó a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm y se ensayó espectrofotométricamente (ε_{280} = 7743 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{318} = 9137 $M^{-1}cm^{-1}$ para el PBD, y ε_{280} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$ para el anticuerpo). Se unieron 1,76 moléculas de PBD (Compuesto del ejemplo 16), en promedio, por

molécula de anticuerpo.

huB4-SMCC - Compuesto del ejemplo 16

• Ejemplo A2: Para la conjugación con derivados de tomaimicina se selecciona el anticuerpo anti-B4 que se une al antígeno CD19 expresado preferentemente en la superficie de células de linfoma humano.

En la primera etapa, el anticuerpo se hace reaccionar con el agente de modificación 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) para introducir grupos maleimida. Una solución de anticuerpo huB4 a una concentración de 6 mg/ml en un tampón acuoso que contiene fosfato potásico 0,05 M, cloruro sódico 0,05 M y ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) 2 mM, pH 6,7 (1 ml) se trata con un exceso molar de 6,5 veces de una solución de SMCC en dimetilacetamida (DMA). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 90 min. y después se introduce en una columna de exclusión molecular Sephadex G25 (NAP10) que previamente se ha equilibrado en un tampón acuoso que contiene ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 0,10 M, pH 8,0. Se recogen las fracciones que contienen el anticuerpo modificado y se reúnen para proporcionar el producto. Una pequeña alícuota del anticuerpo modificado se trata con β-mercaptoetanol durante 10 min seguido de la adición de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) para ensayar el tiol restante (ε_{412nm} = 14.150 $M^{-1}cm^{-1}$ para ácido 5-tio-2-nitro benzoico (TNB) y ε_{280nm} = 222.960 $M^{-1}cm^{-1}$ para el anticuerpo). La cantidad de tiol consumido en la reacción con maleimida en el anticuerpo (en comparación con un control sin anticuerpo) es igual a los moles de maleimida unidos al anticuerpo (ensayo de resta de Ellman). Se unieron aproximadamente 3,2 grupos maleimida reactivos por anticuerpo.

El anticuerpo modificado (3 mg, 0,021 μmol) se diluye a 3,0 mg/ml en tampón HEPES a pH 8,0 y después se trata con una solución de compuesto del ejemplo 16 en DMA (5 mM), de tal manera que la concentración final de DMA en el tampón sea de 15%. Se añadieron tres equivalentes molares de 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Compuesto del ejemplo 16) por enlazador (9,6 equiv. por anticuerpo, 0,202 μmol, 149 μg). La

mezcla de conjugación se agita a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla de reacción se purifica por medio del paso a través de una columna G25 (NAP 5) que previamente se ha equilibrado en tampón fosfato potásico 0,05 (KPi), NaCl 0,05 M, EDTA 0,002 M a pH 6,7. Las fracciones que contienen el conjugado huB4-compuesto del ejemplo 16 se reúnen y se dializan en el tampón KPi durante 3 cambios (24 h). El conjugado final (2,2 mg, 2,3 mg/ml) se ensaya espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción que se determinan para el compuesto del ejemplo 16 (ε_{318nm} = 9.137 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{280nm} = 7.743 $M^{-1}cm^{-1}$) y el anticuerpo B4 (ε_{280nm} = 222.960 $M^{-1}cm^{-1}$). Se unieron 2,8 moléculas de PBD (Compuesto del ejemplo 16), en promedio, por molécula de anticuerpo.

huB4-SPDB – Compuesto del ejemplo 17

• Ejemplo A3: Para la conjugación con derivados de tomaimicina se selecciona el anticuerpo anti-B4 que se une al antígeno CD19 expresado preferentemente en la superficie de células de linfoma humano.

El anticuerpo primero se modificó con N-hidroxisuccinimidil éster del ácido 4-(2-piridilditio)butanoico (SPDB) para inducir grupos piridilditio. Se añadió un exceso molar de 4,5 veces de SPDB (0,124 µmol, 40,6 µg) en DMA (25 µl) a solución de huB4 (4 mg, 0,028 µmol) en tampón acuoso que contenía fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 50 mM y EDTA 2 mM, pH 6,5 (0,475 ml). La concentración final de proteína fue 8 mg/ml con 5% de DMA en tampón. La modificación se dejó en rotación a temperatura ambiente durante 90 minutos, y después se purificó en una columna de exclusión molecular Sephadex G25 equilibrada en un tampón acuoso que contenía fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 50 mM y EDTA 2 mM, pH 7,5. Una pequeña alícuota del anticuerpo modificado se trató con DTT para escindir los grupos piridildisulfuro. El anticuerpo modificado y la piridinatiol liberada se ensayaron espectrofotométricamente (ε_{343} = 8.080 $M^{-1}cm^{-1}$ para la piridinatiol liberada, ε_{280} = 5100 $M^{-1}cm^{-1}$ para los grupos piridilditio modificados y ε_{280} = 222.960 $M^{-1}cm^{-1}$ para el anticuerpo). Se unieron 3,31 moléculas de piridildisulfuro, en promedio, por molécula de anticuerpo.

El anticuerpo modificado (3,06 mg, 0,021 µmol) se diluyó en el tampón anterior a pH 7,5 (0,976 µl) y DMA (122 µl, 10% v/v) y después se trató con una

solución de 8,8'-[5-(N2-mercapto-2,2-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis (metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Compuesto del ejemplo 17) (0,209 µmol, 0,154 mg) en DMA (122 µl, 10% v/v). La concentración final de proteína fue 2,5 mg/ml con 20% de DMA en tampón. La conjugación se dejó en rotación a temperatura ambiente durante una noche y después se clarificó por sedimentación (13.200 RPM durante 4 min). El sobrenadante después se purificó en una columna de exclusión molecular Sephadex G25 equilibrada en un tampón PBS a pH 6,5. El conjugado purificado se dializó en tampón PBS pH 6,5 (dilución ~1:1200) con tres cambios de tampón. El conjugado se clarificó a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm y se ensayó espectrofotométricamente (ε_{280} = 10736 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{318} = 12053 $M^{-1}cm^{-1}$ para el PBD, y ε_{280} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$ para el anticuerpo). Se unieron 3,05 moléculas de PBD (compuesto del ejemplo 17), en promedio, por molécula de anticuerpo.

huB4-SMCC - Compuesto del ejemplo 17

• Ejemplo A4: Para la conjugación con derivados de tomaimicina se selecciona el anticuerpo anti-B4 que se une al antígeno CD19 expresado preferentemente en la superficie de células de linfoma humano.

En la primera etapa, el anticuerpo se hace reaccionar con el agente de modificación 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) para introducir grupos maleimida. Una solución de anticuerpo huB4 a una concentración de 6 mg/ml en un tampón acuoso que contiene fosfato potásico 0,05 M, cloruro sódico 0,05 M y ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) 2 mM, pH 6,7 (1 ml) se trata con un exceso molar de 7 veces de una solución de SMCC en dimetilacetamida (DMA). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 90 min. y después se introduce en una columna de exclusión molecular Sephadex G25 (NAP10) que previamente se ha equilibrado en un tampón acuoso que contiene ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 0,10 M, pH 8,0. Se recogen las fracciones que contienen el anticuerpo modificado y se reúnen para proporcionar el producto. Una pequeña alícuota del anticuerpo modificado se trata con β-mercaptoetanol durante 10 min seguido de la adición de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) para ensayar el tiol restante (ε_{412nm} = 14.150 $M^{-1}cm^{-1}$ para ácido 5-tio-2-nitro benzoico (TNB) y ε_{280nm} = 222.960 $M^{-1}cm^{-1}$

303

para el anticuerpo). La cantidad de tiol consumido en la reacción con maleimida en el anticuerpo (en comparación con un control sin anticuerpo) es igual a los moles de maleimida unidos al anticuerpo (ensayo de resta de Ellman). Se unieron aproximadamente 3,7 grupos maleimida reactivos por anticuerpo.

El anticuerpo modificado (4,4 mg, 0,03 μmol) se diluye a 8,7 mg/ml en tampón HEPES a pH 8,0 y después se trata con una solución de compuesto del ejemplo 17 en DMA (5,4 mM), de tal manera que la concentración final de DMA en el tampón sea de 20%. Se añadieron dos equivalentes molares de 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Compuesto del ejemplo 17) por enlazador (7,4 equiv. por anticuerpo, 0,222 μmol, 164 μg). La mezcla de conjugación se agita a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla de reacción se purifica por medio del paso a través de una columna G25 (NAP 5) que previamente se ha equilibrado en tampón de fosfato potásico 0,05 (KPi), NaCl 0,05 M, EDTA 0,002 M a pH 6,7. Las fracciones que contienen el conjugado huB4-compuesto del ejemplo 17 se reúnen y se dializan en el tampón KPi durante 3 cambios (24 h). El conjugado final (2,25 mg, 2,25 mg/ml) se ensaya espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción que se determinan para el compuesto del ejemplo 17 (ε_{318nm} = 12.053 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{280nm} = 10.736 $M^{-1}cm^{-1}$) y el anticuerpo B4 (ε_{280nm} = 222.960 $M^{-1}cm^{-1}$). Se unieron 2,8 moléculas de PBD (compuesto del ejemplo 17), en promedio, por molécula de anticuerpo.

huMy9-6-SPDB - Compuesto del ejemplo 16

Ejemplo A5: El anticuerpo primero se modificó con N-hidroxisuccinimidil éster del ácido 4-(2-piridilditio)butanoico (SPDB) para inducir grupos piridilditio. Se añadió un exceso molar de 4,5 veces de SPDB (0,246 μmol, 80,1 μg) en DMA (50 μl) a solución de huMy9-6 (8 mg, 0,055 μmol) en tampón acuoso que contenía fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 50 mM y EDTA 2 mM, pH 6,5 (0,950 ml). La concentración final de proteína fue 8 mg/ml con DMA al 5% en tampón. La modificación se dejó en rotación a temperatura ambiente durante 90 minutos, y después se purificó en una columna de exclusión molecular Sephadex G25 equilibrada en un tampón acuoso que contenía fosfato potásico 50 mM, cloruro

sódico 50 mM y EDTA 2 mM, pH 8,5. Una pequeña alícuota del anticuerpo modificado se trató con DTT para escindir los grupos piridildisulfuro. El anticuerpo modificado y la piridinatiol liberada se ensayaron espectrofotométricamente (ε_{343} = 8.080 $M^{-1}cm^{-1}$ para la piridinatiol liberada, ε_{280} = 5100 $M^{-1}cm^{-1}$ para los grupos piridilditio modificados y ε_{280} = 206.460 $M^{-1}cm^{-1}$ para el anticuerpo). Se unieron 3,32 moléculas de piridildisulfuro, en promedio, por molécula de anticuerpo.

El anticuerpo modificado (3,05 mg, 0,0208 µmol) se diluyó en el tampón anterior a pH 8,5 (976 µl) y DMA (122 µl, 10% v/v) y después se trató con una solución de 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis (metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Compuesto del ejemplo 16) (0,207 µmol, 0,158 mg) en DMA (122 µl, 10% v/v). La concentración final de proteína fue 2,5 mg/ml con 20% de DMA en tampón. La conjugación se dejó en rotación a temperatura ambiente durante una noche y después se clarificó por sedimentación (13.200 RPM durante 4 min). El sobrenadante después se purificó en una columna de exclusión molecular Sephadex G25 equilibrada en un tampón PBS a pH 6,5. El conjugado purificado se dializó en tampón PBS pH 6,5 (dilución ~1:600) con tres cambios de tampón. El conjugado se clarificó a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm y se ensayó espectrofotométricamente (ε_{280} = 7743 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{318} = 9137 $M^{-1}cm^{-1}$ para el PBD, y ε_{280} = 206.460 $M^{-1}cm^{-1}$ para el anticuerpo). Se unieron 2,58 moléculas de PBD (compuesto del ejemplo 16), en promedio, por molécula de anticuerpo.

• **Ejemplo B: Ensayo de unión**

Las afinidades de unión relativas del anticuerpo anti-B4 y su conjugado de tomaimicina sobre células Ramos que expresan antígenos se determina usando un ensayo basado en fluorescencia. Se añaden el conjugado anticuerpo-conjugado de tomaimicina y el anticuerpo desnudo a concentraciones iniciales de 1 a 10^{-7} M en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se valoran utilizando diluciones de 3 veces en serie, de manera que haya duplicados para cada concentración. Se añaden células Ramos en concentración de 50.000 células por pocillo, en cada pocillo que contiene distintas concentraciones de anticuerpo o conjugado, así como en los pocillos de control. Las placas se incuban en hielo durante 3 horas. Después del periodo de incubación, las células en la placa se lavan y se añade un anticuerpo

secundario marcado con fluorescencia que se une a IgG humanizada, tal como anti-B4, y las placas se incuban durante 1 hora en hielo. Las placas se lavan de nuevo después del periodo de incubación, y las células se fijan con una solución de formaldehído/PBS al 1%. Se mide la fluorescencia en cada pozo de las placas utilizando un analizador de fluorescencia Becton Dickinson FACSCalibur. Los datos se representan como porcentaje de la fluorescencia máxima obtenida para la concentración más alta de anticuerpo o conjugado.

• Ejemplo C: Potencia y especificidad *in vitro* del derivado de tomaimicina o de conjugados del derivado de tomaimicina. Protocolo general a usar:

Se añaden muestras de un derivado libre de tomaimicina o de un conjugado de derivado de tomaimicina a una placa de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo plano y se valoran usando diluciones en serie que varían de 1×10^{-12} M a 3×10^{-7} M. Se añaden células tumorales antígeno-positivas o células tumorales antígeno-negativas a los pocillos de tal manera que haya muestras por triplicado para cada concentración de fármaco para cada línea celular. Las placas se incuban a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 durante 4 días.

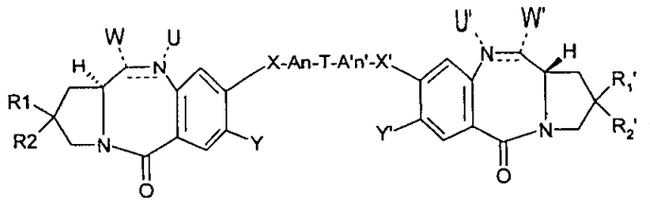
Al final del periodo de incubación, se añaden 20 µl del reactivo de tetrazolio WST-8 (2-(2-metoxi-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2-tetrazolio, sal monosódica) a cada pocillo y las placas se devuelven al incubador durante 2 horas. Después se mide la absorbancia en cada pocillo de las placas utilizando un lector de placas Molecular Devices a 450 nm. Se representa la fracción de supervivencia de células a cada concentración de derivado de tomaimicina o conjugado.

Compuestos	A549 (CI_{50})	KB (CI_{50})	MCF7 (CI_{50})
Ejemplo 5	7×10^{-11} M	1×10^{-10} M	1×10^{-10} M
Ejemplo 1	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M
Ejemplo 2	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M

Se ensayó la citotoxicidad específica de los compuestos frente a los conjugados de la invención contra líneas celulares MOLT-4 y BJAB o HL60/GC y Ramos. Los resultados se ilustran en las figuras 1a-c, 2a-c y 3a-b.

REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula (I)



(I)

en la que

---- representa un enlace sencillo opcional;

 representa un enlace sencillo o un doble enlace;

con la condición de que cuando  representa un enlace sencillo, U y U', iguales o diferentes, representan independientemente H y W y W', iguales o diferentes, se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (por ejemplo un acetato), tal como -OCOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como –OCONRR', un carbamato cíclico, tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, una urea tal como –NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -SH, un sulfuro tal como -SR, un sulfóxido tal como -SOR, una sulfona tal como -SOOR, un sulfonato tal como $–SO_3^-$, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como –NRR', opcionalmente amina cíclica tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como –NRCOR, un azido tal como $–N_3$, un ciano, un halo, un trialquilo o triarilfosfonio, un grupo derivado de aminoácido;

y cuando representa un doble enlace, U y U' están ausentes y W y W' representan H;

• R1, R2, R1', R2' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre un Haluro o Alquilo opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het, $S(O)_qR$, o R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos un grupo que contiene un doble enlace =B y =B' respectivamente.

• B y B' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre Alquenilo que está opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, R, CF_3, OR, Arilo, Het,

15. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 14, en los que dicho enlazador es de fórmula:

–G-D-(Z)p-S-Z'

en la que

G es un enlace sencillo o un doble enlace, –O-, -S- o –NR-;

D es un enlace sencillo o –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-;

donde E y F son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre –$(OCH_2CH_2)_i$Alquil$(OCH_2CH_2)_j$- lineal o ramificado, -Alquil$(OCH_2CH_2)_i$-Alquil-, -$(OCH_2CH_2)_i$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Cicloalquil$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Heterocíclico$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Aril$(OCH_2CH_2)_j$-, -$(OCH_2CH_2)_i$Heteroaril$(OCH_2CH_2)_j$-, –Alquil-$(OCH_2CH_2)_i$Alquil$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alquil-$(OCH_2CH_2)_i$-, -Alquil-$(OCH_2CH_2)_i$Cicloalquil$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alquil$(OCH_2CH_2)_i$Heterocíclico$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alquil-$(OCH_2CH_2)_i$Aril$(OCH_2CH_2)_j$-, -Alquil$(OCH_2CH_2)_i$Heteroaril$(OCH_2CH_2)_j$-, -Cicloalquil-Alquil-, -Alquil-Cicloalquil-, -Heterocíclico-Alquil-, -Alquil-Heterocíclico-, -Alquil-Aril-, -Aril-Alquil-, -Alquil-Heteroaril-, -Heteroaril-Alquil-;

donde i y j, iguales o diferentes, son números enteros y se eligen independientemente entre 0, 1 a 2000;

Z es -Alquil- lineal o ramificado;

p es 0 ó 1;

Z' representa H, un grupo protector de tiol tal como COR, R_{20} o SR_{20}, donde R_{20} representa H, metilo, Alquilo, Cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo, heteroarilo o un grupo heterocíclico, con la condición de que cuando Z' es H, dicho compuesto esté en equilibrio con el compuesto correspondiente formado por ciclación intramolecular producida por la adición del grupo tiol –SH al enlace imina –NH= de uno de los restos PBD.

16. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 15, en los que G es un enlace sencillo o –O- o –NR-.

17. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 15, en los que G es –O-.

18. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 15, en los que D es un enlace sencillo o –E-, -E-NR-, -E-CO-, -CO-E-, -E-NR-CO-.

19. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 15, en los que D es -E-NR-CO-.

20. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 15, en los que E es un grupo –Alquil- lineal o ramificado, $-(OCH_2CH_2)_i-$ o –Alquil-heterocíclico.

21. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 15, en los que Z es $-(CH_2)_2-C(CH_3)_2-$.

22. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 15, en los que p es 1.

24. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 15, en los que Z' es H o SR_{20}, donde R_{20} representa Alquilo, arilo, un grupo heterocíclico o heteroarilo.

24. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 14 ó 15, en los que dicho enlazador se elige entre:

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_y(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(OCO)(R_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t(CONR_{19})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-furil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,$-(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolil- $CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-tienil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolil-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-N-metil-piperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-furil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-oxazolil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-tienil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolil-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-N-metilpiperazino-QSZ', o

$-O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-O(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-O-fenil-QSZ', -O-furil-QSZ', -O-oxazolil-QSZ', -O-tiazolil-QSZ', -O-tienil-QSZ', -O-imidazolil-QSZ', -O-morfolino-QSZ', -O-piperazino-QSZ', -O-N-metilpiperazino-QSZ',

$-OCO(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)_v(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-OCO-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-OCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-OCO-fenil-QSZ', -OCO-furil-QSZ', -OCO-oxazolil-QSZ', -OCO-tiazolil-QSZ', -OCO-tienil-QSZ', -OCO-imidazolil-QSZ', -OCO-morfolino-QSZ', -OCO-piperazino-QSZ', -OCO-N-metilpiperazino-QSZ', o

$-CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-CO-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-CO-fenil-QSZ', -CO-furil-QSZ', -CO-oxazolil-QSZ', -CO-tiazolil-QSZ', -CO-tienil-QSZ', -CO-imidazolil-QSZ', -CO-morfolino-QSZ', -CO-piperazino-QSZ', -CO-piperidino-QSZ', -CO-N-metilpiperazino-QSZ',

$-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO$-fenil-QSZ', $-NR_{19}CO$-furil-QSZ', $-NR_{19}CO$-oxazolil-QSZ', $-NR_{19}CO$-tiazolil-QSZ', $-NR_{19}CO$-tienil-QSZ', $-NR_{19}CO$-imidazolil-QSZ', $-NR_{19}CO$-morfolino-QSZ', $-NR_{19}CO$-piperazino-QSZ', $-NR_{19}CO$-piperidino-QSZ', $-NR_{19}CO$-N-metilpiperazino-QSZ',
$-NR_{19}$-fenil-QSZ', $-NR_{19}$-furil-QSZ', $-NR_{19}$-oxazolil-QSZ', $-NR_{19}$-tiazolil-QSZ', $-NR_{19}$-tienil-QSZ', $-NR_{19}$-imidazolil-QSZ', $-NR_{19}$-morfolino-QSZ', $-NR_{19}$-piperazino-QSZ', $-NR_{19}$-piperidino-QSZ', $-NR_{19}$-N-metilpiperazino-QSZ',
$-NR_{19}CO-NR_{12}$-fenil-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-oxazolil-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-tiazolil-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-tienil-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-piperidino-QSZ',

$-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-SCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-SCO-morfolino-QSZ', -SCO-piperazino-QSZ', -SCO-piperidino-QSZ', y -SCO-N-metilpiperazino-QSZ', donde:

Z' es H, un grupo protector de tiol, R_{20}' o SR_{20}' donde R_{20}' representa alquilo, arilo, un grupo heterocíclico o heteroarilo,

donde Q es un enlace directo o un grupo alquilo lineal o alquilo ramificado que tiene 1-10 átomos de carbono o un espaciador de polietilenglicol con 2 a 20 unidades de repetición etileno oxi;

R_{19} y R_{12} son iguales o diferentes y son alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, o un grupo arilo o heterocíclico simple o sustituido, y R_{12} puede ser además H,

R_{13}, R_{14}, R_{15} y R_{16} son iguales o diferentes y son H o un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono,

R_{17} y R_{18} son H o alquilo,

u es un número entero de 1 a 10 y también puede ser 0,

t es un número entero de 1 a 10 y también puede ser 0,

y es un número entero de 1 a 20 y puede ser también 0.

25. Compuestos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores elegidos entre:

8,8'-[1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-metoxi-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[1,4-butanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[2,6-piridinadiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropiloxi)-2,6-piridinadiilbis-(metilenooxi)]-

bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(3-aminopropiloxi)-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bencenodiilbis-(metilenooxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-{5-[3-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)propiloxi]-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)}-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

éster terc-butílico del ácido bis-{2-[(S)-2-metileno-7-metoxi-5-oxo-1,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi]-etil}-carbámico

8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(oxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bencenodiilbis(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bencenodiil(metilenooxi)]-bis[7-metoxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-propoxi)-piridin-2,6-dimetil)-

312

dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido-butoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-etoxi)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildisulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

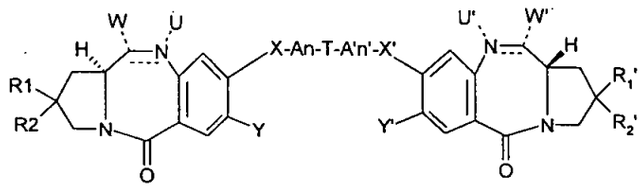
8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildisulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(4-metil-4-metildisulfanil)-pentanamido)-benceno-3,5-dimetil)-dioxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetoxi-1,2,3,11a-tetrahidro-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

así como los derivados de mercapto correspondientes,
o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros.

26. Un conjugado que comprende uno o más derivados de tomaimicina unidos químicamente a un agente de unión a las células a través de un enlazador que comprende un grupo de unión.

27. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 26, en el que el derivado de tomaimicina es de fórmula (I'):



(I')

en la que

---- representa un enlace sencillo opcional;

---- representa un enlace sencillo o un doble enlace;

con la condición de que cuando ---- representa un enlace sencillo, U y U', iguales o diferentes, representan independientemente H, y W y W', iguales o diferentes, se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en OH, un éter tal como -OR, un éster (por ejemplo un acetato), tal como -OCOR, un carbonato tal como -OCOOR, un carbamato tal como –OCONRR', un carbamato cíclico, tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, una urea tal como –NRCONRR', un tiocarbamato tal como -OCSNHR, un tiocarbamato cíclico tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, -SH, un sulfuro tal como -SR, un sulfóxido tal como -SOR, una sulfona tal como -SOOR, un sulfonato tal como $–SO_3^-$, una sulfonamida tal como -NRSOOR, una amina tal como –NRR', opcionalmente amina cíclica tal que N10 y C11 son una parte del ciclo, un derivado de hidroxilamina tal como -NROR', una amida tal como –NRCOR, un azido tal como $–N_3$, un ciano, un halo, un trialquilo o triarilfosfonio, un grupo derivado de aminoácido;

y cuando ---- representa un doble enlace, U y U' están ausentes y W y W'

representan H;

• R1, R2, R1', R2' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre un Haluro o Alquilo opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het, $S(O)_qR$, o R1 y R2 y R1' y R2' forman juntos un grupo que contiene un doble enlace =B y =B' respectivamente.

• B y B' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre Alquenilo que está opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, Arilo, Het, $S(O)_qR$ o B y B' representan un átomo de oxígeno.

• X, X' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre uno o más de –O-, -NR-, -(C=O)-, $-S(O)_q-$.

• A, A' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre Alquilo o Alquenilo opcionalmente que contiene opcionalmente un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno o un átomo de azufre y estando cada uno de ellos opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$, Arilo, Het, Alquilo, Alquenilo.

• Y, Y' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre H, OR;

• T es –Alquil-, -NR-, -O-, $-S(O)_q-$, o un grupo arilo de 4 a 10 miembros, cicloalquilo, un grupo heterocíclico o heteroarilo, estando cada uno de ellos opcionalmente sustituido con uno o más Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$,
y sustituido con uno o más de dicho(s) enlazador(es),

• n, n', iguales o diferentes, son 0 ó 1;

• q es 0, 1 ó 2.

• R, R' son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre H, Alquilo, Arilo, estando cada uno de ellos opcionalmente sustituido con Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, Arilo, Het;

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros,
estando dicho derivado unido covalentemente a un agente de unión a las células a través de dicho enlazador que comprende dicho grupo de unión.

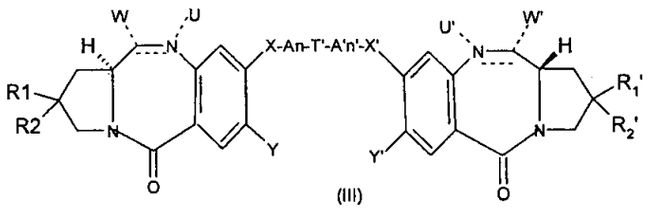
28. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 26 ó 27, en el que dicho agente de unión a las células se elige entre anticuerpos o un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión, hormonas, factores de crecimiento, moléculas transportadoras de nutrientes, o cualquier otra molécula o sustancia de unión celular.

29. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 26, 27 ó 28, en el que dicho agente de unión a las células se elige entre anticuerpos monoclonales; anticuerpos quiméricos; anticuerpos humanizados; anticuerpos totalmente humanos; anticuerpos monocatenarios; fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', $F(ab')_2$ y F_v, interferones; péptidos; linfoquinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6; hormonas tales como insulina, TRH (hormonas liberadoras de tirotropina), MSH (hormona estimuladora de melanocitos), hormonas esteroideas, tales como andrógenos y estrógenos; factores de crecimiento y factores estimuladores de colonias tales como EGF, TGFα, factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF y GM-CSF; vitaminas, tales como folato y transferrina.

30. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en el que U, U', W, W', R1, R2, R1', R2', Y, Y', X, A, A', X', n, n', ----, $\overline{\text{----}}$, T y dicho enlazador se definen como en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 25.

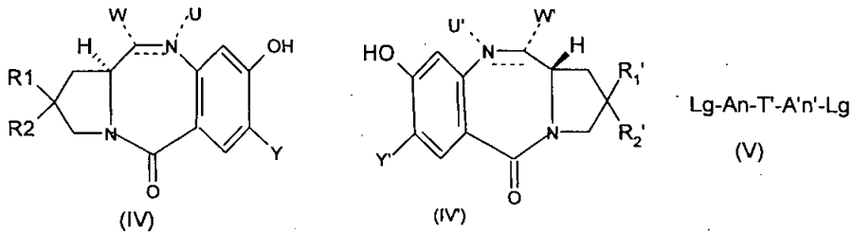
31. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30, en el que dicho grupo de unión es un grupo tiol, sulfuro o disulfuro.

32. Proceso de preparación de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, que comprende la etapa de desproteger un compuesto correspondiente de fórmula (III):



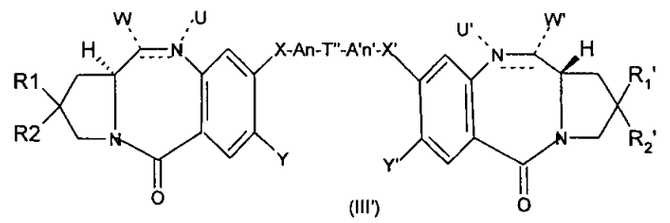
en la que Y, Y', X, X', A, A', X', U, U', W, W', ----, ——, R1, R1', R2, R2', n, n' son como se han definido en la fórmula (I) y T' se corresponde con T donde el/los grupo(s) funcional(es) se ha(n) protegido, y opcionalmente aislar el compuesto deseado de fórmula (I).

33. Proceso de acuerdo con la reivindicación 32, en el que los compuestos de fórmula (III) se obtienen a partir de los compuestos de acoplamiento correspondientes de fórmulas (IV), (IV') y (V):



donde U, U', W, W', Y, Y', A, A', n, n', T', ----, ——, R1, R2, R1', R2' son como se han definido en la fórmula (III), y Lg es un grupo saliente.

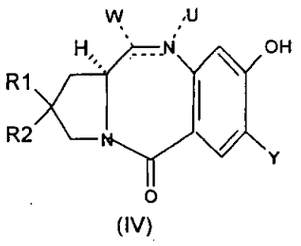
34. Proceso de preparación de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, a partir del compuesto correspondiente de fórmula (III'):



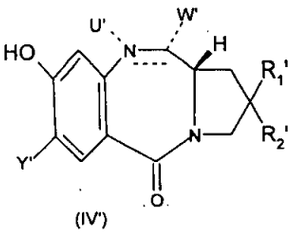
en la que Y, Y', X, X', A, A', X', U, U', W, W', ----, ——, R1, R2, R1', R2', n, n' son como se han definido en la fórmula (I) y T'' es un grupo precursor opcionalmente protegido de T, y opcionalmente aislar el compuesto deseado de fórmula (I).

35. Proceso de acuerdo con la reivindicación 34, en el que el compuesto de

fórmula (III') puede obtenerse por acoplamiento del compuesto correspondiente de fórmulas (IV), (IV') y (V'):



(IV)



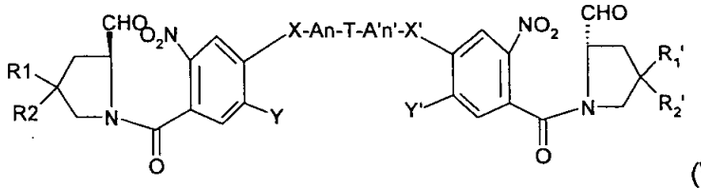
(IV')

Lg-An-T''-A'n'-Lg

(V')

donde U, Q, W, W', Y, Y', A, A', n, n', ----, ——, R1, R2, R1', R2' son como se han definido en la fórmula (I), T'' es un grupo precursor opcionalmente protegido de T y Lg es un grupo saliente.

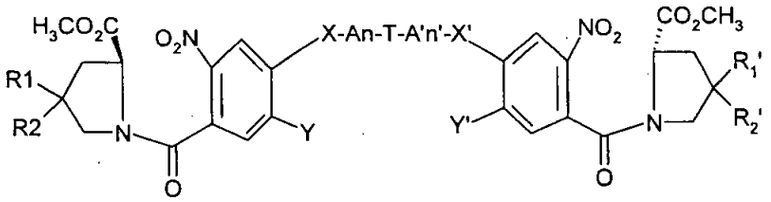
36. Proceso de preparación de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, que comprende la etapa de ciclar el compuesto correspondiente de fórmula (VIII):



(VIII)

en la que Y, Y', X, A, A', X', n, n', T, R1, R2, R1', R2' son como se han definido en la fórmula (I).

37. Proceso de acuerdo con la reivindicación 36, en el que el compuesto de fórmula (VIII) puede obtenerse a partir del compuesto correspondiente de fórmula (IX):



(IX)

en la que Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T son como se han definido en la fórmula (I).

38. Proceso de preparación de un conjugado de acuerdo con una cualquiera

de las reivindicaciones 27 a 31, que comprende la etapa en la que un compuesto de fórmula (I) como se ha definido en la reivindicación 1, en el que T comprende un grupo sulfuro, disulfuro o tiol, o un precursor del mismo, se hace reaccionar con un agente de unión a las células que comprende una función reactiva con disulfuro o tiol de manera que el compuesto y el agente de unión a las células se unen entre sí a través de un enlace sulfuro o disulfuro.

39. Una composición farmacéutica que comprende una molécula conjugada como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 31, o un compuesto de fórmula (I) como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40. Uso de una cantidad eficaz de una molécula conjugada como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 31 o un compuesto de fórmula (I) como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, para la preparación de un medicamento para destruir o inhibir el crecimiento de células, que comprende poner en contacto células diana o tejidos que contienen células diana.

41. Uso de una cantidad eficaz de una molécula conjugada como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 31 o un compuesto de fórmula (I) como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cánceres.

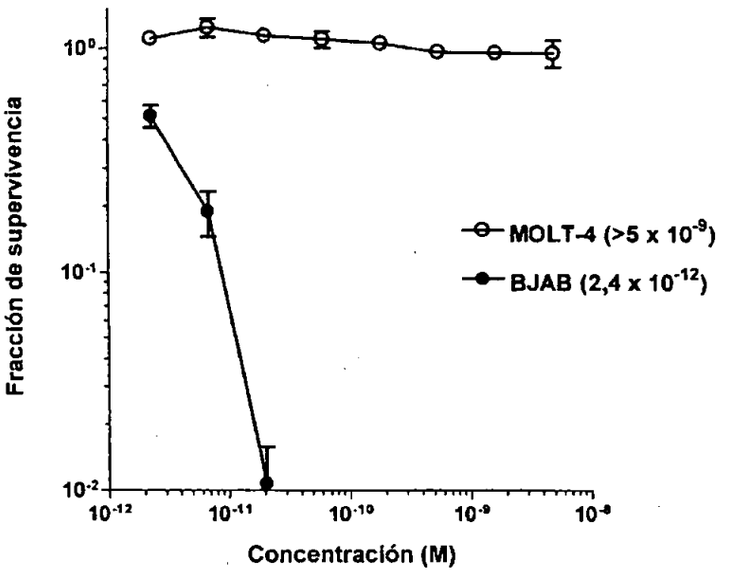


Figura 1a

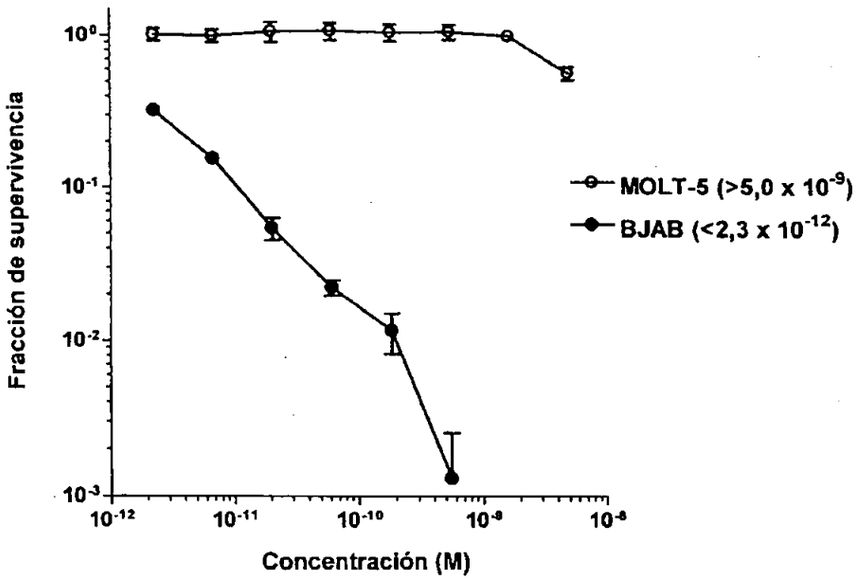


Figura 1b

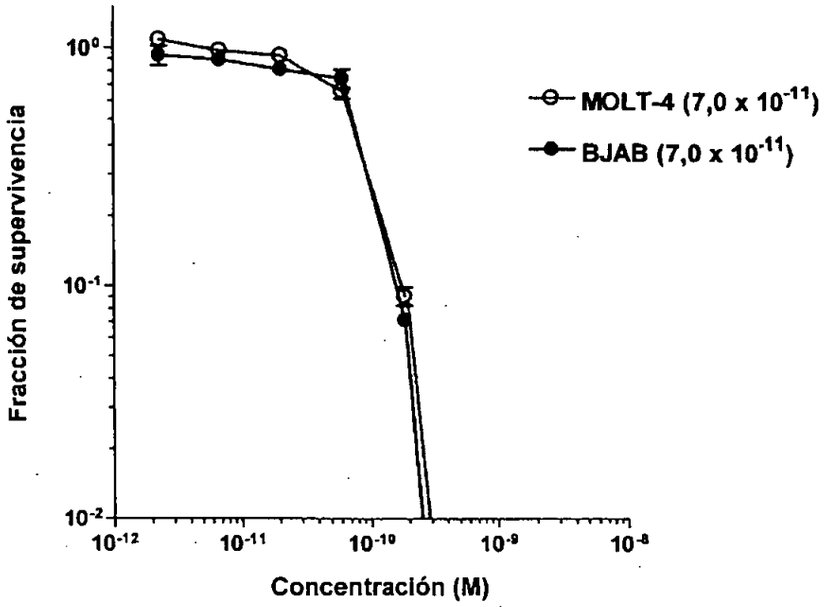


Figura 1c

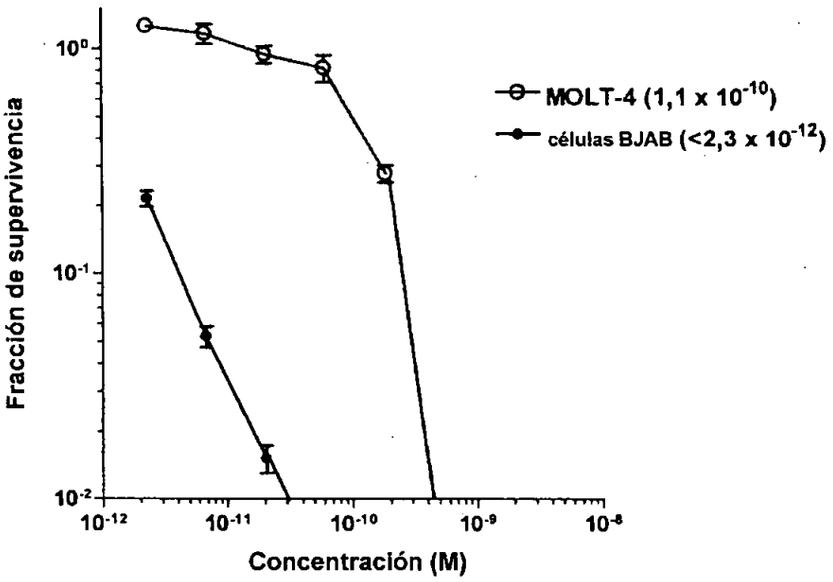


Figura 2a

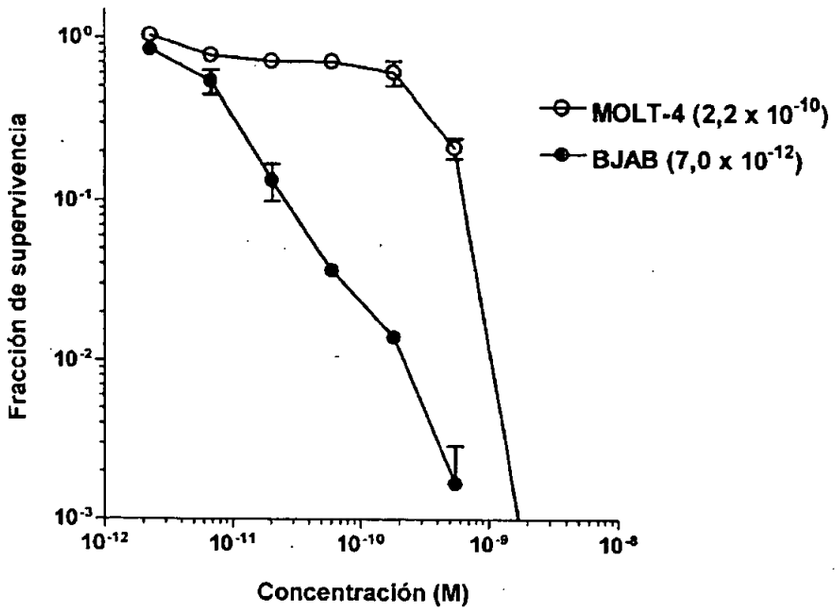


Figura 2b

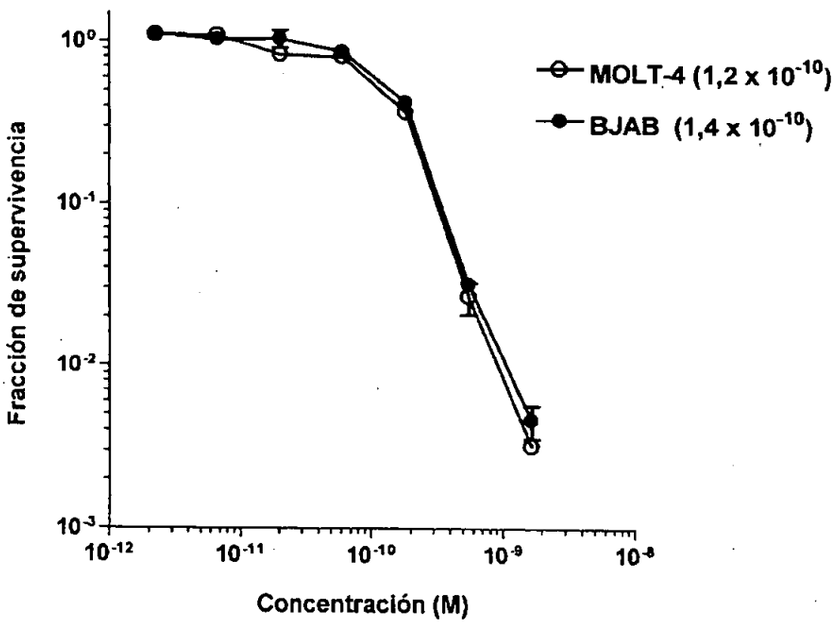


Figura 2c

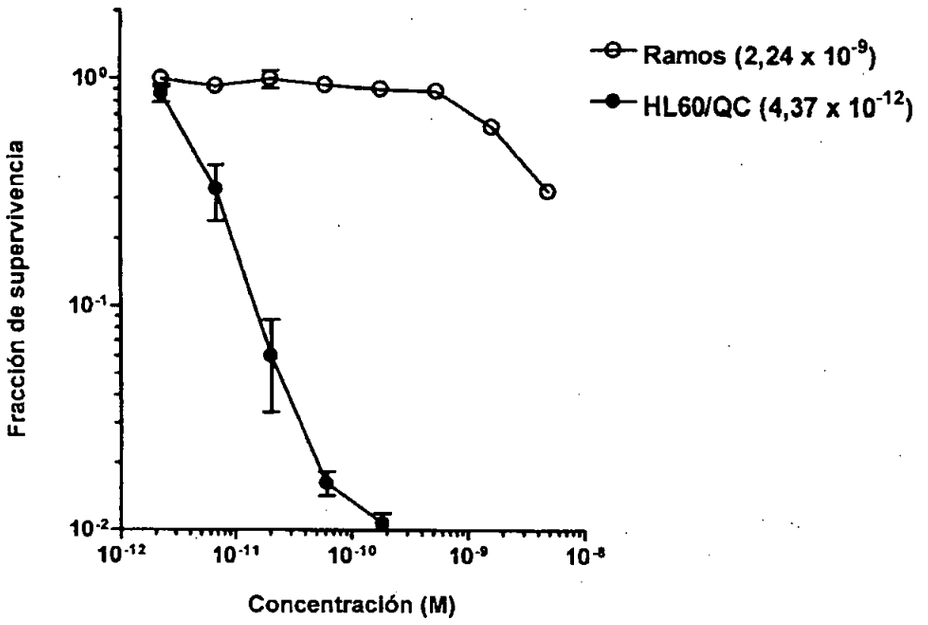


Figura 3a

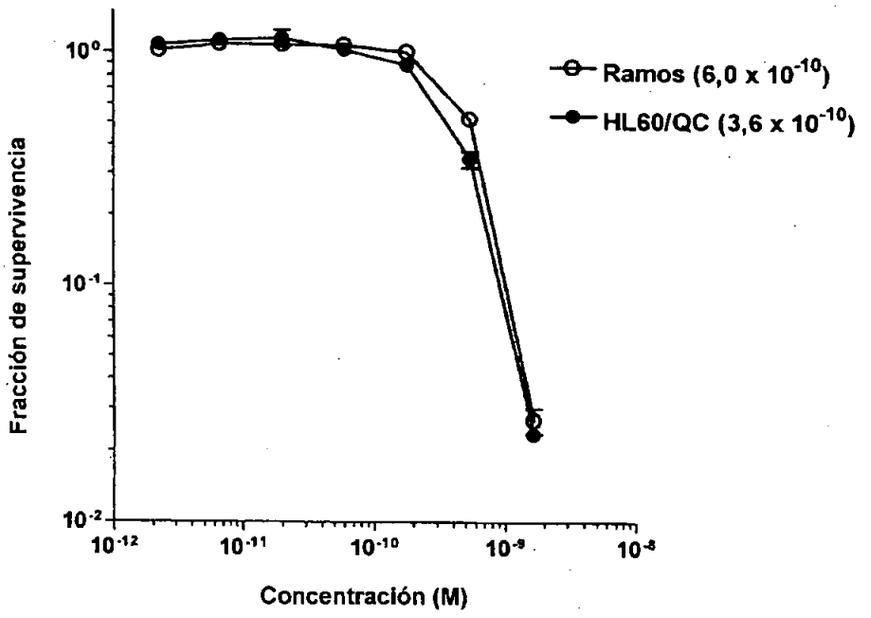


Figura 3b

323

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/000142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D487/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BEILSTEIN Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/085250 A (SPIROGEN LIMITED; HOWARD, PHILIP WILSON; GREGSON, STEPHEN JOHN; TIBERG) 15 September 2005 (2005-09-15) page 58 - page 61; compounds (18)-(21) claim 1	1-41
X	WO 2005/110423 A (SPIROGEN LIMITED; PEPPER, CHRISTOPHER JOHN; THURSTON, DAVID EDWIN) 24 November 2005 (2005-11-24) claim 1	2-10,25
X	WO 2005/040170 A (GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, REPRESENTED BY THE SECRETA) 6 May 2005 (2005-05-06) claim 1	1-10

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
3 May 2007	14/05/2007

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	SAHAGUN KRAUSE, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/000142

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/087716 A (COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH; KAMAL, AHMED; REDDY, PE) 14 October 2004 (2004-10-14) claim 1	1-14, 25-41
A	GREGSON S J ET AL: "Synthesis of a novel C2/C2'-exo unsaturated pyrrolobenzodiazepine cross-linking agent with remarkable DNA binding affinity and cytotoxicity" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS, CHEMICAL SOCIETY. LETCHWORTH, GB, 1999, pages 797-798, XP002136001 ISSN: 0022-4936 page 797; compound 20	1-10
Y	KAMAL A ET AL: "The effect of C2-fluoro group on the biological activity of DC-81 and its dimers" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 14, no. 10, 17 May 2004 (2004-05-17), pages 2669-2672, XP004841263 ISSN: 0960-894X page 2669; compounds 4A-4C	1-10
Y	GREGSON S J ET AL: "Linker Length Modulates DNA Cross-Linking Reactivity and Cytotoxic Potency of C8/C8' Ether-Linked C2-exo-Unsaturated Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine (PBD) Dimers" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. WASHINGTON, US, vol. 47, 2004, pages 1161-1174, XP002316295 ISSN: 0022-2623 page 1162; compounds 3A-3D, 4A-4B	1-10
Y	KAMAL A ET AL: "Synthesis of fluorinated analogues of SJG-136 and their DNA-binding potential" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 14, no. 22, 15 November 2004 (2004-11-15), pages 5699-5702, XP004598621 ISSN: 0960-894X page 5700; compounds 6A-6C	1-10

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/000142

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FARMER J D ET AL: "SYNTHESIS AND DNA CROSSLINKING ABILITY OF A DIMERIC ANTHRAMYCIN ANALOG" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 29, no. 40, 1988, pages 5105-5108, XP000196344 ISSN: 0040-4039 page 5107; compounds (14)-(15)	1-10
X	KAMAL ET AL: "DNA binding potential and cytotoxicity of newly designed pyrrolobenzodiazepine dimers linked through a piperazine side-armed-alkane spacer" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 14, no. 2, 15 January 2006 (2006-01-15), pages 385-394, XP005202849 ISSN: 0968-0896 compounds 6a-6d	1-14, 25-41
X	WO 2005/085259 A (SPIROGEN LTD [GB]; HOWARD PHILIP WILSON [GB]; KANG GYOUNG-DONG [GB]) 15 September 2005 (2005-09-15) claim 8	1-14, 25-41
X	KUMAR R ET AL: "Design, synthesis and in vitro cytotoxic studies of novel bis-pyrrolo[2,1][1,4] benzodiazepine-pyrrole and imidazole polyamide conjugates" EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, EDITIONS SCIENTIFIQUE ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 40, no. 7, July 2005 (2005-07), pages 641-654, XP004921371 ISSN: 0223-5234 copounds 38-43	1-14, 25-41

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: -

The present claim 26 relates to an extremely large number of possible compounds. Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is to be found however for only a very small proportion of the compounds, see claim 27. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claim 26 (PCT Guidelines 9.19 and 9.23).

The search of claim 26 was restricted to those claimed compounds which appear to be supported and a generalisation of their structural formulae, compounds in claim 27.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2007/000142

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2007/000142

328

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005085250 A	15-09-2005	EP 1720880 A1	15-11-2006
WO 2005110423 A	24-11-2005	EP 1755612 A2	28-02-2007
WO 2005040170 A	06-05-2005	AU 2004284075 A1	06-05-2005
		CA 2543318 A1	06-05-2005
		EP 1675857 A2	05-07-2006
WO 2004087716 A	14-10-2004	AU 2003215810 A1	25-10-2004
		CA 2520897 A1	14-10-2004
		EP 1608663 A1	28-12-2005
WO 2005085259 A	15-09-2005	EP 1723151 A2	22-11-2006

PATENT COOPERATION TREATY PCT/IB2007/000142

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

MERLIER, Josiane
Sanofi Aventis
Département Brevets
174, avenue de France
F-75013 Paris
FRANCE

Date of mailing *(day/month/year)*
04 July 2008 (04.07.2008)

Applicant's or agent's file reference
BET06P1270

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB2007/000142

International filing date *(day/month/year)*
22 January 2007 (22.01.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
COMMERCON, Alain
13, Quai Jules Guesde
F-94400 Vitry Sur Seine
France

State of Nationality: FR
State of Residence: FR
Telephone No.:
Facsimile No.:
Teleprinter No.:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
COMMERCON, Alain
c/o Sanofi-aventis
Patent Department
174, avenue de France
F-75013 Paris
France

State of Nationality: FR
State of Residence: FR
Telephone No.:
Facsimile No.:
Teleprinter No.:

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☐ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 910 06 10

Authorized officer
Sayegh Nadine
e-mail ro.ib@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 86 79

PATENT COOPERATION TREATY PCT/IB2007/000142

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

MERLIER, Josiane
Sanofi Aventis
Département Brevets
174, avenue de France
F-75013 Paris
FRANCE

Date of mailing *(day/month/year)* 04 July 2008 (04.07.2008)	
Applicant's or agent's file reference BET06P1270	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/IB2007/000142	International filing date *(day/month/year)* 22 January 2007 (22.01.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
BOUCHARD, Hervé 13, Quai Jules Guesde F-94400 Vitry Sur Seine France	FR	FR
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
BOUCHARD, Hervé c/o Sanofi-aventis Patent Department 174, avenue de France F-75013 Paris France	FR	FR
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☐ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 910 06 10	Authorized officer Sayegh Nadine e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +41 22 338 86 79

PATENT COOPERATION TREATY PCT/IB2007/000142

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

MERLIER, Josiane
Sanofi Aventis
Département Brevets
174, avenue de France
F-75013 Paris
FRANCE

Date of mailing *(day/month/year)*
04 July 2008 (04.07.2008)

Applicant's or agent's file reference
BET06P1270

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB2007/000142

International filing date *(day/month/year)*
22 January 2007 (22.01.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
GAUZY, Laurence
13, Quai Jules Guesde
F-94400 Vitry Sur Seine
France

State of Nationality: FR
State of Residence: FR
Telephone No.:
Facsimile No.:
Teleprinter No.:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
GAUZY, Laurence
c/o Sanofi-aventis
Patent Department
174, avenue de France
F-75013 Paris
France

State of Nationality: FR
State of Residence: FR
Telephone No.:
Facsimile No.:
Teleprinter No.:

3. Further observations, if necessary:

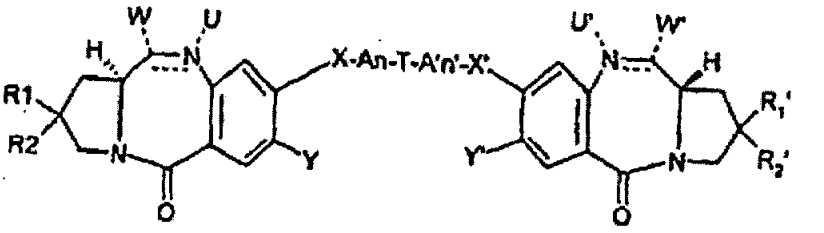
4. A copy of this notification has been sent to:

☐ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

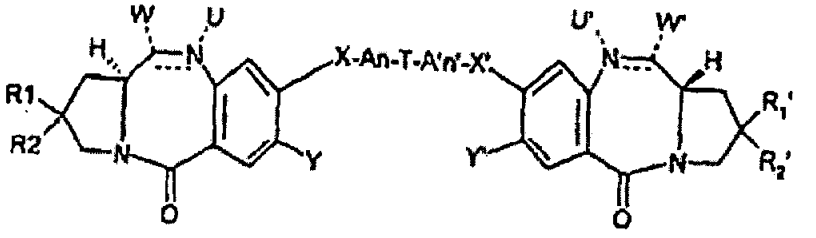
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 910 06 10

Authorized officer
Sayegh Nadine
e-mail ro.ib@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 86 79


W
U
H
N
X-An-T-A'n'-X'
U'
W'
N
H
R1
R2
N
Y
Y'
R1'
R2'
N
O
O

(I)


W
U
H
N
X-An-T-A'n'-X'
U'
W'
N
H
R1
R2
N
Y
Y'
R1'
R2'
N
O
O

(I)

vistos. Los siguientes conceptos pueden facilitarnos el análisis.

8.4.1 Las actividades y las tareas son la clave para el cálculo de recursos.

Los autores difieren en el significado que dan a los términos actividades y tareas.

En este curso denominaremos **actividad** al conjunto de acciones realizadas para generar un producto final. Para el proyectista identificar las actividades reviste especial importancia porque alrededor de ellas se pueden estimar los recursos requeridos para alcanzar el producto. En algunos casos, los proyectistas podrán administrar los recursos agrupándolos por actividades. Otras veces el mismo proyecto les exigirá descomponer las actividades en unidades más simples y fáciles de manejar. Estas unidades se denominan tareas.

*Una **tarea** es un conjunto de acciones dirigidas a generar un resultado intermedio, diferenciable como unidad de análisis al interior de un esquema más general de decisiones.* Por definición, las tareas son unidades simples de acción al interior de un proyecto. En última instancia, todos los esquemas de decisión (planes, programas y proyectos) deben terminar en la definición de tareas concretas.

Los criterios utilizados para diferenciar los resultados intermedios alrededor de los cuales se definirán las tareas, son también convencionales. Tareas muy generales pueden confundir a los operarios y los recursos requeridos para su cumplimiento suelen ser difíciles de valorar. Tareas muy cortas o específicas pueden exigir esfuerzos innecesarios en detalles triviales. Las tareas deben relacionarse entre sí de manera jerárquica (de lo general a lo particular) y de manera lógica en el tiempo. Para facilitar su gestión, el analista debe precisar, de manera adecuada, los siguientes elementos de toda tarea:

8.4.2 El nombre de la tarea.

Cada tarea debe tener un nombre, el cual suele expresarse como una acción verbal en infinitivo, seguida de su complemento directo. Ej: Diseñar el formato, Difundir información, Elaborar el informe, Coordinar la discusión, Suministrar la información, Realizar el procedimiento quirúrgico, Realizar la visita de inspección...

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

331

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-077425- -00000-0000

Fecha: 2008-07-25 16:07:00 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 331

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 52,337
FECHA : JULIO 1 DE 2008

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	2678329	01/07/2008	34,795,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL : $	501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

Cdo 14775-841-071-5

332

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-077425- -00000-0000

Fecha: 2008-07-25 16:07:00 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 331

SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [ ] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de 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 [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de 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 [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Edna Nacar

Firma Responsable

Fecha 25-07-08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

333

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
SANOFI AVENTIS

REFERENCIA	Radicación No.	8 77425
	Solicitud internacional	PCT/IB2007/000142
	Fecha inicio fase nacional	25/08/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	12158

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 26 SET. 2008
adpall