(12) **PATENT**

(19) NO (11) **341074** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl.
C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/5517 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20083427	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2007.01.22 PCT/IB2007/000142
(22)	Inng.dag	2008.08.05	(85)	Videreføringsdag	2008.08.05
(24)	Løpedag	2007.01.22	(30)	Prioritet	2006.01.25, EP, 06290154
(41)	Alm.tilgj	2008.10.14			
(45)	Meddelt	2017.08.21			

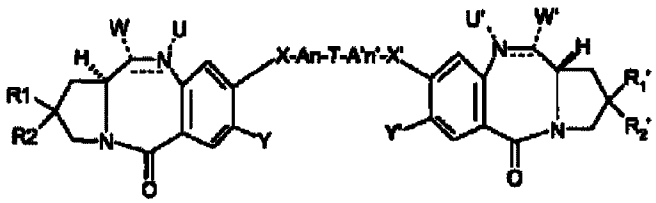
(73) Innehaver sanofi-aventis, 174, avenue de France, FR-75013 PARIS, Frankrike
(72) Oppfinner Laurence Gauzy, c/o sanofi-aventis, Patent Department, 174 avenue de France, FR-75013 PARIS, Frankrike
Robert Zhao, 128 Sidney Street, US-MA02139 CAMBRIDGE, USA
Yonghong Deng, 128 Sidney Street, US-MA02139 CAMBRIDGE, USA
Wei Li, 128 Sidney Street, US-MA02139 CAMBRIDGE, USA
Hervé Bouchard, c/o sanofi-aventis, Patent Department, 174 avenue de France, FR-75013 PARIS, Frankrike
Ravi V J Chari, 128 Sidney Street, US-MA02139 CAMBRIDGE, USA
Alain Commerçon, c/o sanofi-aventis, Patent Department, 174 avenue de France, FR-75013 PARIS, Frankrike
(74) Fullmektig Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54) Benevnelse **Cytotoksiske midler som innbefatter nye tomaymycinderivater og deres terapeutiske anvendelse**

(56) Anførte publikasjoner
WO 2005085250 A
WO 2005110423 A
WO 2005040170 A
WO 2004087716 A
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, (20060115), vol. 14, no. 2, ISSN 0968-0896, pages 385 - 394
WO 2005085259 A
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, (200507), vol. 40, no. 7, ISSN 0223-5234, pages 641 - 654

(57) Sammendrag

Foreliggende oppfinnelse angår nye tomaymycin med formel (I) derivater, deres fremgangsmåte for fremstilling og deres terapeutiske anvendelser.



Foreliggende oppfinnelse angår nye cytotoksiske midler og deres terapeutiske anvendelse. Mer spesifikt angår oppfinnelsen nye cytotoksiske midler som innbefatter tomaymycinderivater og deres terapeutiske anvendelse. Disse nye cytotoksiske midlene har en terapeutisk anvendelse som et resultat av levering av tomaymycinderivatene til en spesifikk cellepopulasjon på en målrettet måte ved kjemisk binding av tomaymycinderivatet til et cellebindende middel.

Mange rapporter har fremkommet når det gjelder forsøk på spesifikk måleretting av tumorceller med monoklonale antistoff-legemiddelkonjugater (Sela et al, i Immuno-conjugates, 189-216 (C. Vogel, red. 1987); Ghose et al, i Targeted Drugs 1-22 (E. Goldberg, red. 1983); Diener et al, i Antibody mediated delivery systems, 1-23 (J. Rodwell, red. 1988); Pietersz et al, i Antibody mediated delivery systems, 25-53 (J. Rodwell, red. 1988); Bumol et al, i Antibody mediated delivery systems, 55-79 (J. Rodwell, red. 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, i Anticancer Agents, Frontiers in Cancer Chemotherapy, 317-338, ACS Symposium Series 796; og I. Ojima et al red., American Chemical Society 2001). Alle referansene og patentene sitert heri er innbefattet med referanse.

Cytotoksiske legemidler slik som metotreksat, daunorubicin, doksorubicin, vinkristin, vinblastin, melfalan, mitomycin C og klorambucil har blitt konjugert til et antall murin-monoklonale antistoffer. I noen tilfeller ble legemiddelmolekylene bundet til antistoffmolekylene gjennom et intermediært bærermolekyl slik som serumalbumin (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)), dekstran (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)), eller polyglutamsyre (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)).

Et bredt spekter av bindingsgruppeteknologier har blitt anvendt for fremstilling av slike immunokonjugater og både spaltbare og ikke-spaltbare bindingsgrupper har blitt undersøkt. I mange tilfeller kan det fulle cytotoksiske potensialet til legemidlene kun observeres hvis legemiddelmolekylene kan frigis fra konjugatene i ikke-modifisert form ved målsetet.

En av de spaltbare bindingsgruppene som har blitt anvendt for fremstilling av antistoff-legemiddelkonjugater er en syrelabil bindingsgruppe basert på cis-akonitsyre som har fordelen av det sure miljøet i forskjellige intracellulære deler slik som endosomene som presses på i løpet av reseptormediert endocytose og lysosomer. Shen og Ryser introduserte denne fremgangsmåten for fremstilling av konjugater av daunorubicin med makromolekylære bærere (102 Biochem. Biophys. Res. Commun., 1048-1054 (1981)). Yang og Reisfeld anvendte samme teknikk for å konjugere daunorubicin til et anti-melanom antistoff (80, J. Natl. Canc. Inst., 1154-1159 (1988)). Dillman et al. anvendte også en syrelabil bindingsgruppe på samme måte for fremstilling av konjugater av daunorubicin med et anti-T-celle antistoff (48 Cancer Res., 6097-6102 (1988)).

En alternativ tilnærming, anvendt av Trouet et al., involverte binding av daunorubicin til et antistoff via en peptid-mellomromsarm (79 Proc. Natl. Acad. Sci., 626-629 (1982)). Dette ble gjort under forutsetning at det frie legemiddelet kan frigis fra et slikt konjugat ved virkningen til lysosomale peptidaser.

In vitro-cytotoksiske tester har imidlertid avdekket at antistoff-legemiddelkonjugater sjelden oppnår samme cytotoksiske potensiale som de frie ikke-konjugerte legemidlene. Dette viser at mekanismene hvorved legemiddelmolekyler frigis fra antistoffene kan være svært ineffektive. Innenfor området immunotoksiner har konjugater dannet via disulfidbroer mellom monoklonale antistoffer og katalytisk aktive proteintoksiner vist seg å være mer cytotoksiske enn konjugater som inneholder andre bindingsgrupper. Se Lambert et al, 260 J. Biol. Chem. 12035-12041 (1985); Lambert et al, i Immunotoxins 175-209 (A. Frankel, ed. 1988); Ghetie et al, 48, Cancer Res. 2610-2617 (1988). Dette skyldes den høye intracellulære konsentrasjonen av glutation som bidrar til den effektive spaltingen av disulfidbindingen mellom et antistoffmolekyl og et toksin. Til tross for dette, er det kun noen få rapporterte eksempler på anvendelsen av disulfidbroer for fremstilling av konjugater mellom legemidler og makromolekyler. Shen et al. (260, J. Biol. Chem., 10905-10908 (1985)) beskriver omdanning av metotreksat til et merkaptoetylamidderivat fulgt av konjugering med poly-D-lysin via en disulfidbinding. En annen rapport beskriver fremstilling av et konjugat av trisulfidet som inneholder toksinlegemiddelet kalicheamycin med et antistoff (Hinman et al., 53, Cancer Res., 3336-3342 (1993)).

En grunn til mangel på disulfidbundne antistoff-legemiddelkonjugater er problemer for cytotoksiske legemidler med å fremvise en svovelatominneholdende bestanddel som lett kan anvendes for å binde legemiddelet til et antistoff via en disulfidbinding. Videre er

kjemisk modifikasjon av eksisterende legemidler vanskelig uten å redusere deres toksiske potensiale.

En annen viktig ulempe med de eksisterende antistoff-legemiddelkonjugatene er deres problemer med å levere en tilstrekkelig konsentrasjon av legemiddel til målsetet på grunn av det begrensede antallet målrettende antigener og den relativt moderate cytotoksisiteten til cancerostatiske legemidler som metotreksat, daunorubicin og vinkristin. For å oppnå signifikant cytotoksisitet er binding av et stort antall legemiddelmolekyler, enten direkte til antistoffet eller gjennom et polymerisk bærermolekyl, nødvendig. Imidlertid fremviser slike tungt modifiserte antistoffer svekket binding til målantigenet og rask in vivo-klarering fra blodstrømmen.

Til tross for de ovenfor beskrevne problemene, har anvendelige cytotoksiske legemidler som innbefatter cellebindende bestanddeler og gruppen av cytotoksiske legemidler kjente som maytansinoider blitt rapportert (USP 5 208 020, USP 5 416 064 og R.V.J. Chari, 31, Advanced Drug Delivery Reviews, 89-104 (1998)). Tilsvarende har anvendelige cytotoksiske midler som innbefatter cellebindende bestanddeler og analoger og derivater av det potente antitumor-antibiotiske middelet CC-1065 også blitt rapportert (USP 5 475 092, USP 5 585 499 og USP 6 756 397).

Tomaymycinderivater er pyrrolo[1,4]benzodiazepiner (PBDer), en kjent klasse av forbindelser som fremviser deres biologiske egenskaper ved kovalent binding til N2 til guaninet i den mindre fordypningen i DNA. PBDer inkluderer et antall mindre fordypning bindemidler slik som antramycin, neotramycin og DC-81. Tomaymycin antitumoraktivitet er imidlertid begrenset på grunn av dens ikke-spesifikke toksisitet ovenfor normale celler. Således er det et behov for å øke den terapeutiske aktiviteten og redusere de spesifikke toksiske effektene til tomaymycinforbindelser. Foreliggende oppfinnelse har vist at dette behovet kan bemøtes ved målrettet levering av tomaymycinforbindelser ved å binde dem til cellebindende midler. I tillegg er det et behov for å utvikle tomaymycinderivater som er løselige og stabile i vandige løsninger. Videre er tomaymycin ikke tilstrekkelig potent til å bli anvendt i konjugater til cellebindende midler.

Nylig har noen få nye PBD-derivater og deres anti-tumoraktivitet i prekliniske modeller blitt beskrevet (WO 00/12508 og WO 2005/085260).

WO 2005/085250 beskriver PBD derivater bundet via heteroalkyl-heteroarylkjeder.

WO 2005/110423 angir PBD derivater bundet ved en alkylengruppe, som kan være avbrutt av heteroatomer og/eller aromatiske ringer.

WO 2005/040170 viser PBD derivater bundet ved aalkyl, alkenyl eller alkynylgrupper som eventuelt inneholder et heteroatom eller en karbonylgruppe.

WO 2004/087716 beskriver PBD derivater bundet ved en piperazinbasert kjede.

WO 2005/085259 vedrører PBD derivater bundet ved en alkylengruppe, som kan være avbrutt av heteroatomer og/eller aromatiske ringer.

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, (20060115), vol. 14, nr. 2, ISSN 0968-0896, side 385 – 394, angir pyrrolobenzodiazepindimere bundet gjennom en piperazin sidearmet alkan spacer.

Kumar R. et al., "Design, synthesis and in vitro cytotoxic studies of novel bispyrrolo[2,1][1,4] benzodiazepine-pyrrole and imidazole polyamide conjugates", European Journal of Medicinal Chemistry, Editions Scientifique, Elsevier, Paris, FR, (200507), vol. 40, nr. 7, ISSN 0223-5234, side 641 – 654, beskriver bis-pyrrolo[2,1][1,4]benzodiazepin-pyrrol og imidazol polyamid konjugater.

Imidlertid indikerer initielle kliniske forsøk på mennesker at forbindelsene i denne klassen er alvorlig toksiske, basert på den svært lave dosen som kan administreres til mennesker (I. Puzanov, Proc. AACR-NCI_EORTC International Conference, Philadelphia, USA 2005, Sammendrag #B117). Således er det ønskelig å tilveiebringe alternative derivater som er mer potente og/eller kan bindes til cellebindende midler.

Følgelig er en fremgangsmåte for behandling av sykdommer med tomaymycinderivater, hvori deres bivirkninger er redusert uten å kompromittere deres cytotoksisitet sterkt nødvendig.

Slik det er beskrevet i en første utførelsesform, er en gjenstand for foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe tomaymycinderivater som er svært toksiske og fremdeles kan effektivt anvendes ved behandling av mange sykdommer.

Et annet formål med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe nye tomaymycinderivater, som eventuelt kan bindes til eller er bundet til et cellebindende middel.

I et andre utførelsesform tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en terapeutisk sammensetning som innbefatter:

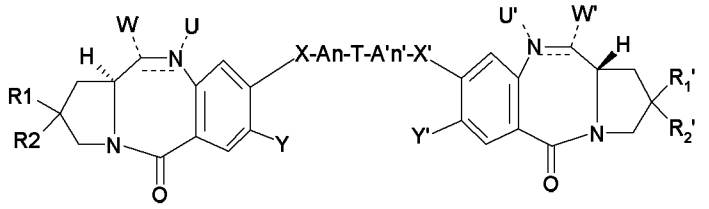
(A) en effektiv mengde av et eller flere tomaymycinderivater eventuelt bindbare eller bundet til et cellebindende middel, og

(B) en farmasøytisk akseptabel bærer, fortynningsmiddel eller eksipient.

Foreliggende oppfinnelse er basert på syntesen av nye tomaymycinderivater som har høy cytotoksisitet og som kan effektivt bindes til cellebindende midler. Det har tidligere blitt vist at bindingen av svært cytotoksiske legemidler til antistoffer ved anvendelse av en spaltbar binding, slik som en disulfidbinding, muliggjør frigivelse av fult aktive legemidler inn i cellen, og slike konjugater er cytotoksiske på en antigenspesifikk måte (US 6 340 701, US 6 372 738, US 6 436 931). Imidlertid har litteraturen avdekket at det er ekstremt vanskelig å modifisere eksisterende legemidler uten å redusere deres cytotoksiske potensiale. Foreliggende oppfinnelse overkommer dette problemet ved å modifisere de beskrevne tomaymycinderivatene med kjemiske bestanddeler. Som et resultat opprettholder de beskrevne nye tomaymycinderivatene, og i noen tilfeller til og med øker det cytotoksiske potensialet til tomaymycinderivatene. De cellebindende middel-tomaymycinderivatkompleksene muliggjør fullt ut den cytotoksiske virkningen til tomaymycinderivatene og ble anvendt på en målrettet måten ovenfor kun uønskede celler, som derved unngår bivirkninger på grunn av skade på friske celler som det ikke målrettes mot. Således tilveiebringer foreliggende oppfinnelse anvendelige midler for eliminering av syke eller abnormale celler som skal avlives eller lyseres, slik som tumorceller (særlig faste tumorceller).

Det cytotoksiske middelet ifølge oppfinnelsen innbefatter et eller flere tomaymycinderivater, eventuelt bindbare eller bundet til et cellebindende middel via en bindingsggruppe. Bindingsgruppen er en del av en kjemisk bestanddel som er kovalent bundet til et tomaymycinderivat gjennom vanlige fremgangsmåter. I en foretrukket utførelsesform kan den kjemiske bestanddelen bli kovalent bundet til tomaymycinderivatet via en disulfidbinding.

Tomaymycinderivatene kan ha formel (I) vist nedenfor:



(I)

hvori

------ representerer en eventuell enkeltbinding;

_____ representerer enten en enkeltbinding eller en dobbeltbinding;

forutsatt at når _____ representerer en enkeltbinding, representerer U og U', like eller forskjellige, uavhengig H og W og W', like eller forskjellige, er uavhengig valgt fra gruppen som består av OH, en eter slik som –OR, en ester (for eksempel et acetat), slik som –OCOR, et karbonat slik som –OCOOR, et karbamat slik som –OCONRR', et syklisk karbamat slik at N10 og C11 er en del av sykelen, et urea slik som –NRCONRR', et tiokarbamat slik som –OCSNHR, et syklisk tiokarbamat slik at N10 og C11 er en del av sykelen, -SH, et sulfid slik som –SR, et sulfoksid slik som –SOR, et sulfon slik som –SOR, et sulfonat slik som $–SO_3^-$, et sulfonamid slik som –NRSOOR, et amin slik som –NRR', eventuelt syklisk amin slik at N10 og C11 er en del av sykelen, et hydroksylaminderivat slik som –NROR', et amid slik som –NRCOR, et azido slik som $–N_3$, et cyano, et halo, et trialkyl eller triarylfosfonium, en aminosyreavledet gruppe; foretrukket er W og W' like eller forskjellige og med OH, OMe, Oet, $NHCONH_2$, SMe;

og når _____ representerer en binding, er U og U' fraværende og W og W' representerer H;

- R1, R2, R1', R2' er like eller forskjellige og uavhengig valgt fra halid eller alkyl eventuelt substituert med en eller flere Hal, CN, NRR', CF_3, OR, aryl, Het, $S(O)_qR$, eller R1 og R2 og R1' og R2' danner sammen en dobbeltbinding som inneholder gruppe =B og =B', respektivt.

Foretrukket danner R1 og R2 og R1' og R2' sammen en dobbeltbinding som inneholder gruppe =B og =B', respektivt.

- B og B' er like eller forskjellige og uavhengig valgt fra alkenyl, værende eventuelt substituert med en eller flere Hal, CN, NRR', CF_3, OR, aryl, Het, $S(O)_qR$ eller B og B' representerer et oksygenatom.

Foretrukket gjelder B=B'.
Mer foretrukket gjelder B=B'= $=CH_2$ eller $=CH\text{-}CH_3$,

- X, X' er like eller forskjellige og uavhengig valgt fra en eller flere –O-, -NR-, -(C=O)-, $-S(O)_q-$.

Foretrukket gjelder X=X'.
Mer foretrukket gjelder X=X'=O.

- A, A' er like eller forskjellige og uavhengig valgt fra alkyl eller alkenyl som eventuelt inneholder et oksygen, et nitrogen eller et svovelatom, hver værende eventuelt substituert med en eller flere Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$, aryl, Het, alkyl, alkenyl.

Foretrukket gjelder A=A'.
Mer foretrukket gjelder A=A'=lineær usubstituert alkyl.

- Y, Y' er like eller forskjellige og er uavhengig valgt fra H, OH.

Foretrukket gjelder Y=Y'.
Mer foretrukket gjelder Y=Y'=Oalkyl, mer foretrukket Ometyl.

- T er –NR-, -O-, $-S(O)_q-$, eller et 4 til 10-leddet aryl, sykloalkyl, heterosyklisk eller heteroaryl, hver værende eventuelt substituert med en eller flere Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$ og/eller bindingsgrupper eller et forgrenet alkyl, eventuelt substituert med en eller flere Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$ og/eller bindingsgrupper, eller et lineært alkyl substituert med en eller flere Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$ og/eller bindingsgrupper.

Foretrukket er T et 4 til 10-leddet aryl eller heteroaryl, mer foretrukket fenyl eller pyridyl, eventuelt substituert med en eller flere bindingsgrupper.

Nevnte bindingsgruppe innbefatter en bindingsgruppe. Egnede bindingsgrupper er godt kjente i litteraturen og inkluderer tiol, sulfid eller disulfidgrupper, tioetergrupper, syrelabile grupper, fotolabile grupper, peptidaselabile grupper og esteraselabile grupper. Foretrukket er disulfidgrupper og tioetergrupper.

Når bindingsgruppen er en tiol-, sulfid (eller såkalt tioeter –S-) eller disulfid (-S-S-) inneholdende gruppe, kan sidekjeden som bærer tiol, sulfid eller disulfidgruppen være lineær eller forgrenet, aromatisk eller heterosyklisk. Fagmannen kan lett identifisere egnede sidekjeder.

Foretrukket har nevnte bindingsgruppe formelen:

-G-D-(Z)p-S-Z'

hvori

G er en enkel eller dobbel binding, -O-, -S- eller –NR-;

D er en enkelbinding eller –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-;

hvor E og F er like eller forskjellige og er uavhengig valgt fra lineær eller forgrenet $-(OCH_2CH_2)_iAlkyl(OCH_2CH_2)_j-$, $-Alkyl(OCH_2CH_2)_i-Alkyl-$, $-(OCH_2CH_2)_i-$, $-(OCH_2CH_2)_iSykloalkyl(OCH_2CH_2)_j-$, $-(OCH_2CH_2)_iHeterosyklisk(OCH_2CH_2)_j-$, $-(OCH_2CH_2)_iAryl(OCH_2CH_2)_j-$, $-(OCH_2CH_2)_iHeteroaryl(OCH_2CH_2)_j-$, $-Alkyl-(OCH_2CH_2)_iAlkyl(OCH_2CH_2)_j-$, $-Alkyl-(OCH_2CH_2)_i-$, $-Alkyl-(OCH_2CH_2)_iSykloalkyl(OCH_2CH_2)_j-$, $-Alkyl(OCH_2CH_2)_iHeterosyklisk(OCH_2CH_2)_j-$, $-Alkyl-(OCH_2CH_2)_iAryl(OCH_2CH_2)_j-$, $-Alkyl(OCH_2CH_2)_iHeteroaryl(OCH_2CH_2)_j-$, -Sykloalkyl-Alkyl-, -Alkyl-Sykloalkyl-, -Heterosyklisk-Alkyl-, -Alkyl-Heterosyklisk-, -Alkyl-Aryl-, -Aryl-Alkyl-, -Alkyl-Heteroaryl- , -Heteroaryl-Alkyl-;

hvor i og j, identiske eller forskjellige, er heltall og uavhengig valgt fra 0, 1 til 2000;

Z er lineær eller forgrenet –Alkyl-;

p er 0 eller 1;

Z' representerer H, en tiolbeskyttende gruppe sliksom COÆR, R_{20} eller SR_{20}, hvori R_{20} representerer H, metyl, alkyl, eventuelt substituert sykloalkyl, aryl, heteroaryl eller heterosyklisk, forutsatt at når Z' er H, er nevnte forbindelse i likevekt med den korresponderende forbindelsen dannet ved intramolekylær syklisering som kommer som resultat av tilsetting av tiolgruppen –SH på iminbindingen –NH= til en av PBD-bestanddelene.

- n, n' er like eller forskjellige 0 eller 1.
- q er 0, 1 eller 2.
- R, R' er like eller forskjellige og uavhengig valgt fra H, alkyl, aryl, hvor hver eventuelt er substituert med Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, aryl, Het;

eller deres farmasøytisk akseptable salter, hydrater eller hydratiserte salter, eller de polymorfe, krystallinske strukturene til disse forbindelsene eller deres optiske isomerer, racemater, diastereomerer eller enantiomerer.

Tomaymycinderivatene med formel (I) kan ha de følgende radikalene eller hvilken som helst kombinasjon av en hvilken som helst av dem:

- G er en enkeltbinding eller –O- eller –NR-;
- G er –O-;
- D er en enkeltbinding eller –E-, -E-NR-CO-, -ECO-, -CO-E-;
- D er –E-, -E-NR-CO-;
- E er lineær eller forgrenet –Alkyl-, $-(OCH_2CH_2)_i-$ eller –Alkyl-heterosyklisk;

- E er lineær eller forgrenet –Alkyl-;

- Z er $-(CH_2)_2-C(CH_3)_2-$;

- p er 0 eller 1;

- Z' er H eller SO_{20}, hvori R_{20} representerer alkyl, aryl, heterosyklisk eller heteroaryl;

- Z' er H eller SR_{20}, hvori R_{20} representerer alkyl.

Spesifikke eksempler på tiol-, sulfid- eller disulfidinneholdende bindingsgrupper inkluderer

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_y(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_y\ SZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t(OCO)(R_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t(CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t(CONR_{19})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-furyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t$-oksazolyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t$-tienyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t$-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-metylpiperazin--$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-furyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-oksazolyl-QSZ',
$-(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-thienyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolyl-QSZ',
$-(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-QSZ',
$-(CR_{13}R_{14})_t$-N-metylpiperazino-QSZ', eller

$-O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-O(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-O(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-O-fenyl-QSZ', -O-furyl-QSZ', -O-oksazolyl-QSZ', -O-tiazolyl-QSZ',
-O-tienyl-QSZ', -O-imidazolyl-QSZ', -O-morfolino-QSZ', -O-piperazino-QSZ',
-O-N-metylpiperazino-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-fenyl-QSZ', -OCO-furyl-QSZ', -OCO-oksazolyl-QSZ', -OCO-tiazolyl-QSZ', -OCO-tienyl-QSZ', -OCO-imidazolyl-QSZ', -OCO-morfolino-QSZ', -OCO-piperazino-QSZ', -OCO-N-metylpiperazino-QSZ', eller

$-CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_y\ SZ'$,
$-CO-(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-CO-fenyl-QSZ', -CO-furyl-QSZ', -CO-oksazolyl-QSZ', -CO-tiazolyl-QSZ', -CO-tienyl-QSZ', -CO-imidazolyl-QSZ', -CO-morfolino-QSZ', -CO-piperazino-QSZ', -CO-piperidino-QSZ', -CO-N-metylpiperazino-QSZ',

$-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO\ NR_{12}\ (CR_{13}R_{14})_t\ (CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t\ (OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-NR_{19}CO$-fenyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-furyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-oksazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-tiazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-tienyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-imidazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO$-morfolino-QSZ', $-NR_{19}CO$-piperazino-QSZ', $-NR_{19}CO$-piperidino-QSZ', $-NR_{19}CO$-N-metylpiperazino-QSZ', $-NR_{19}$-fenyl-QSZ', $-NR_{19}$-furyl-QSZ', $-NR_{19}$-oksazolyl-QSZ', $-NR_{19}$-tiazolyl-QSZ', $-NR_{19}$-tienyl-QSZ', $-NR_{19}$-imidazolyl-QSZ', $-NR_{19}$-morfolino-QSZ', $-NR_{19}$-piperazino-QSZ', $-NR_{19}$-piperidino-QSZ', $-NR_{19}$-N-metylpiperazino-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-fenyl-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-oksazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-tiazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-tienyl-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', og -SCO-N-metylpiperazino-QSZ', hvori:

Z' er H, en tiolbeskyttende gruppe slik som COR, R_{20}' eller SR_{20}', hvori R_{20}' representerer H, alkyl, aryl, heterosyklisk eller heteroaryl,

hvori Q er en direkte binding eller et lineært alkyl eller forgrenet alkyl som har fra 1-10 karbonatomer eller en polyetylenglykol mellomgruppe med 2 til 20 repeterende etylenoksyenheter;

R_{19} og R_{12} er like eller forskjellige og er lineær alkyl, forgrenet alkyl eller syklisk alkyl som har fra 1 til 4 karbonatomer, eller enkel eller substituert aryl eller heterosyklisk, og R_{12} kan i tillegg være H,

R_{13}, R_{14}, R_{15} og R_{16} er like eller forskjellige og er H eller et lineært eller forgrenet alkyl som har fra 1 til 4 karbonatomer,

R_{17} og R_{18} er H eller alkyl,

u er et heltall fra 1 til 10 og kan også være 0,

t er et heltall fra 1 til 10 og kan også være 0,

y er et heltall fra 1 til 20 og kan også være 0.

Når forbindelse med formel (I) er i form av et ion (f.eks. sulfonat), kan motionet være tilstede (f.eks. Na^+ eller K^+).

Tomaymycinderivatene kan være de med formel (I), hvor T = aryl eventuelt substituert med en eller flere Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$ og/eller bindingsgrupper, og A, A', X, X', U, U', W, W', m, m', n, n', -----, ----- er definert som ovenfor.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er valgt fra gruppen som består av:

8,8'-[4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropyloksy)-2,6-pyridindiylbis-(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[5-(3-aminopropyloksy)-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[5-(N-metyl-3-tert-butoksykarbonylaminopropyl)-1,3-benzendiylbis-(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-{5-[3-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)propyloksy]-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)}-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[5-acetyltiometyl-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-metylen-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[5-(N-4-merkapto-4,4-dimetylbutanoyl)amino-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[5-(N-4-metylditio-4,4-dimetylbutanoyl)-amino-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[5-(N-metyl-N-(2-merkapto-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-benzendiyl(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[5-(N-metyl-N-(2-metylditio-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-benzendiyl(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(2-(4-merkapto-4-metyl)-pentanamidoetoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(1-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(4-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidobutoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(3-[4-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(1-(3-[4-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(3-[metyl-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

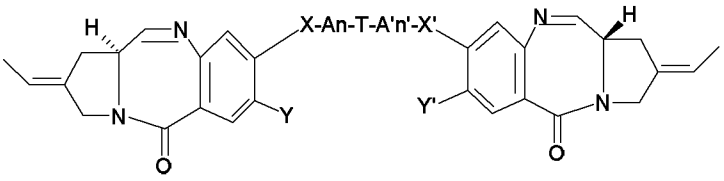
8,8'-[(4-(3-[metyl-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(1-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamido)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

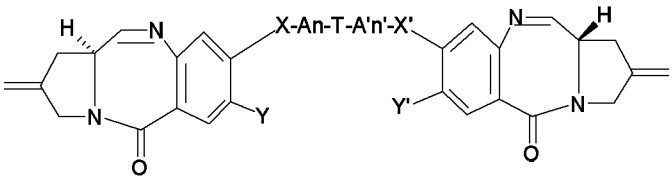
så vel som de korresponderende merkaptoderivatene,

eller deres farmasøytisk akseptable salter, hydrater eller hydratiserte salter, eller de polymorfe krystallstrukturene til disse forbindelsene eller deres optiske isomerer, racemater, diastereomerer eller enantiomerer.

Tomaymycinderivatene kan ha formelen:



eller



hvor X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' er som definert ovenfor.

Slik det anvendes ovenfor og i det følgende gjelder:

Alk representerer alkyl, alken eller alkyn.

"Alkyl" betyr en alifatisk hydrokarbongruppe som kan være rettkjedet eller forgrenet som har 1 til 20 karbonatomer i kjeden, eller syklisk som har 3 til 10 karbonatomer. Foretrukne alkylgrupper har 1 til 12 karbonatomer i kjeden. "Forgrenet" betyr at en eller flere lavere alkylgrupper slik som metyl, etyl eller propyl er bundet til en lineær alkylkjede. Eksempler på alkylgrupper inkluderer metyl, etyl, n-propyl, i-propyl, n-butyl, t-butyl, n-pentyl, 3-pentyl, oktyl, nonyl, decyl, syklopentyl og sykloheksyl.

"Alken" betyr en alifatisk hydrokarbongruppe som inneholder en karbon-karbon dobbeltbinding og som kan være rettkjedet eller forgrenet som har 2 til 15 karbonatomer i kjeden. Foretrukne alkenylgrupper har 2 til 12 karbonatomer i kjeden; og mer foretrukket ca. 2 til 4 karbonatomer i kjeden. Eksempler på alkenylgrupper inkluderer etenyl, propenyl, n-butenyl, i-butenyl, 3-metylbut-2-enyl, n-pentenyl, heptenyl, oktenyl, nonenyl, decenyl.

"Alkyn" betyr en alifatisk hydrokarbongruppe som inneholder en karbon-karbon trippelbinding og som kan være rettkjedet eller forgrenet som har 2 til 15 karbonatomer i kjeden. Foretrukne alkynylgrupper har 2 til 12 karbonatomer i kjeden; og mer foretrukket 2 til 4 karbonatomer i kjeden. Eksempler på alkynylgrupper inkluderer etynyl, propynyl, n-butynyl, 2-butynyl, 3-metylbutynyl, n-pentynyl, heptynyl, oktynyl og decynyl.

"Halogenatom" refererer til et fluor-, klor-, brom- eller jodatom; foretrukket fluor- og kloratom.

"Aryl" betyr et aromatisk, monosyklisk eller multisyklisk hydrokarbonringsystem med 6 til 14 karbonatomer, foretrukket 6 til 10 karbonatomer. Eksmepler på arylgrupper inkluderer fenyl eller naftyl.

"Het" betyr heterosykel eller heteroaryl.

Slik det anvendes heri, refererer begrepene "heterosykel" eller "heterosyklisk" til delvis umettede eller umettede, ikke-aromatiske stabile 3 til 14, foretrukket 5 til 10 leddede mono-, bi eller multisykliske ringer hvori minst et ledd i ringen er et heteroatom. Typiske heteroatomer inkluderer, men er ikke begrenset til, oksygen, nitrogen, svovel, selen og fosforatomer. Foretrukne heteroatomer er oksygen, nitrogen og svovel.

Egnede heterosykler er også beskrevet i "The Handbook of Chemistry and Physics", 76. utgave, CRC Press, Inc., 1995-1996, s. 2-25 til 2-26, hvor beskrivelsen av denne er innbefattet heri ved referanse.

Foretrukne ikke-aromatiske heterosykliske forbindelser inkluderer, men er ikke begrenset til, pyridinyl, pyrazolidinyl, imidazolidinyl, oksiranyl, tetrahydrofuranyl, dioksolanyl, tetrahydropyranyl, dioksanyl, dioksolanyl, piperidyl, piperazinyl,

morfolinyl, pyranyl, imidazolinyl, pyrrolinyl, pyrazolinyl, tiazolidinyl, tetrahydrotiopyranyl, ditianyl, tiomorfolinyl, dihydropyranyl, tetrahydropyranyl, dihydropyranyl, tetrahydropyridyl, dihydropyridyl, tetrahydropyridinyl, dihydrotiopyranyl, azepanyl, så vel som de sammensmeltede systemene som kommer som resultat av kondensasjonen med en fenylgruppe.

Slik det anvendes heri refererer begrepet "heteroaryl" eller aromatiske heterosykler til en 5 til 14, foretrukket 5 til 10, leddet, aromatisk hetero-, mono-, bi- eller multisyklisk ring. Eksempler inkluderer pyrrolyl, pyridyl, pyrazolyl, tienyl, pyrimidinyl, pyrazinyl, tetrazolyl, indolyl, kinolinyl, purinyl, imidazolyl, tienyl, tiazolyl, benzotiazolyl, furanyl, benzofuranyl, 1,2,4-tiadiazolyl, isotiazolyl, triazolyl, tetrazolyl, isokinolyl, benzotienyl, isobenzofuryl, pyrazolyl, karbazolyl, benzimidazolyl, isoksazolyl, pyridyl-N-oksid, så vel som de sammensmeltede systemene som kommer som resultat av kondensasjonen med en fenylgruppe.

"Alkyl", "sykloalkyl", "alkenyl", "alkynyl", "aryl", "heteroaryl", "heterosykel" og lignende refererer også til de korresponderende "alkylen", "sykloalkylen", "alkenylen", "alkynylen", "arylen", "heteroarylen", "heterosyklen" og lignende som dannes ved fjerning av to hydrogenatomer.

Slik det anvendes heri referer uttrykket "bindbar til et cellebindende middel" til tomaymycinderivater som innbefatter minst en bindingsgruppe, eller en forløper derav, egnet for å binde nevnte derivater til et cellebindende middel; foretrukket bindende grupper er tiol, sulfid eller disulfidbindinger, eller forløpere derav.
Slik det anvendes heri, refererer uttrykket "bundet til et cellebindende middel" til konjugatmolekylet som innbefatter minst et tomaymycinderivat bundet til et cellebindende middel via en passende bindingsgruppe, eller en forløper derav; foretrukne bindingsgrupper er tiol eller disulfidbindinger, eller forløpere derav.

Slik det anvendes heri, refererer "forløper" til en gitt gruppe til en hvilken som helst gruppe som kan føre til den gruppen ved en hvilken som helst avbeskyttelse, kjemisk modifikasjon eller koblingsreaksjon.

Slik det anvendes heri refererer begrepet "pasient" til enten et dyr, slik som et verdifult dyr for oppaling, ledsager eller konserveringsformål, eller foretrukket et menneske eller menneskebarn, som er berørt av eller har potensialet for å bli berørt av en eller flere sykdommer eller tilstander beskrevet heri.

Slik det anvendes heri refererer en "terapeutisk effektiv mengde" til en mengde av en forbindelse ifølge oppfinnelsen som er effektiv til å hindre, redusere, eliminere, behandle eller kontrollere symptomene på de heri beskrevne sykdommene og tilstandene. Begrepet "kontrollere" er tiltenkt å referere til alle prosessene hvori det kan være en reaksjon av hastighetene, avbryting, arrestering eller stopping av progresjonen av sykdommen eller tilstandene beskrevet heri, men som nødvendigvis ikke indikerer en total eliminering av alle sykdoms- og tilstandssymptomene, og er tiltenkt å inkludere profylaktisk behandling.

Slik det anvendes heri, refererer begrepet "farmasøytisk akseptabel" til de forbindelsene, materialene, eksipientene, sammensetningene eller doseringsformene som er, innenfor omfanget av rimelig medisinsk vurdering, egnet for kontakt med vev til mennesker og dyr uten overdrevet toksisitet, irritasjon, allergisk respons eller andre problemkomplikasjoner med hensyn til et rimelig fordel/risikoforhold.

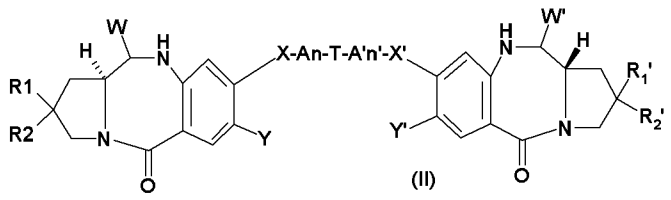
Slik det anvendes heri, refererer "farmasøytisk akseptable salter" til derivater av de beskrevne forbindelsene hvori morforbindelsen modifiseres ved fremstilling av syre- eller basesalter derav. De farmasøytisk akseptable saltene inkluderer vanlige ikke-toksiske salter eller kvaternære ammoniumsalter av morforbindelsen som dannes, for eksempel fra ikke-toksiske uorganiske eller organiske syrer. For eksempel inkluderer slike vanlige ikke-toksiske salter de som er avledet fra uorganiske syrer slik som saltsyre, hydrobromsyre, svovelsyre, sulfamsyre, fosforsyre, salpetersyre og lignende; og saltene fremstilt fra organiske syrer slik som eddiksyre, propionsyre, ravsyre, vinsyre, sitronsyre, metansulfonsyre, benzensulfonsyre, glukuronsyre, glutamsyre, benzosyre, salisylsyre, toluensulfonsyre, oksalsyre, fumarsyre, maleinsyre, melkesyre og lignende. Andre addissjonsalter inkluderer ammoniumsalter slik som trometamin, meglumin, epolamin, etc., metallsalter slik som natrium, kalium, kalsium, sink eller magnesium.

De farmasøytisk akseptable saltene ifølge oppfinnelsen kan syntetiseres fra morforbindelsen som inneholder en basisk eller sur bestanddel ved vanlige kjemiske fremgangsmåter. Generelt kan slike salter fremstilles ved omsetting av de frie syre- eller baseformene av disse forbindelsene med en støkiometrisk mengde av et passende syre eller base i vann, eller i et organisk løsemiddel, eller i en blanding av de to. Generelt er ikke-vandig media som eter, etylacetat, etanol, isopropanol eller acetonitril foretrukket. Lister over egnede salter finnes i Remington's Pharmaceutical Sciences,

17. utgave, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, s. 1418, hvor beskrivelsen av denne er innbefattet heri med referanse.

N-10, C-11 dobbeltbindingen tomaymycinderivatene med formel (I) er kjent for lett å være konverterbar på en reversibel måte i korresponderende iminaddukter under nærvær av vann, en alkohol, en tiol, et primært eller sekundært amin, urea eller andre nukleofiler. Denne prosessen er reversibel og kan lett regenerere de korresponderende tomaymycinderivatene under nærvær av et dehydrerende middel, et ikke-protisk organisk løsemiddel, i vakuum eller ved høye temperaturer (Z- Tozuka, 36, J. Antibiotics, 276 (1983)).

Det er også beskrevet reversible derivater av tomaymycinderivater med generell formel (II):



(II)

hvori A, X, Y, N, T, A', X', Y', n', R1, R2, R1', R2' er definert som i formel (I), og W, W' er like eller forskjellige og er valgt fra gruppen som består av OH, en eter slik som –OR, en ester (for eksempel et acetat), slik som –OCOR, -COOR, et karbonat slik som –OCONRR', et syklisk karbamat, slik at N10 og C11 er en del av sykelet, et urea slik som –NRCONRR', et tiokarbamat slik som –OCSNHR, et syklisk tiokarbamat slik at N10 og C11 er en del av syklusen, -SH, et sulfid slik som –SR, et sulfoksid som –SOR, et sulfon som –SOOR, et sulfonat slik som $-SO_3^-$, et sulfonamid slik som –NRSOOR, et amin slik som –NRR', eventuelt syklisk amin slik at N10 og C11 er en del av syklusen, et hydroksylaminderivat slik som –NROR', et amid slik som –NRCOR, -NRCONRR', et azido slik som $-N_3$, et cyano, et halo, et trialkyl eller triarylfosfonium, en aminosyreavledet gruppe. Foretrukket er W og W' like eller forskjellige OH, OMe, Oet, $NHCONH_2$, SME.

Forbindelser med formel (II) kan således også være som solvater, som inkluderer vann når løsemiddelet er vann; hvor disse solvatene kan være særlig anvendelige.

Fremgangsmåten for fremstilling av forbindelsen med formel (I) er beskrevet nedenfor.

Forbindelsene kan fremstilles på flere måter godt kjente for fagmannen. Forbindelsene kan for eksempel syntetiseres ved anvendelse eller tilpassing av fremgangsmåter beskrevet nedenfor, eller variasjoner av disse som er kjente for fagmannen. Passende modifikasjoner og substitusjoner vil være nærliggende og godt kjent eller lett oppnåelige innen vitenskaplig litteratur som er kjent for fagmannen.

Særlig kan slike fremgangsmåter finnes i R.C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, Wiley-VCH Publishers, 1999.

Det vil være å forstå at forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan inneholde et eller flere substituerte karbonatomer og kan isoleres i optisk aktive eller racemiske former. Således er det anvendt kirale, diastereomere, racemiske former og alle geomtriske isoformer av en struktur tiltenkt, med mindre den spesifikke stereokjemiske eller isomere formen er spesifikt indikert. Det er godt kjent i litteraturen hvordan slike optisk aktive former fremstilles og isoleres. For eksempel kan blandinger av stereoisomerer separeres ved standard teknikker som inkluderer, men er ikke begrenset til, oppløsning av racemiske former, normale, omvendtfase og kiral kromatografi, foretrukket saltdannelse, rekrystallisering og lignende, eller ved kiral syntese fra kirale utgangsmaterialer eller ved bevist syntese av målkirale sentere.
Forbindelser ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved et antall synteseruter. Reagensene og utgangsmaterialene er kommersielt tilgjengelige, eller kan lett syntetiseres ved godt kjente teknikker eller av fagmannen. Alle substituenter, med mindre annet er indikert, er slik det tidligere er definert.

I reaksjonene beskrevet i det følgende kan det være nødvendig å beskytte reaktive, funksjonelle grupper, for eksempel hydroksy, amino, imino, tio eller karboksygrupper, hvor disse er ønskelige i sluttproduktet, for å unngå deres uønskede deltagelse i reaksjonene. Vanlig beskyttende grupper kan anvendes i henhold til standard praksis, se for eksempel T.W. Greene og P.G.M. Wuts i Protective Groups in Organic Chemistry, 3. utgave, John Wiley and Sons, 1999; J.F.W. McOmie i Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, 1973.

Noen reaksjoner kan utføres under nærvær av en base. Det er ingen bestemte begrensninger når det gjelder typen av base som anvende si denne reaksjonen, og en hvilken som helst base som vanligvis anvendes i reaksjoner av denne type kan på samme måte anvendes heri, forutsatt at den ikke har noen uheldig effekt på andre deler av molekylet. Eksempler på egnede baser inkluderer: natriumhydroksid,

kaliumkarbonat, trietylamin, alkalimetall hydrider, slik som natriumhydrid og kaliumhydrid; alkyllitiumforbindelser, slik som metyllitium og butyllitium; og alkalimetall alkoksider, slik som natriummetoksid og natriumetoksid.

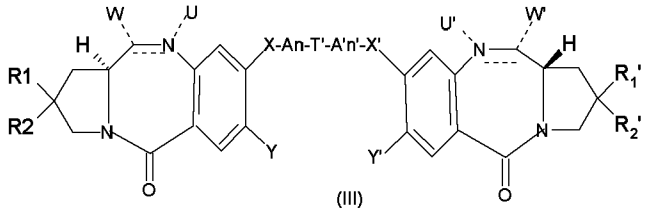
Vanligvis blir reaksjoner utført i et passende løsemiddel. Et antall løsemidler kan anvendes, forutsatt at de ikke har noen uheldig effekt på reaksjonen eller på involverte reagenser. Eksempler på egnede løsemidler inkluderer: hydrokarboner, som kan være aromatiske, alifatiske eller sykloalifatiske hydrokarboner, slik som heksan, sykloheksan, benzen, toluen og xylen; amider slik som dimetylformamid; alkoholer slik som etanol og metanol og etere, slik som dietyleter og tetrahydrofuran.

Reaksjonene kan finne sted over et bredt temperaturområde. Generelt har det blitt funnet hensiktsmessig å utføre reaksjonen ved en temperatur på fra -20°C til 150°C (mer foretrukket fra ca. romtemperatur til 100°C). Tiden som kreves for reaksjonen kan også variere bredt, avhengig av mange faktorer, først og fremst reaksjonstemperaturen og typen reagenser. Imidlertid, forutsatt at reaksjonene utføres under foretrukne betingelser angitt ovenfor, vil en periode på fra 3 timer til 20 timer vanligvis være tilstrekkelig.

Forbindelsen således fremstilt kan utvinnes fra reaksjonsblandingen med vanlige metoder. For eksempel kan forbindelsene utvinnes ved destillering av løsemiddelet fra reaksjonsblandingen eller, hvis nødvendig etter destillering av løsemiddelet fra reaksjonsblandingen, helle residuet over i vann fulgt av ekstraksjon med et vann-ikke-blandbart organisk løsemiddel og destillere av løsemiddelet fra ekstraktet. I tillegg kan produktet, hvis ønskelig, ytterligere renses ved forskjellige kjente teknikker, slik som rekrystallisasjon, represipitasjon eller de forskjellige kromatografiske teknikkene, først og fremst kolonnekromatografi eller preparativ tynnsjiktskromatografi.

Fremgangsmåten for fremstillingen av en forbindelse med formel (I) er beskrevet nedenfor.

Fremgangsmåten for fremstilling av forbindelsen med formel (I) omfatter trinnet ved å avbeskytte de korresponderende forbindelsene med formel (III):

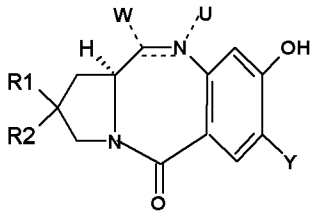


(III)

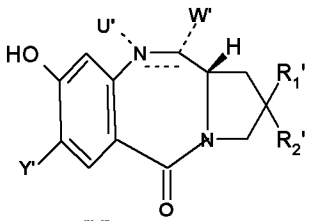
hvor Y, Y', X, A, A', X', n, n', W, W', U, U', ----, R1, R2, R1', R2', ----- er definert som i formel (I) og T' korresponderer til T der funksjonelle grupper har blitt beskyttet.

Foretrukket er SH-funksjonen beskyttet og foretrukket er den beskyttende gruppen acetyl, benzoyl, metansulfonyl, metyltio, pyridyltio, nitropyridyltio, triisopropylsilyl (TIPS). Generelt blir avbeskyttelsestrinnet utført ved anvendelse av klassiske betingelser slik som en base for å fjerne acetyl, benzoyl og metansulfonylbeskyttende grupper, et reduksjonsmiddel slik som ditiotreitol eller tris(2-karboksyetyl)fosfin (TCEP) for å spalte en metyltiobeskyttende gruppe eller kjent ved å omsette forbindelsen med et ammoniumfluorid for å fjerne TIPS.

Forbindelsen med formel (II) kan oppnås fra kobling av de korresponderende forbindelsene med formel (IV), (IV') og (V):



(IV)



(IV')

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

(V)

hvor Y, Y', A, A', n, n', T', W, W', U, U', ----, ----, R1, R2, R1', R2' er definert som i formel (III), og Lg er en utgående gruppe slik som et halogen, OMS, OTs eller $OPPh_3^+$ (intermediat dannet i en Mitsunobu-reaksjon).

Forbindelsene med formel (IV) og (IV') er generelt kjente, slik det er beskrevet for eksempel i patentsøknadene WO 00/12508, WW 00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260 eller kommersielt tilgjengelige og/eller er tilgjengelige ved total syntese (M. Mori et al., 42 Tetrahedron, 3793-3806, 1986) eller fremstilles med Streptomyces-arter, særlig ved å følge fransk patent Fr. 1 516 743-fremgangsmåte eller kan fremstilles ved anvendelse eller tilpassing av illustrative fremgangsmåter gitt i eksemplene.

Forbindelsene med formel (V) kan oppnås fra de korresponderende forbindelsene med formel (VI):

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

hvor A, A', n, n', T' er som definert I formel (III).

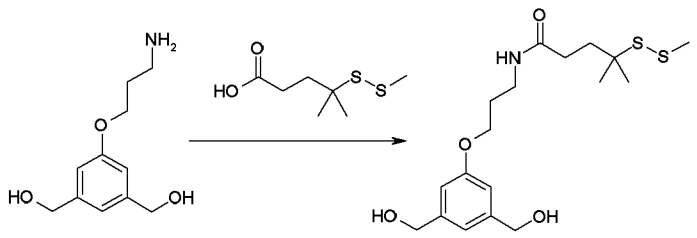
Denne reaksjonen blir generelt utført under nærvær av PPh_3 og $CHal_4$, eller ved reaksjon med et klorsulfonat under nærvær av en base slik som trietylamin eller kaliumhydroksid, foretrukket trietylamin.

Forbindelsene med formel (VI) kan oppnås fra de korresponderende forbindelsene med formel (VII):

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

hvor A, A', n, n' er som definert i formel (III) og T'' er en forløpergruppe til T. En forløpergruppe til T refererer til en hvilken som helst gruppe som kan føre til T ved en hvilken som helst avbeskyttelse, kjemisk modifikasjon eller kobling. Foretrukket blir T oppnådd ved kobling av T' med den komplementære posisjonen, hvor T' og den komplementære porsjonen innbefatter funksjoner som er reaktive med hverandre, for eksempel T' innbefatter en aminfunksjon og den komplementære posisjonen innbefatter en syrefunksjon.

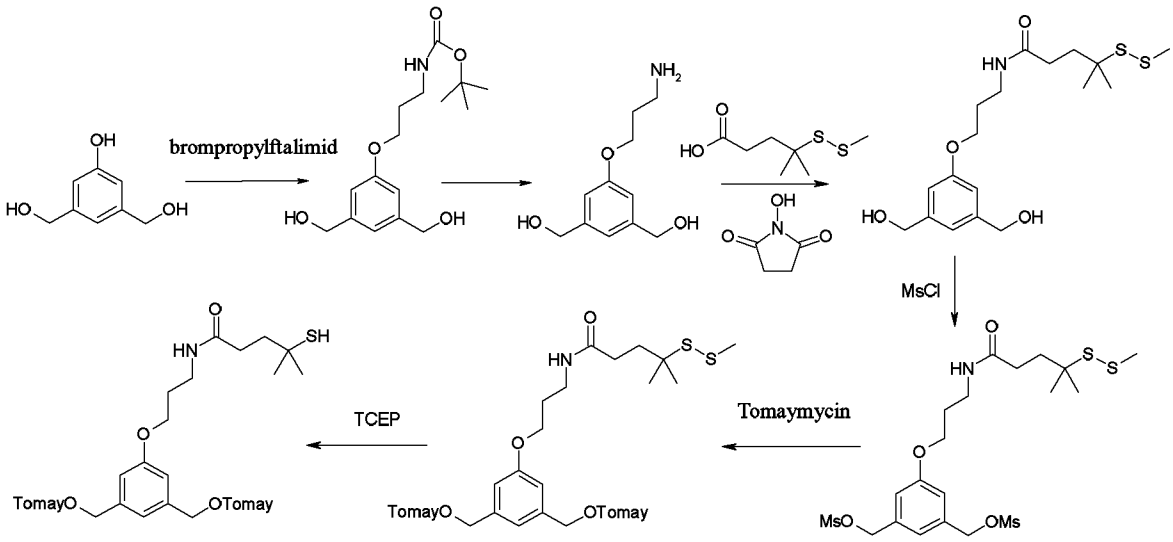
Et representativt eksempel på denne reaksjonen er:



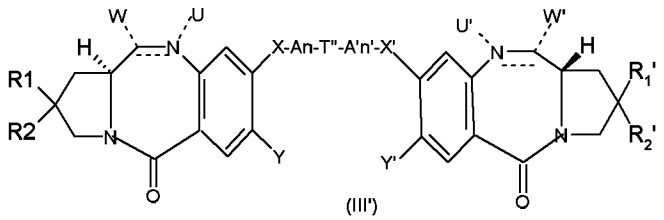
Generelt blir denne reaksjonen utført under nærvær av N-hydroksysuksinimid og HOBT.

Forbindelsen med formel (VII) kan være kommersielt tilgjengelige eller fremstilles ved tilpassing eller anvendelse av kjente fremgangsmåter i henhold til eksemplene.

Eksempler på ikke-begrensende skjema for denne utførelsesformen av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er gitt nedenfor:



Forbindelsen med formel (I) kan også oppnås fra den korresponderende forbindelsen med formel (III'):

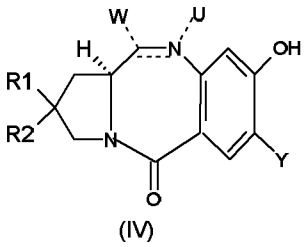


hvor Y, Y', X, A, A', X', n, n', W, W', U, U', ----, ----, R1, R2, R1', R2' er definert som i Formel (I) og T'' er en eventuelt beskyttende forløpergruppe til T.

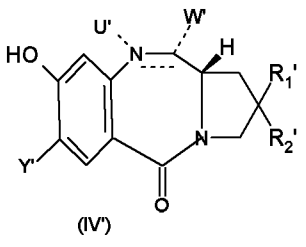
En forløpergrupper til T refererer til en hvilken som helst gruppe som kan føre til T ved kjemisk modifikasjon eller kobling. Foretrukket blir T oppnådd ved kobling av T' med den korresponderende, komplementære delen, hvor T' og den komplementære delen innbefatter funksjoner som er reaktive ovenfor hverandre, for eksempel T' innbefatter en aminfunksjon og den komplementære delen innbefatter en syrefunksjon.

Generelt blir denne reaksjonen utført under nærvær av: N-hydroksysuksinimid og HOBT.

Forbindelsen med formel (III') kan oppnås ved kobling av den korresponderende forbindelsen med formel (IV), (IV') og (V'):



(IV)



(IV')

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

(V')

hvor Y, Y', A, A', n, n', W, W', U, U', ----, _____, R1, R2, R1', R2' er definert som i formel (III'), T'' er en eventuelt beskyttet forløpergruppe til T og Lg er en utgående gruppe, slik som halogen eller Oms, OTs eller PPh_3^+ (intermediat dannet i en Mitsunobu-reaksjon).

Forbindelsene med formel (IV) og (IV') er generelt kjente og er tilgjengelige ved total syntese (M. Mori et al., 42 Tetrahedron, 3793-3806, 1886) eller fremstilles med Streptomyces-arter, særlig ifølge fransk patent Fr. 1 516 743 fremgangsmåte.

Forbindelsene med formel (V') kan oppnås fra de korresponderende forbindelsene med formel (VII):

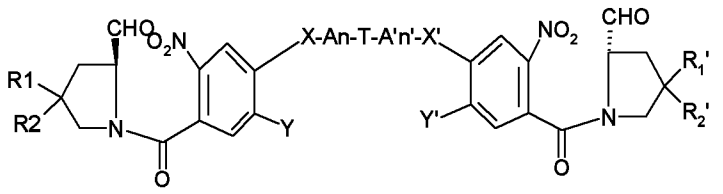
HO-An-T''-A'n'-OH (VII)

hvor A, A', n, n' er definert som i formel (I), T'' er en eventuelt beskyttet forløpergruppe til T'.

Denne reaksjonen blir generelt utført under nærvær av PPh_3 og $CHal_4$.

Forbindelsene med formel (VII) kan være kommersielt tilgjengelig og fremstilles ved tilpassing eller anvendelse av kjente fremgangsmåter, eller i henhold til eksemplene.

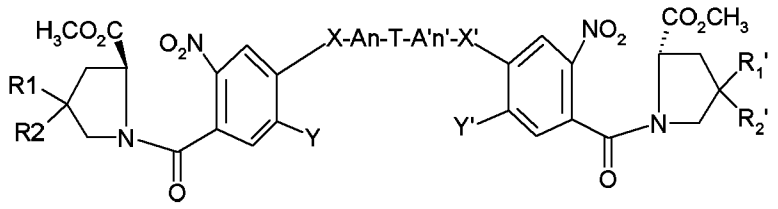
Fremgangsmåten for fremstilling av forbindelsen med formel (I) omfatter trinnet med å syklisere den korresponderende forbindelsen med formel (VIII):



(VIII)

hvori Y, Y', X, A, A', X', n, n', R1, R2, R1', R2', T er som definert i formel (I). Generelt blir denne reaksjonen utført under nærvær av et reagens slik som natriumhydrosulfitt ($Na_2S_2O_4$), i et passende løsemiddel slik som en blanding av THF og vann, fulgt av tilsetting av metanol og AcCl.

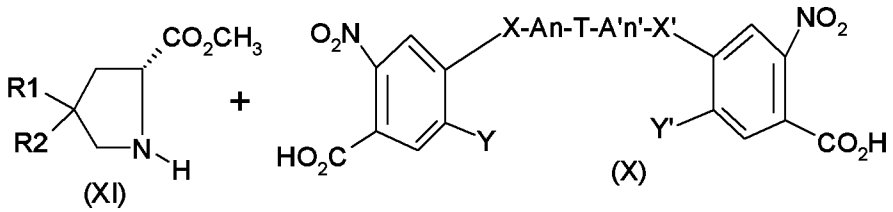
Forbindelsen med formel (VIII) kan oppnås fra den korresponderende forbindelsen med formel (IX):



(IX)

hvor Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T er definert som i formel (I). Generelt vil denne reaksjonen utføres under nærvær av et reagens slik som DIBAL-H i et passende løsemiddel, slik som toluen.

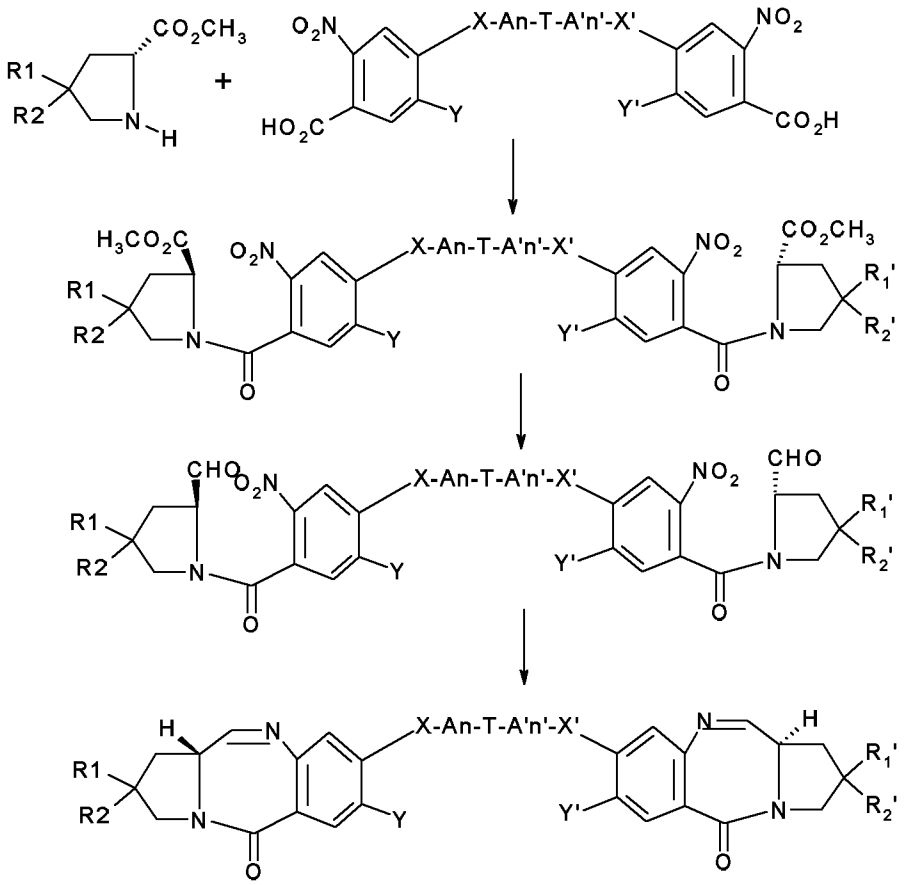
Forbindelsen med formel (IX) kan oppnås fra kobling av de korresponderende forbindelsene med formel (X) og (XI):



hvor Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T er som definert i formel (I).

Generelt blir denne reaksjonen utført ved tilsetting til (X) et reagens slik som oksalylklorid i et passende løsemiddel, slik som DMF, fulgt av tilsetting av (XI) i et passende løsemiddel, slik som THF.

Et representativt skjema er gitt nedenfor:



Reaksjonene ovenfor kan utføres av fagmannen ved anvendelse av eller tilpassing av fremgangsmåtene illustrert i eksemplene i det følgende.

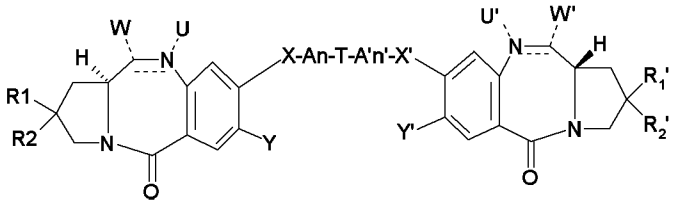
Videre kan fremgangsmåten også innbefatte det ytterligere trinnet med å isolere forbindelsen med formel (I) og (II). Dette kan gjøres av fagmannen ved en hvilken som helst av de vanlige fremgangsmåtene, slik som utvinningsfremgangsmåtene beskrevet ovenfor.

Utgangsproduktene er kommersielt tilgjengelige eller kan oppnås ved anvendelse eller tilpassing av en hvilken som helst kjent fremgangsmåte eller de som er beskrevet i eksemplene.

Syntesen kan utføres i en kolbe i en multikomponent reaksjon.

Ifølge en ytterligere gjenstand angår foreliggende oppfinnelse et konjugatmolekyl som innbefatter minst et tomaymycinderivat kovalent bundet til et cellebindende middel gjennom en bindingsgruppe. Ifølge foreliggende oppfinnelse er tomaymycinderivatene valgt fra tomaymycinderivatene ifølge oppfinnelsen som definert ovenfor. Slikt

konjugat innbefatter et eller flere tomaymycinderivater ifølge oppfinnelsen som fremviser en bindingsgruppe som innbefatter en bindingsgruppe, slik som –S- eller –S-S-. Nevnte bindingsgruppe binder kovalent det cellebindende middelet med bindingsgruppen til tomaymycinderivatet. Nevnte tomaymycinderivat kan ha formel (I'):



(I')

hvor

---- representerer en eventuelt enkelt binding;

---- representerer enten en enkeltbinding eller en dobbeltbinding;

forutsatt at når ---- representerer en enkeltbinding, representerer U og U', like eller forskjellige, uavhengig H, og W og W', like eller forskjellige, er uavhengig valgt fra gruppen som består av OH, en eter slik som –OR, en ester (for eksempel et acetat), slik som –OCOR, et karbonat slik som –OCOOR, et karbamat slik som –OCONRR', et syklisk karbamat slik at N10 og C11 er en del av sykelen, et urea slik som –NCRCONRR', et tiokarbamat slik som –OCSNHR, et syklisk tiokarbamat slik at N10 og C11 er en del av sykelen, -SH, et sulfid slik som –SR, et sulfoksid slik som –SOR, et sulfon slik som –SOOR, et sulfonat slik som $–SO_3^-$, et sulfonamid slik som –NRSOOR, et amin slik som –NRR', eventuelt syklisk amin slik at N10 og C11 er en del av sykelen, et hydroksylaminderivat sliks om –NROR', et amid slik som –NRCOR, et azido slik som $–N_3$, et cyano, et halo, et trialkyl eller triarylfosfonium, en aminosyreavledet gruppe; Foretrukket er W og W' like eller forskjellige for OH, OMe, Oet, $NHCONH_2$, SMe;

og når ----- representerer en dobbeltbinding, er U og U' fraværende og W og W' representerer H;

- R1, R2, R1', R2' er like eller forskjellige og uavhengig valgt fra halid eller alkyl eventuelt substituert med et eller flere Hal, CN, NRR', CF_3, OR, aryl, Het, $S(O)_qR$, eller R1 og R2 og R1' og R2' danner sammen en dobbeltbinding som inneholder gruppe =B og =B', respektivt.

Foretrukket danner R1 og R2 og R1' og R2' sammen en dobbeltbinding som inneholder gruppe =B og =B', respektivt.

- B og B' er like eller forskjellige og uavhengig valgt fra alkenyl, værende eventuelt substituert med en eller flere Hal, CN, NRR', CF_3, OR, aryl, Het, $S(O)_qR$ eller B og B' representerer et oksygenatom.

Foretrukket gjelder B=B'.
Mer foretrukket gjelder B=B'= $=CH_2$ eller $=CH-CH_3$,

- X, X' er like eller forskjellige og uavhengig valgt fra en eller flere –O-, -NR-, -(C=O)-, $-S(O)_q-$.

Foretrukket gjelder X=X'.
Mer foretrukket gjelder X=X'=O.

- A, A' er like eller forskjellige og uavhengig valgt fra alkyl eller alkenyl, hver værende eventuelt inneholdende et oksygen-, et nitrogen- eller et svovelatom, og eventuelt substituert med en eller flere Hal, CN, NRR', CF_3, OR, $S(O)_qR$, aryl, Het, alkyl, alkenyl.

Foretrukket gjelder A=A'.
Mer foretrukket gjelder A=A'=lineær usubstituert alkyl.

- Y, Y' er like eller forskjellige og er uavhengig valgt fra H, OR.

Foretrukket gjelder Y=Y'.
Mer foretrukket gjelder Y=Y'=Oalkyl, mer foretrukket Ometyl.

- T er –NR-, -O-, $-S(O)_q-$, eller et 4 til 10-leddet aryl, sykloalkyl, heterosyklisk eller heteroaryl, hver værende eventuelt substituert med et eller flere Hal,

CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$ og substituert med en eller flere bindingsgrupper.

Foretrukket er T et 4 til 10-leddet aryl eller heteroaryl, mer foretrukket fenyl eller pyridyl substituert med en eller flere bindingsgrupper.

Egnede bindingsgrupper er godt kjente i litteraturen og inkluderer tiol-, sulfid- eller disulfidgrupper, tioetergrupper, syrelabile grupper, fotolabile grupper, peptidaselabile grupper og esteraselabile grupper. Foretrukket er disulfidgrupper og tioetergrupper.

Når bindingsgruppen er en tiol-, sulfid- eller disulfidinneholdende gruppe, kan sidekjeden som bærer tiol- eller disulfidgruppen være lineær eller forgrenet, aromatisk eller heterosyklisk. Fagmannen kan lett identifisere egnede sidekjeder. Foretrukket har nevnte bindingsgruppe formelen:

-G-D-(Z)p-S-Z'

hvor

G er en enkelt- eller dobbeltbinding, -O-, -S- eller –NR-;

D er en enkeltbinding eller –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-;

hvor E og F er like eller forskjellige og er uavhengig valgt fra lineær eller forgrenet $-(OCH_2CH_2)_iAlkyl(OCH_2CH_2)_j-$, $-Alkyl(OCH_2CH_2)_i-Alkyl-$, $-(OCH_2CH_2)_i-$, $-(OCH_2CH_2)_iSykloalkyl(OCH_2CH_2)_j-$, $-(OCH_2CH_2)_iHeterosyklisk(OCH_2CH_2)_j-$, $-(OCH_2CH_2)_iAryl(OCH_2CH_2)_j-$, $-(OCH_2CH_2)_iHeteroaryl(OCH_2CH_2)_j-$, $–Alkyl-(OCH_2CH_2)_iAlkyl(OCH_2CH_2)_j-$, $-Alkyl-(OCH_2CH_2)_i-$, $-Alkyl-(OCH_2CH_2)_iSykloalkyl(OCH_2CH_2)_j-$, $-Alkyl(OCH_2CH_2)_iHeterosyklisk(OCH_2CH_2)_j-$, $-Alkyl-(OCH_2CH_2)_iAryl(OCH_2CH_2)_j-$, $-Alkyl(OCH_2CH_2)_iHeteroaryl(OCH_2CH_2)_j-$, -Sykloalkyl-Alkyl-, -Alkyl-Sykloalkyl-, -Heterosyklisk-Alkyl-, -Alkyl-Heterosyklisk-, -Alkyl-Aryl-, -Aryl-Alkyl-, -Alkyl-Heteroaryl- , -Heteroaryl-Alkyl-;

hvor i og j, identiske eller forskjellige, er heltall, uavhengig vlagt fra 0, 1 til 2000;

Z er lineær eller forgrenet –Alkyl-;

p er 0 eller 1;

Z' representerer H, en tiolbeskyttende gruppe slik som COR, R_{20} eller SR_{20}, hvor R_{20} representerer H, metyl, alkyl, eventuelt substituert sykloalkyl, aryl, heteroaryl eller heterosyklisk, forutsatt at når Z' er H, er nevnte forbindelse i likevekt med den korresponderende forbindelsen dannet ved intramolekylær syklisering som kommer som resultat av tilsetting av tiolgruppen –SH på iminbindingen –NH= til en eller flere PBD-bestanddeler.

- n, n', like eller forskjellige, er 0 eller 1, med m=m' og n=n'.
- q er 0, 1 eller 2.
- R, R' er like eller forskjellige og uavhengig valgt fra H, alkyl, aryl, hvor hver eventuelt er substituert med Hal, CN, NRR', CF_3, R, OR, $S(O)_qR$, aryl, Het;

eller deres farmasøytisk akseptable salter, hydrater eller hydratiserte salter, eller de polymorfe, krystallinske strukturene til disse forbindelsene eller deres optiske isomerer, racemater, diastereomerer eller enantiomere,

nevnte derivat værende kovalent bundet til et cellebindende middel gjennom nevnte bindingsgruppe.

Foretrukket er bindingsgruppen bundet til det cellebindende middel via en funksjon reaktiv ovenfor tiol-, sulfid- eller disulfidbinding.

Tomaymycinderivatene kan ha de følgende radikaler eller en hvilken som helst kombinasjon av noen av dem:

- G er en enkeltbinding eller –O- eller –NR-;

- G er –O-;
- D er en enkeltbinding eller –E-, -E-NR-, -E-NR-CO-, -E-CO-, -CO-E-;
- D er –E-, -E-NR-CO-, -CO-E-, -E-CO-;
- D er –E-NR-CO-;
- E er lineær eller forgrenet –Alkyl-, $-(OCH_2CH_2)_i-$ eller –Alkyl-heterosyklisk;
- E er lineær eller forgrenet –Alkyl-;
- Z er $-(CH_2)_2-C(CH_3)_2-$;
- p er 0 eller 1;
- Z' er H eller SR_{20}, hvori R_{20} representerer alkyl, aryl, heterosyklisk eller heteroaryl;
- Z' er H eller SR_{20}, hvori R_{20} representerer alkyl.

Spesifikke eksempler på tiol-, sulfid- eller disulfidinneholdende bindingsgrupper inkluderer

$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_y(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_y\ SZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t(OCO)(R_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t(CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t(CONR_{19})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-furyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t$-oksazolyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t$-tienyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolyl-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
$-(CR_{13}R_{14})_t$-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-metylpiperazino-$CO(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,

$-(CR_{13}R_{14})_t$-fenyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-furyl-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$-oksazolyl-QSZ',

-$(CR_{13}R_{14})_t$-tiazolyl-QSZ', -$(CR_{13}R_{14})_t$-tienyl-QSZ', -$(CR_{13}R_{14})_t$-imidazolyl-QSZ', -$(CR_{13}R_{14})_t$-morfolino-QSZ', -$(CR_{13}R_{14})_t$-piperazino-QSZ', -$(CR_{13}R_{14})_t$-N-metylpiperazino-QSZ', eller

-$O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-$O(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-$O(CR_{13}R_{14})_t$ $(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t$ $(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
-O-fenyl-QSZ', -O-furyl-QSZ', -O-oksazolyl-QSZ', -O-tiazolyl-QSZ', -O-tienyl-QSZ', -O-imidazolyl-QSZ', -O-morfolino-QSZ', -O-piperazino-QSZ', -O-N-metylpiperazino-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-fenyl-QSZ', -OCO-furyl-QSZ', -OCO-oksazolyl-QSZ', -OCO-tiazolyl-QSZ', -OCO-tienyl-QSZ', -OCO-imidazolyl-QSZ', -OCO-morfolino-QSZ', -OCO-piperazino-QSZ', -OCO-N-metylpiperazino-QSZ', eller

-$CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u$ $(OCH_2CH_2)_y$ 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-fenyl-QSZ', -CO-furyl-QSZ', -CO-oksazolyl-QSZ', -CO-tiazolyl-QSZ', -CO-tienyl-QSZ', -CO-imidazolyl-QSZ', -CO-morfolino-QSZ', -CO-piperazino-QSZ', -CO-piperidino-QSZ', -CO-N-metylpiperazino-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-fenyl-QSZ', -NR_{19}CO-furyl-QSZ', -NR_{19}CO-oksazolyl-QSZ', -NR_{19}CO-tiazolyl-QSZ', -NR_{19}CO-tienyl-QSZ', -NR_{19}CO-imidazolyl-QSZ', -NR_{19}CO-morfolino-QSZ', -NR_{19}CO-piperazino-QSZ', -NR_{19}CO-piperidino-QSZ', -NR_{19}CO-N-metylpiperazino-QSZ',

$-NR_{19}$-fenyl-QSZ', $-NR_{19}$-furyl-QSZ', $-NR_{19}$-oksazolyl-QSZ', $-NR_{19}$-tiazolyl-QSZ', $-NR_{19}$-tienyl-QSZ', $-NR_{19}$-imidazolyl-QSZ', $-NR_{19}$-morfolino-QSZ', $-NR_{19}$-piperazino-QSZ', $-NR_{19}$-piperidino-QSZ', $-NR_{19}$-N-metylpiperazino-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-fenyl-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-oksazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-tiazolyl-QSZ', $-NR_{19}CO-NR_{12}$-tienyl-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', og -SCO-N-metylpiperazino-QSZ', hvori:

Z' er H, en tiolbeskyttende gruppe slik som COR, R_{20}' eller SR_{20}', hvori R_{20}' representerer alkyl, aryl, heterosyklisk eller heteroaryl,

hvori Q er en direkte binding eller et lineært alkyl eller forgrenet alkyl som har fra 1-10 karbonatomer eller en polyetylenglykol mellomromsgruppe med 2 til 20 repeterende etylenoksyenheter;

R_{19} og R_{12} er like eller forskjellige og er lineær alkyl, forgrenet alkyl eller syklisk alkyl som har fra 1 til 10 karbonatomer, eller enkel eller substituert aryl eller heterosyklisk, og R_{12} kan i tillegg være H,

R_{13}, R_{14}, R_{15} og R_{16} er like eller forskjellige og er H eller et lineært eller forgrenet alkyl som har fra 1 til 4 karbonatomer,

R_{17} og R_{18} er H eller alkyl,

u er et heltall fra 1 til 10 og kan også være 0,

t er et heltall fra 1 til 10 og kan også være 0,

y er et heltall fra 1 til 20 og kan også være 0.

Representative forbindelser med formel (I') er:

- 8,8'-{5-[3-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)propyloksy]-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)}-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

- 8,8'-[5-acetyltiometyl-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-metylen-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

- 8,8'-[3-(2-acetyltioetyl)-1,5-pentandiylbis(oksy)]-bis[(S)-2-metylen-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[5-(N-4-merkapto-4,4-dimetylbutanoyl)amino-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[5-(N-4-metylditio-4,4-dimetylbutanoyl)-amino-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[5-(N-metyl-N-(2-merkapto-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-benzendiyl(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[5-(N-metyl-N-(2-metylditio-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-benzendiyl(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(2-(4-merkapto-4-metyl)-pentanamidoetoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(1-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(4-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidobutoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(3-[4-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(1-(3-[4-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] ,

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(1-(2-[metyl-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-amino]-etoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(3-[metyl-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(4-(3-[metyl-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[(1-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamido)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

så vel som de korresponderende merkaptoderivatene,

eller deres farmasøytisk akseptable salter, hydrater eller hydratiserte salter, eller de polymorfe, krystallinske strukturene av disse forbindelsene eller deres optiske isomerer, racemater, diastereomerer eller enantiomerer.

Cellebindende midler kan være av en hvilken som helst type og inkluderer peptider og ikke-peptider. Generelt kan disse antistoffene (særlig monoklonale antistoffer) eller et fragment av et antistoff som inneholder minst et bindende sete, lymfokiner, hormoner, vekstfaktorer, næringstransportmolekyler (slik som transferrin) eller et hvilket som helst annet cellebindende molekyl eller substans. Mer spesifikke eksempler på cellebindende midler som kan anvendes inkluderer: monoklonale antistoffer; kimeriske antistoffer; humaniserte antistoffer; fulle humane antistoffer; enkeltkjede antistoffer; fragmenter av antistoffer slik som Fab, Fab', $F(ab')_2$ og F_v (Parham, 131, J. Immunol., 2895-2902 (1983), Spring et al., 113, J. Immunol., 470-478 (1974); Nisonoff et al., 89, Arch. Biohcme. Biophys., 230-244 (1960)); interferoner; peptider; lymfokiner slik som IL-2, IL-3, IL-4, IL-6; hormoner slik som insulin, TRH (tyrotropinfrigjørende hormoner), MSH (melanocyttstimulerende hormon), steriode hormoner slik som andreogener og østrogener; vekstfaktorer og kolonistimulerende faktorer slik som EGF, EGFα, insulinlignende vekstfaktor (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF og GM-CSF (Burgess, 5, Immunology Today, 155-158 (1984)); vitaminer slik som folat og transferrin (O'Keefe et al., 260, J. Biol. Chem., 932-937 (1985)).

Uttrykket "cellebindende middel" inkluderer heri også modifiserte cellebindeinde midler, hvori nevnte cellebindende middel er modifisert med et modifiserende middel for å forbedre reaktiviteten til nevnte cellebindende middel ovenfor bindingsgruppen til bindingsgruppen til tomaymycinderivatet. Nevnte modifiserende midler inkluderer N-sulfosuksinimidyl-4-(5-nitro-2-pyridylditio)butanoat (SSNPB), suksinimidyl-4-[N-

maleimidometyl]sykloheksan-1-karboksylat (SMCC), 4-(2-pyridylditio)butansyre-N-hydroksysuksinimidester (SPBD), og så videre slik det er diskutert nedenfor.

Monoklonal antistoffteknologi muliggjør produksjon av ekstremt selektive cellebindende midler i form av spesifikke monoklonale antistoffer. Særlig godt kjent i litteraturen er teknikker for å danne monoklonale antistoffer fremstilt ved immunisering av mus, rotter, hamster eller et hvilket som helst annet pattedyr med antigenet av interesse slik som den intakte målcellen, antigener isolert fra målcellen, hele virus, attenuerte hele virus og virale proteiner slik som virale beleggproteiner.

Valg av passende cellebindende middel er valgfritt og avhenger av den bestemte cellepopulasjonen som skal målrettes, men generelt er monoklonale antistoffer foretrukket hvis et passende er tilgjengelig.

For eksempel er det monoklonale antistoffet MY9 et muring IgG_1-antistoff som binder spesifikt til CD33-antigenet (J.D. Griffin et al., 8, Leukemia Res., 521 (1994)), og kan anvendes hvis målceller uttrykker CD33 som i sykdommen akutt myelogen leukemi (AML). Tilsvarende er det monoklonale antistoffet anti-B4 et muring IgG_1, som binder til CD19-antigenet på B-celler (Nadler et al., 131, J. Immunol., 244-250 (1983)), og kan anvendes hvis målceller er B-celler eller sykdomsceller som uttrykker dette antigenet slik som i ikke-Hdgkins lymfom eller kronisk, lymfoblastisk leukemi. Slik det er angitt ovenfor, kan MY9 og anti-B4-antistoffet være murin, kimerisk, humanisert eller fullt humant.

I tillegg kan GM-CSF som binder til myeloidceller anvendes som et cellebindende middel til sykdomsceller fra akutt myelogen leukemi. IL-2, som binder til aktiverte T-celler, kan anvendes for hindring av transplantat graf-rejeksjon for behandling eller hindring av transplantat-versus-vertssykdom og for behandling av akutt T-celle leukemi. MSH, som binder til melanocytter, kan anvendes for behandling av melanom.

Konjugatmolekylene ifølge oppfinnelsen kan dannes ved anvendelse av en hvilken som helst teknikk. Tomaymycinderivater ifølge oppfinnelsen kan bindes til et antistoff eller annet cellebindende middel via en syrelabil bindingsgruppe, eller med en fotolabil bindingsgruppe. Derivatene kan kondenseres med et peptid som har en passende sekvens som deretter bindes til et cellebindende middel for å gi en peptidaselabil bindingsgruppe. Konjugatene kan fremstilles til å inneholde en primær hydroksylgruppe, som kan bli suksininylert og bindes til et cellebindende middel for å

gi et konjugat som kan spaltes med intracellulære esteraser for å frigi fritt derivat. Foretrukket blir derivatene syntetisert til å inneholde en fri eller beskyttet tiolgruppe, og deretter blir et eller flere disulfid eller tiolinneholdende derivater hver kovalent bundet til det cellebindende middelet via en disulfidbinding eller en tioeterbinding.

Et antall fremgangsmåter for konjugering er beskrevet i USP 5 416 064 og USP 5 475 092. Tomaymycinderivatene kan modifiseres for å gi en fri aminogruppe og deretter binde til et antistoff eller annet cellebindende middel via en syrelabil bindingsgruppe eller en fotolabil bindingsgruppe. Tomaymycinderivatene med en fri amino- eller karboksylgruppe kan kondenseres med et peptid og deretter bindes til et cellebindende middel for å gi en peptidaselabil bindingsgruppe. Tomaymycinderivatene med en fri hydroksylgruppe på bindingsgruppen kan bli suksinylert og bundet til et cellebindende middel for å gi et konjugat som kan spaltes ved intracellulær esterase for å frigi fritt legemiddel. Mest foretrukket blir tomaymycinderivatene behandlet for å danne en fri eller beskyttet tiolgruppe, og deretter blir disulfid- eller tiolinneholdende tomaymicindimerene bundet til det cellebindende middelet via disulfidbindinger.

Representative konjugater ifølge oppfinnelsen er antistoff-tomaymycinderivat, antistoffragment-tomaymycinderivat epidermal vekstfaktor (EGF)-tomaymycinderivat, melanocyttstimulerende hormon (MSH)-tomaymycinderivat, tyroidstimulerende hormon (TSH)-tomaymycinderivat, østrogen-tomaymycinderivat, østrogenanalog-tomaymycinderivat, andorgen-tomaymycinderivat, androgenanalog-tomaymycinderivat og folat-tomaymycinderivat.

Tomaymycinderivatkonjugater av antistoffer, antistoffragmenter, protein- eller peptidhormoner, protein- eller peptidvekstfaktorer og andre proteiner fremstilles på samme måte ved kjente fremgangsmåter. For eksempel kan peptider og antistoffer modifiseres med tverrbindingsreagenser slik som N-suksinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionat, N-suksinimidyl-4-(2-pyridyltio)pentanoat (SPP), 4-suksinimidyloksykarbonyl-α-metyl-α-(2-pyridylditio)-toluen (SMPT), N-suksinimidyl-3-(2-pyridylditio)butyrat (SDPB), suksinimidylpyridylditiopropionat (SPDP), 4-(2-pyridylditio)butansyre-N-hydrosuksinimidester (SPDB), suksinimidyl-4-[N-maleimidometyl]sykloheksan-1-karboksylat (SMCC), N-sulfosuksinimidyul-3-(2-(5-nitropyridylditio)butyrat (SSNPB), 2-iminotiolan eller S-acetylravsyreanhydrid ved kjente fremgangsmåter. Se 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); og Liu et al., 18, Biochem, 690

(1979), Blakey og Thorpe, 1, Antibody, Immunoconjugates & Radio-pharmaceuticals, 1-16 (1988), Worrell et al., 1, Anti-Cancer Drug Design, 179-184 (1986). Det frie eller beskyttende tiolinneholdende cellebindende middelet således avledet blir deretter omsatt med et disulfide- eller tiolinneholdende tomaymycinderivat for å fremstille konjugater. Konjugatene kan renses med HPLC eller med gelfiltrering.

Foretrukket er monoklonale antistoff- eller cellebindende middel tomaymycinderivatkonjugater de som er bundet via en disulfidbinding, som diskutert ovenfor, som er i stand til å levere tomaymycinderivater. Slike cellebindende konjugater fremstilles ved kjente fremgangsmåter slik som ved modifisering av monoklonale antistoffer med suksinimidylpyridyl-ditiopropionat (SPDP) (Carlsson et al., 173, Biochem. J., 723-737 (1978)). Den resulterende tiopyridylgruppen blir deretter erstattet med behandling med tiolinneholdende tomaymycinderivater for å gi disulfidbundne konjugater. Alternativt, i tilfellet arylditiotomaymycinderivater blir dannelse av det cellebindende konjugatet utført ved direkte erstatning av aryltiolet til tomaymycinderivatet med sulfhydrylgrupper på forhånd introdusert inn i antistoffmolekylene. Konjugater som inneholder 1 til 10 tomaymycinderivat legemidler bundet via en disufildbro blir lett fremstilt ved en av fremgangsmåtene.

Mer spesifikt blir en løsning av det ditio-nitropyridylmodifiserte antistoffet ved en konsentrasjon på 2,5 mg/ml i 0,05 M kaliumfosfatbuffer, ved pH 7,5 som inneholder 2 mM EDTA behandlet med det tiolinneholdende tomaymycinderivatet (1,3 molar ekv./ditiopyridylgruppe). Frigivelse av tionitropyridin fra det modifiserte antistoffet overvåkes spektrofotometrisk ved 325 nm og er ferdig i løpet av ca. 16 timer. Antistoff-tomaymycinderivatkonjugatet renses og frigjøres fra ikke-behandlet legemiddel og annet lavmolekylvekt materiale ved gelfiltrering gjennom en kolonne av Sephadex G-25 eller Sephacryl S300. Antallet tomaymycinderivat bestanddeler bundet per antistoffmolekyl kan bestemmes ved å måle forholdet mellom absorbansen ved 230 nm og 275 nm. Et gjennomsnitt på 1-10 tomaymycinderivatmolekyler/antistoffmolekyl kan bindes via disulfidbindingene ved denne fremgangsmåten.

Effekten av konjugering på bindingsaffinitet ovenfor de antigenuttrykkende cellene kan bestemmes ved anvendelse av fremgangsmåtene tidligere beskrevet av Liu et al., 93, Proc. Natl. Acad. Sci., 8618-8623 (1996). Cytotoksisitet til tomaymycinderivatet og deres antistoffkonjugater til cellelinjer kan måles ved tilbake-ekstrapolering av celleproliferasjonskurver slik det er beskrevet i Goldmacher et al., 135, J. Immunol., 3648-3651 (1985). Cytotoksisitet til disse forbindelsene til adherente cellelinjer kan

bestemmes ved klonogene undersøkelser slik det er beskrevet i Goldmacher et al., 102, J. Cell Biol., 1312-1319 (1986).

Representative konjugater ifølge oppfinnelsen er konjugater av tomaymycinderivater med antistoffer, antistoffragmenter, epidermal vekstfaktor (EGF), melanocyttstimulerende hormon (MSH), tyroidstimulerende hormon (TSH), østrogen, østrogenanaloger, androgen og androgene analoger.

Representative eksempler på fremstilling av forskjellige konjugater av derivater og cellebindende midler er beskrevet nedenfor.

Disulfid bindingsgrupper: For eksempel er det monoklonale antistoffet MY9 et muring IgG_1-antistoff som binder spesifikt til CD33-antigenet (J.D. Griffin et al., 8, Leukemia Res., 521, (1984)), og kan anvnedes hvis målceller uttrykker CD33 som i sykdommen akutt myelogen leukemi (AML). Tilsvarende er det monoklonale antistoffet anti-B4 et murint IgG_1, som binder til CD19-antigenet på B-celler (Nadler et al., 131, J. Immunol., 244-250 (1983)), og kan anvendes hvis målcellene er B-celler eller sykdomsceller som uttrykker dette antigenet slik som ikke-Hodgkins lymfom eller kronisk, lymfoblastisk leukemi.

I tillegg kan GM-CSF som binder til myeloidceller anvendes som et cellebindende middel til sykdomsceller for akutt, myelogen leukemi. IL-2, som binder til aktiverte T-celler, kan anvendes for hindring av transplantatpodingsrejeksjon, for behandling og hindring av transplantat-versus-vertsykdom og for behandling av akutt T-celle leukemi. MSH, som binder til melanocytter, kan anvendes for behandling av melanom.

Antistoffet eller et annet cellebindende middel modifiseres med N-suksinimdyl-3-pyridylditiopropionat slik det tidligere er beskrevet (J. Carlsson, H. Drevin & R. Axen, Biochem. J., 173:723 (1978)) for å introdusere, i gjennomsnitt, 4-pyridylditiogrupper per antistoffmolekyl. Det modifiserte antistoffet reagerer med det tiolinneholdende derivatet for å gi et disulfidbundet konjugat.

Alternativt kan konjugatene fremstilles ved anvendelse og/eller tilpassing av fremgangsmåten beskrevet i WO 2004/103272, hvis beskrivelse er innbefattet heri med referanse.

Tioeterbindingsgrupper: Tiolinneholdende derivater ifølge oppfinnelsen kan bindes til antistoffer og andre cellebindende midler via en tioeterbinding som tidligere beskrevet (US patentnr. 5 208 020). Antistoffet eller annet cellebindende middel kan modifiseres med den kommersielt tilgjengelige forbindelsen slik som N-suksinimidyl-4-(maleimidometyl)sykloheksankarboksylat (SMCC), N-suksinimidyl-4-(N-maleimidometyl)-sykloheksan-1-karboksy-(6-amidokaproat), som er en "langkjedet" analog av SMCC (LC-SMCC). Disse tverrbindingsreagensene danner ikke-spaltbare bindingsgruper avledet fra maleimidobaserte bestanddeler.

Tverrbindingsreagenser som innbefatter en haloacetylbasert bestanddel inkluderer N-suksinimidyl-4-(jodacetyl)-aminobenzoat (SIAB), N-suksinidyljodacetat (SIA), N-suksinidylbromacetat (SBA) og N-suksinimidyl-3-(bromacetamido)propionat (SBAP). Disse tverrbindingsreagensene danner ikke-spaltbare bindingsgrupper avledet fra haloacetylbaserte bestanddeler.

Syrelabile bindingsgrupper: Amingruppeinneholdende derivater ifølge oppfinnelsen kan bindes til antistoffer og andre cellebindende midler via en syrelabil bindingsgruppe som tidligere beskrevet (W.A. Blattler et al., Biochemistry, 24, 1517-1524 (1985); US patentnr. 4 542 225, 4 569 789, 4 618 492, 4 764 368).

Tilsvarende kan et hydrazido gruppeinneholdende derivat ifølge oppfinnelsen bindes til karbohydratdelen til antistoffene og andre cellebindende midler via en syrelabil hydrazonbindingsgruppe (for eksempler på hydrazonbindingsgruppe se B.C. Laguzza et al., J. Med. Chem., 32, 548-555 (1989), R.S. Greenfield et al., Cancer Res., 50, 6600-6607 (1990)).

Fotolabile bindingsgrupper: Amingruppeinneholdende derivater ifølge oppfinnelsen kan bindes til antistoffer og andre cellebindende midler via en fotolabil bindingsgruppe som tidligere beskrevet (P. Senter et al., Photochemistry and Photobiology, 42, 231-237 (1985); US patentnr. 4 625 014).

Peptidaselabile bindingsgrupper: Amingruppeinneholdende derivater ifølge oppfinnelsen kan også bindes til cellebindende midler via peptid mellomromsgrupper. Det har tidligere blitt vist at korte peptid mellomromsgrupper mellom legemidler og makromolekylære proteinbærere er stabile i serum, men hydrolyserer lett med intracellulære peptidaser (A. Trouet et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 626-629 (1982)). De aminogruppeinneholdende derivatene kan kondenseres med peptider ved anvendelse

av kondensasjonsmidler slik som 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid-HCl (EDC-HCl) for å gi et peptidderivat som kan bindes til cellebindende midler.

Esteraselabile bindingsgrupper: Derivater ifølge oppfinnelsen som bærer en hydroksyalkylgruppe kan suksinyleres med ravsyreanhydrid og deretter bindes til et cellebindende middel for å gi et konjugat som kan spaltes med intracellulære esteraser for å frigi det frie legemiddelet. (For eksempel se E. Aboud-Pirak et al., Biochem Pharmacol., 38, 641-648 (1989)).

Konjugatene fremstilt ved fremgangsmåtene ovenfor kan renses ved standard kromatografiteknikker slik som størrelseseksklusjon, absorpsjonskromatografi som inkluderer, men er ikke begrenset til, ionebytte, hydrofob interaksjonkromatografi, affinitetskromatografi, kromatografi på keramisk hydroksyapatitt eller på Porapak, eller ved HPLC. Rensing med dialyse eller diafiltrering kan også anvendes.

Foretrukket er konjugatene mellom monoklonale antistoffer eller cellebindende midler og derivater ifølge oppfinnelsen de som er bundet via en disulfidbinding, slik det er diskutert ovenfor. Slike cellebindende konjugater fremstilles ved kjente fremgangsmåter som modifikasjon av de monoklonale antistoffene med suksinimidylpyridylditiopropionat (SPDP) (Carlsson et al., 173, Biochem. J., 723-737 (1978)). Den resulterende tiopyridylgruppen blir deretter erstattet med behandling med tiolinneholdende derivat for å gi disulfidbundne konjugater. Konjugatene som inneholder 1 til 10 derivater bundet via en disulfidbro blir lett fremstilt ved denne fremgangsmåten. Konjugering ved denne fremgangsmåten er fullt beskrevet i US patentn 5 585 499, som er innbefattet med referanse.

Ifølge et foretrukket aspekt, er det cellebindende middelet et antistoff, særlig et monoklonalt antistoff.

Ifølge et annet foretrukket aspekt er det cellebindende middelet et antigenspesifikt antistoffragment, slik som sFv, Fab, Fab' eller $F(ab')_2$.

Ifølge en ytterligere gjenstand, angår foreliggende oppfinnelse også farmasøytiske sammensetninger som innbefatter et konjugatmolekyl ifølge oppfinnelsen eller en forbindelse ifølge oppfinnelsen som definert ovenfor sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer.

Det er beskrevet en fremgangsmåte for avliving eller inhibering av vekst av celler, foretrukket valgte cellepopulasjoner som innbefatter å bringe målcellene eller vevet som inneholder målcellene i kontakt med en effektiv mengde av den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen.

Den valgte cellepopulasjonen er de kreft og/eller proliferative cellene.

"Selektiv behandling av kreft" refererer til avlivning av kreft og/eller proliferative celler i det vesentlige uten å avlive normale og/eller ikke-proliferative celler.

Ifølge en ytterligere gjenstand angår foreliggende oppfinnelse også anvendelse av et konjugatmolekyl ifølge oppfinnelsen eller en forbindelse ifølge oppfinnelsen som definert ovenfor for fremstilling av et medikament for behandling av kreft.

Fremgangsmåten for inhibering av vekst av valgte cellepopulasjoner kan praktiseres in vitro, in vivo eller ex vivo.

Eksempler på in vitro-anvendelser inkluderer behandlinger av cellekulturer for å avlive alle celler unntatt de ønskede variantene som ikke uttrykker målantigener; eller for å avlive varianter som uttrykker uønsket antigen.

Betingelsene for ikke-klinisk in vitro-anvendelse bestemmes lett av fagmannen.

Eksempler på ex vivo-anvendelse inkluderer behandlinger av autolog benmarg før deres transplantering til samme pasient for å avlive syke eller malignante celler: behandlinger av benmarg før deres transplantasjon for å avlive kompetente T-celler og hindre transplantat-versus-vertssykdom (GVHD).

Klinisk ex vivo-behandling for å fjerne tumorceller eller lymfoidceller fra benmarg før autolog transplantasjon ved kreftbehandling eller ved behandling av autoimmun sykdom eller for å fjerne T-celler og andre lymfoide celler fra allogen benmarg eller ben før transplantasjon for å hindre GVHD, kan utføres som følger. Benmarg høstes fra pasienten eller annet individ og innkuberes deretter i medium som inneholder serum til hvilket det er tilsatt det cytotoksiske middelet ifølge oppfinnelsen, hvor konsentrasjoner varierer fra ca. 10 μM til 1 pM, i ca. 30 minutter i ca. 48 timer ved ca. 37°C. De eksakte betingelsene når det gjelder konsentrasjon og innkuberingstid (=dose) kan lett bestemmes av fagmannen. Etter innkubering blir benmargscellene vasket med medium

som inneholder serum og innkuberes til pasienten ved i.v.-infusjon i henhold til kjente fremgangsmåter. I tilfeller der pasienten mottar annen behandling slik som en runde med ablativ kjemoterapi eller total kroppsbestråling mellom høstningstidspunktet for benmarg og reinfusjon av de behandlede cellene inn i de behandlede margcellene lagret frosset i flytende nitrogen ved anvendelse av standard medisinsk utstyr.

For klinisk in vivo-anvendelse vil det cytotoksiske middelet ifølge oppfinnelsen leveres som løsninger som testes for sterilitet og for endotoksinnivåer eller som et lyofilisert faststoff som kan gjenoppløses i sterilt vann for injeksjon. Eksempler på egnede protokoller for konjugatadministrasjon er som følger. Konjugater blir gitt ukentlig i 6 uker som en i.v.-bolus. Bolusdoser gis i 50 til 400 ml normalt saltvann til hvilket humant serumalbumin (for eksempel 0,5 til 1 ml av en konsentrert løsning av humant serumalbumin, 100 mg/ml) kan tilsettes. Doseringer vil være ca. 50 µg til 10 mg/kg kroppsvekt per uke, i.v. (område på 10 µg til 100 mg/kg per injeksjon). 6 uker etter behandling kan pasienten motta et andre behandlingsforløp. Spesifikke kliniske protokoller med hensyn til administrasjonsrute, eksipienter, fortynningsmidler, doseringer, tidsperioder etc. kan bestemmes av fagmannen slik den kliniske situasjonen berettiger.

Eksempler på medisinske tilstander som kan behandles i henhold til in vivo- eller ex vivo-fremgangsmåtene for avlivning av valgte cellepopulasjoner inkluderer malignans av en hvilken som helst type som for eksempel inkluderer kreft i lunge, bryst, kolon, prostata, nyre, bukspyttkjertel, eggstokk og lymfeorganer; melanomer; autoimmune sykdommer, slik som systemisk lupus, reumatoid artritt og multippel sklerose; transplantatrejeksjon, slik som renal transplantatrejeksjon, levertransplantat rejeksjon, lungetransplantat rejeksjon, hjertetransplantat rejeksjon og benmargtransplantat rejeksjon; transplantat-versus-vertssykdom; virale infeksjoner slik som CMV-infeksjon, HIV-infeksjon, AIDS etc.; bakteriell infeksjon og parasittinfeksjoner, slik som giardiasi, amoebiasi, schistosomiasi og andre slik det bestemmes av fagmannen.

Identifikasjonen av de subjektene som trenger behandling for i heri beskrevne sykdommer og tilstander er godt inennfor fagmannens kunnskap. En veterinær eller en lege med fagmannens kunnskap kan lett identifisere, ved anvendelse av kliniske tester, fysiske undersøkelser, medisinsk/familiehistorie eller biologiske og diagnostiske tester, de subjektene som trenger slik behandling.

En terapeutisk effektiv mengde kan lett bestemmes av ansvarlig diatnostikker, som en med fagmannens kunnskap, ved anvendelse av vanlige teknikker og ved å observere resultater oppnådd under analoge omstendigheter. Ved bestemmelse av den terapeutisk effektive mengden kan et antall faktorer leveres av ansvarlig diagnostiker, som inkluderer, men er ikke begrenset til: arten av subjektet; dets størrelse, alder og generell helse; den spesifikke sykdommen som er involvert; grad av involvering og alvorlighet av sykdommen; responsen til det individuelle subjektet; den bestemte forbindelsen administreres; administrasjonsmåte; biotilgjengelighets karakteristikkene til det administrerte preparatet; det valgte doseringsregimet; anvendelse av samtidig medisinering og andre relevante omstendigheter.

Mengden av en forbindelse ifølge oppfinnelsen som beskrevet ovenfor eller konjugat, som er påkrevet for å oppnå den ønskede biologiske effekten vil variere avhengig av et antall faktorer, som inkluderer de kjemiske karakteristikkene (for eksempel hydrofobisitet) til forbindelsene som anvendes, potensialet til forbindelsene, type sykdom, art til hvilken pasienten tilhører, sykdomstilstanden til pasienten, administrasjonsruten, biotilgjengeligheten til forbindelsen ved den valgte ruten, hvor alle er faktorer som dikterer de påkrevde doseringsmengdene, levering og regime for administrasjon.

"Farmasøytisk" eller "farmasøytisk akseptabel" refererer til molekylære bestanddeler og sammensetninger som gir en uheldig, allergisk eller annen uønsket reaksjon ved administrasjon til et dyr, eller et menneske, slik det er passende.

Slik det anvendes heri inkluderer "farmasøytisk akseptabel eksipient" en hvilken som helst bærer, fortynningsmiddel, adjuvans eller vehikkel, slik som konserveringsmiddel eller antioksidant, fyllstoff, desintegreringsmidler, fuktemidler, emulgeringsmidler, suspenderingsmidler, løsemidler, dispergeringsmedia, belegg, antibakterielle og antifungale midler, isotone og absorpsjonsforsinkende midler og lignende. Anvendelse av slikt media og midler for farmasøytisk aktive substanser er godt kjente i litteraturen. Unntatt der eventuelt vanlige media eller middelet er inkompatibelt med den aktive ingrediensen, er anvendelse i de terapeutiske sammensetningene omfattet. Ytterligere aktive ingredienser kan også inkorporeres i sammensetningene som egnede terapeutiske kombinasjoner.

I sammenheng med foreliggende oppfinnelse betyr begrepet "behandle" eller "behandling", slik det anvendes heri, reversering, lindring, inhibering av fremskritt av

eller hindring av forstyrrelsen eller tilstanden som begrepet gjelder for, eller et eller flere symptomer på slik forstyrrelse eller tilstand.

"Terapeutisk effektiv mengde" betyr en mengde av en forbindelse/medikament ifølge oppfinnelsen effektivt for å hindre eller behandle den heri refererte patologiske tilstanden.

Ifølge oppfinnelsen er begrepet "pasient" eller "pasient som trenger det" tiltenkt for et dyr eller et menneske som er berørt av eller som trolig vil bli berørt av den heri refererte patologiske tilstanden. Foretrukket er pasienten et menneske.

Generelt kan forbindelsene ifølge oppfinnelsen bli tilveiebrakt i vandig fysiologisk bufferløsning som inneholder 0,1 til 10% vekt/volum forbindelse for parenteral administrasjon. Typiske doseringsområder er fra 1 µg/kg til 0,1 g/kg kroppsvekt per dag; en foretrukket dose er i området fra 0,01 mg/kg til 10 mg/kg kroppsvekt per dag, eller ekvivalent dose for et menneskebarn. Den foretrukne doseringen av legemiddelet som administreres avhenger trolig av slike variabler som type og omfang av progresjon av sykdommen eller forstyrrelsen, den totale helsestatusen til den bestemte pasienten, den relative biologiske effektiviteten til den valgte forbindelsen, formuleringen av forbindelsen, administrasjonsrute (intravenøs, intramuskulær eller annen), de farmakokinetiske egenskapene til forbindelsen ved den valgte leveringsruten og hastigheten (bolus eller kontinuerlig infusjon) og regime for administrasjon (antall repeteringer i løpet av en gitt tidsperiode).

Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan også administreres i enhetsdoseformer, hvori begrepet "enhetsdose" betyr en enkelt dose som kan administreres til en pasient og som lett kan håndteres og pakkes, som holder seg som en fysisk og kjemisk stabil enhetsdose som innbefatter enten den aktive forbindelsen i seg selv eller som en farmasøytisk akseptabel sammensetning, som beskrevet i det følgende. Som sådan er typiske totale doseringsområder fra 0,01 til 100 mg/kg kroppsvekt. Som en generell retningslinje varierer enhetdoser for mennesker fra 1 mg til 3000 mg per dag. Foretrukket er enhetsdoseområdet fra 1 til 500 mg administrert 1 til 6 ganger daglig, enda mer foretrukket fra 10 til 500 mg, en gang daglig. Forbindelser tilveiebrakt heri kan formuleres til farmasøytiske sammensetninger med sammenblanding med en eller flere farmasøytisk akseptable eksipienter. Slike enhetsdosesammensetninger kan fremstilles for anvendelse ved oral administrasjon, særlig i form av tabletter, enkle kapsler eller myke gelkapsler; eller intranasalt, særlig i form av pulvere, nasale dråper eller aerosoler,

eller dermalt, for eksempel topisk i salver, kremer, lotioner, geler eller sprayer, eller via transdermale plastere.

Sammensetningene kan hensiktsmessig administreres i enhetsdoseringsform og kan fremstilles ved en hvilken som helst av fremgangsmåtene kjente i farmasøytisk litteratur, for eksempel slik som beskrevet i Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20. utgave; Gennaro, A.R., red.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000.

Foretrukne formuleringer inkluderer farmasøytiske sammensetninger hvori en forbindelse ifølge oppfinnelsen formuleres for oral eller parenteral administrasjon.

For oral administrasjon kan tabletter, piller, pulvere, kapsler, trocheer og lignende inneholde en eller flere av følgende ingredienser, eller forbindelser av tilsvarende type: et bindemiddel slik som mikrokrystallinsk cellulose eller gummi tragakant; et fortynningsmiddel slik som stivelse eller laktose; et disintegreringsmiddel slik som stivelse og cellulosederivater; et smøremiddel slik som magnesiumstearat; et glidemiddel slik som kolloidal silisiumdioksid; et søtningsmiddel slik som sukkrose eller sakkarin; eller et smaksstoff slik som peppermynte eller metylsalicylat. Kapsler kan være i form av en hard kapsel eller en myk kapsel, som generelt fremstilles fra gelatinblandinger eventuelt blandet med mykgjørere, så vel som en stivelseskapsel. I tillegg kan doseringsenhetsformer inneholde forskjellige andre materialer som modifiserer den fysiske formen til doseringsenheten, for eksempel belegg av sukker, skjellakk eller enteriske midler. Andre orale doseringsformer av sirup eller eliksir kan inneholde søtningsstoffer, konserveringsmidler, fargestoffer og smaksstoffer. I tillegg kan de aktive forbindelsene inkorporeres i raskt-oppløsende, modifisert frigivelse eller vedvarende frigivelsespreparater og formuleringer, og hvori slike vedvarende frigivelsesformuleringer foretrukket er bimodale. Foretrukne tabletter inneholder laktose, maisstivelse, magnesiumsilikag, kroskarmellosenatrium, povidon, magnesiumstearat eller talkum i en hvilken som helst kombinasjon.

Flytende preparater for parenteral administrasjon inkluderer sterile vandige eller ikke-vandige løsninger, suspensjoner og emulsjoner. Væskesammensetningene kan også inkludere bindemidler, buffere, konserveringsmidler, chelatineringsmidler, søtningsstoffer, smaksstoffer og fargestoffer og lignende. Ikke-vandige løsemidler inkluderer alkoholer, propylenglykol, polyetylenglykol, vegetabilske oljer slik som olivenolje og organiske estere slik som etyloleat. Vandige bærere inkluderer blandinger

av alkoholer og vann, bufret media og saltvann. Særlig kan biokompatibel, bionedbrytbar laktidpolymer, laktid/glykolid kopolymer eller polyoksyetylen-polyoksypropylen kopolymerer er anvendelige eksipienter for å kontrollere frigivelsen av de aktive forbindelsene. Intravenøse vehikler kan inkludere ernærings etterfyllingsløsninger, elektrolytt etterfyllingsløsninger, slik som de som er basert på Ringers dekstrose, og lignende.

Andre potensielt anvendelige, parenterale leveringssystemer for disse aktive forbindelsene inkluderer etylen-vinylacetat kopolymerpartikler, osmotiske pumper, implanterbare infusjonssystemer og liposomer.

Alternative administrasjonsmåter inkluderer formuleringer for inhalasjon, som inkluderer slike midler som tørrpulver, aerosol eller dråper. De kan være vandige løsninger som inneholder for eksempel polyoksyetylen-9-lauryleter, glykokolat og deoksykolat, eller oljeløsninger for administrasjon i form av nasale dråper eller som en gel som påføres intranasalt. Formuleringer for bukkal administrasjon inkluderer for eksempel lozenger eller pastiller, og kan også inkludere en smakstilsatt base slik som sukkrose eller akasia, og andre eksipienter slik som glykokolat. Formuleringer egnet for rektal administrasjon blir foretrukket presentert som enhetsdose stikkpiller, med en faststoffbasert bærer, slik som kakaosmør, og kan inkludere et salicylat. Formuleringer for topisk påføring til huden har foretrukket form av en salve, krem, lotion, pasta, gel, spray, aerosol eller olje. Bærere som kan anvendes inkluderer petroleumgele, lanolin, polyetylenglykoler, alkoholer eller deres kombinasjoner. Formuleringer egnet for transdermal administrasjon kan presenteres som adskilte plastere og kan være lipofile emulsjoner eller bufrede, vandige løsninger, løst opp og/eller dispergert i en polymer eller et adhesiv.

Figur 1a angir in vitro-potensialet til huB4-SPDB-forbindelsen i eksempel 16 ovenfor antigenpositive BJAB-celler og antigennegative MOLT-4-celler.

Figur 1b angir in vitro-potensialet til huB4-SMCC-forbindelsen i eksempel 16 ovenfor antigenpositive BJAB-celler og antigennegative MOLT-4-celler.

Figur 1c angir in vitro-potensialet til fri forbindelse i eksempel 16 ovenfor BJAB og MOLT-4-celler.

Figur 2a angir in vitro-potensialet til huB4-SPDB-forbindelsen i eksempel 17 ovenfor antigenpositive BJAB-celler og antigennegative MOLT-4-celler.

Figur 2b angir in vitro-potensialet til huB4-SMCC-forbindelsen i eksempel 17 ovenfor antigenpositive BJAB-celler og antigennegative MOLT-4-celler.

Figur 2c angir in vitro-potensialet til fri forbindelse i eksempel 17 ovenfor BJAB og MOLT-4-celler.

Figur 3a angir in vitro-potensialet til huMy9-6-SPDB-forbindelsen i eksempel 16 ovenfor antigenpositive HL60/GC-celler og antigennegative Ramos-celler.

Figur 3b angir in vitro-potensialet til fri forbindelse i eksempel 16 ovenfor HL60/GC og Ramos-celler.

Eksperimentell del

- Fremgangsmåte A1: Høytrykks væskekromatografi-massespektrometri (LCMS) Et Micromass MassLynx software anvendes og analyse utføres på en Agilent 1100-serie HPLC med en THERMO Hypersil Gold C18 3 µm kolonne (50 x 3 mm) ved anvendelse av gradienteluering med en blanding av (A) acetonitril og (B) vann/0,1% maursyre (gradient: 5% A : 95% B opp til 95% A : 5% B i løpet av 5 minutter, 95% A : 5% B i 0,5 minutter, 95% : 5% B ned til 5% A : 95% B i løpet av 1 minutt, 5% A : 95% B i 0,5 minutter) med en 0,8 ml/minutt strømningshastighet; Waters-Micromass Platform I, Platform II eller ZQ-spektrometer med elektrospray (positiv og negativ ionisasjon); in line diodeoppstilling (190-490 nm); hjelpedetektor Sedere (Frankrike) Modell SEDEX 65 fordampende lyssprednings (ELS) detektor.

- Fremgangsmåte A2: Høytrykks væskekromatografi-massespektrometri (LCMS) Et Micromass MassLynx software anvendes og analyse utføres på en Waters Alliance HPLC med en WATERS XBridge C18, 3,5 µm kolonne (100 x 3 mm) ved anvendelse av gradienteluering med en blanding av (A) metanol og (B) vann/0,1% maursyre (gradient: 5% A : 95% B opp til 95% A : 5% B i løpet av 10 minutter, 95% A : 5% B ned til 5% A : 95% B i løpet av 1 minutt, 5% A : 95% B i 2 minutter) med en 1,1 ml/minutt strømningshastighet; Waters-Micromass Platform II-spektrometer med elektrospray (positiv og negativ

ionisasjon); in line diodeoppstilling (190-500 nm); hjelpedetektor Sedere (Frankrike) Modell SEDEX 85 fordampende lysspredningss (ELS) detektor.

- Fremgangsmåte A3: Høytrykks væskekromatografi-massespektrometri (LCMS)
Et Micromass MassLynx software anvendes og analyse utføres på en Agilent 1100-serie HPLC med en XBridge C18 2,5 µm kolonne (50 x 3 mm) ved anvendelse av gradienteluering med en blanding av (A) acetonitril og (B) vann/0,1% maursyre (gradient: 5% A : 95% B opp til 100% A i løpet av 5 minutter, 100% A i 0,5 minutter, 100% A ned til 5% A : 95% B i løpet av 1 minutt, 5% A : 95% B i 0,5 minutter) med en 1,1 ml/minutt strømningshastighet; Waters-Micromass ZQ-spektrometer med elektrospray; in line diodeoppstilling (210-254 nm).

- Fremgangsmåte B: Høytrykks væskekromatografi (HPLC)-rensing
HPLC-rensing ble utført med en Macherey Nagel Nucleodur C18 gravimetri 5 µm kolonne (21 x 100 mm, katalog nr. 762101), eluert med en blanding av (A) acetonitril og (B) vann (gradient: 5% A :)5% B i 5 minutter, 5% A : 95% B opp til 100% A i løpet av 20 minutter, 100% A i 8 minutter, 100% A til 5% A : 95% B i løpet av 1 minutt, 5% A : 95% B i 11 minutter) med en 15 ml/minutt strømningshastighet (Fremgangsmåte B1) eller 20 ml/minutt (Fremgangsmåte B2).

- Fremgangsmåte C: Elektronionisasjon (EI) massespektra
EI-massespektra ble avlest ved anvendelse av et Finnigan SSQ 7000 massespektrometer (EI-modus: 70 eV, kildetemperatur = 150°C, direkte introduksjon).

- Fremgangsmåte D: Kjemisk ionisasjon (CI) massespektra
CI-massespektra ble avlest ved anvendelse av et Finnigan SSQ 7000 massespektrometer (ammoniakk).

- Fremgangsmåte E: ^{1}H kjernemagnetisk resonnans (NMR) spektra
^{1}H NMR-spektra ble avlest på enten et Bruker Avance Drx-500, et Bruker Avance Drx-400 eller et Bruker Avance DRX-300-spektrometer.

- Fremgangsmåte F: Høytrykks væskekromatografi (HPLC) rensing

HPLC-rensing ble utført på en Macherey Nagel VP 250/40 mm NUCLEODUR GRAVITY 100 – 10 C18 (katalog nr. 762250), eluert med en blandign av (A) acetonitril og (B) vann/$HCOONH_4$ 0,01M / NH_4OH pH 9-10 (gradient: 10% A : 90% B i 3 minutter, 10% A : 90% B opp til 95% A : 5% B i løpet av 37 minutter, 95% A : 5% B i 8 minutter, 95% A : 5% B til 10% A : 90% B i løpet av 1 minutt, 10% A : 90% B i 1 minutt) med en 70 ml/minutt strømningshastighet.

- Fremgangsmåte G1: Høytrykks væskekromatografi-massespektrometri (LCMS) Et Micromass MassLynx software anvendes og analyse utføres på en Acquity UPLC med en Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm-kolonne (2,1 x 100 mm) ved anvendelse av en gradienteluering med en blanding av (A) acetonitril og (B) vann / 0,1% maursyre (gradient: 5% A : 95% B opp til 95% A : 5% B i løpet av 4,7 minutter, 95% A : 5% B ned til 5% A : 95% B i løpet av 0,5 minutter, 5% A : 95% B i løpet av 0,8 minutter) med en 1,1 ml/minutt strømningshastighet; Quattro Premier spektrometer med elektrospray; in line diodeoppstilling (210-400 nm).
- Fremgangsmåte G2: Høytrykks væskekromatografi-massespektrometri (LCMS) Et Micromass MassLynx software anvendes og analyse utføres på en Acquity UPLC med en Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm-kolonne (2,1 x 100 mm) ved anvendelse av en gradienteluering med en blanding av (A) acetonitril og (B) vann / 0,1% maursyre (gradient: 5% A : 95% B opp til 95% A : 5% B i løpet av 10 minutter, 95% A : 5% B ned til 5% A : 95% B i løpet av 1 minutt, 5% A : 95% B i 2 minutter) med en 0,6 ml/minutt strømningshastighet; Quattro Premier spektrometer med elektrospray; in line diodeoppstilling (210-400 nm).

- Fremgangsmåte H: Høytrykks væskekromatografi (HPLC) rensefremgangsmåte HPLC-rensing ble utført på en Varian HPLC ved anvendelse av en Kromasil 16 µm C18-kolonne (250 x 21,2 mm, PN A0490-250 x 212, Lot nr. DT0259, SN 9772196), eluert med en blanding av (A) vann og (B) acetonitril med en 20 ml/minutt strømningshastighet. Oppsamlingsstørrelse var 80 sekunder. Massespektra til forbindelsene ble oppnådd på et Bruker Esquire 3000 instrument. NMR-spektra ble anvendt på et Bruker Avance spektrometer som ble operert ved 400 MHz.

Gradienter for eluering av kolonnen:

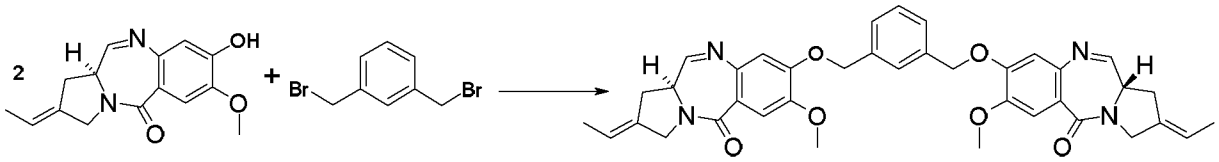
1. Rensing av 8,8'-[5-(N-4-metylditio-4,4-dimetylbutanoyl)amino-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]
55% A : 45 B i 8 minutter, 55% A : 45% B til 50% A : 50% B i løpet av 14 minutter, 50% A : 50% B til 10% A : 90% B i løpet av 4 minutter, 10% A : 90% B i 5 minutter, 10% A : 90% B til 55% A : 45% B i løpet av 1 minutt, 55% A : 45% B i 3 minutter.

2. Rensing av 8,8'-[5-(N-4-merkapto-4,4-dimetylbutanoyl)amino-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]
60% A : 40 B i 4 minutter, 60% A : 40% B til 55% A : 45% B i løpet av 5 minutter, 55% A : 45% B i 4 minutter, 55% A : 45% B til 50% A : 50% B i løpet av 13 minutter, 50% A : 50% B til 10% A : 90% B i løpet av 10 sekunder, 10% A : 90% B i 5 minutter, 10% A : 90% B til 60% A : 40% B i løpet av 10 sekunder, 60% A : 40% B i 3 minutter.

3. Rensing av 8,8'-[5-(N-metyl-N-(2-metylditio-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-benzendiyl(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11^a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]
60% A : 40% B i 8 minutter, 60% A : 40% B til 45% A : 55% B i løpet av 16 minutter, 45% A : 55% B til 10% A : 90% B i løpet av 2 minutter, 10% A : 90% B i 5 minutter, 10% A : 90% B til 60% A : 40% B i løpet av 1 minutt, 60% A : 40% B i 3 minutter.

4. Rensing av 5,5'-[5-(N-metyl-N-(2-merkapto-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-benzendiyl(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]
65% A : 35% B til 60% A : 40% B i løpet av 8 minutter, 60% A : 40% B til 50% A : 50% B i løpet av 19 minutter, 50% A : 50% B til 10% A : 90% B i løpet av 10 sekunder, 10% A : 90% B i 5 minutter, 10% A : 90% B til 65% A : 35% B i løpet av 10 sekunder, 65% A : 35% B i 3 minutter.

Referanseeksempel 1: **8,8'-[1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]**

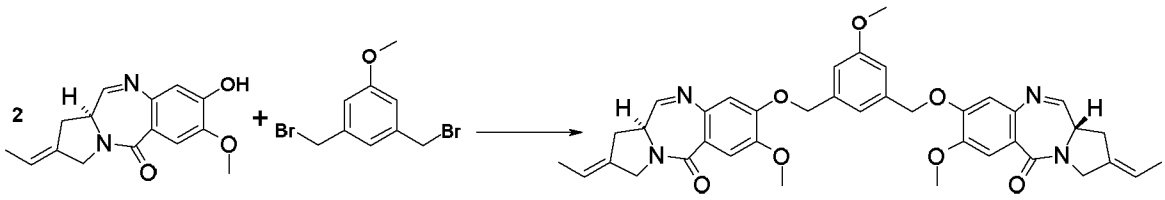


Kaliumkarbonat (22,8 mg), α,α'-dibrom-m-xylen (7,3 mg) og kaliumjodid (9,1 mg) ble tilsatt til en rørt løsning av pre-tomaymycin (15 mg) i dimetylformamid (0,5 ml). Reaksjonsblandingen ble rørt i 20 timer ved 30°C. Faststoff ble filtrert fra, vasket to ganger med dimetylformamid (0,2 ml) og deretter kastet. Vann (0,4 ml) ble tilsatt til den kombinerte dimetylformamidløsningen og den resulterende løsningen ble injisert for HPLC-rensing i henhold til Fremgangsmåte B1. Passende fraksjoner ble kombinert og konsentrert ved sentrifugal fordampning over en Jouan Modell RC10.10.-apparatur som ga 8,8'-[1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] som et hvitt pulver (3,33 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform II): ES: m/z = 647 MH, Retensjonstid = 3,53 minutter.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$-d1, δ i ppm): 1,75 (d, J = 7,0 Hz, 6H) ; 2,96 (m, 4H) ; 3,89 (m, 2H) ; 3,96 (s, 6H) ; 4,27 (s bred, 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) ; fra 7,36 til 7,43 (m, 3H); 7, 51 (s bred, 1H) ; 7,53 (s, 2H) ; 7,63 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

Referanseeksempel 2: 8,8'-[5-metoksy-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]



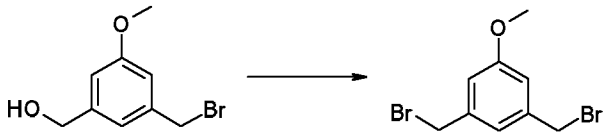
8,8'-[5-metoksy-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] ble fremstilt ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 8,8'-[1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-

c][1,4]benzodiazepin-5-on] (Eksempel 1), med utgangspunkt i 1,3-bisbrommetyl-5-metoksybenzen:

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform II): ES : m/z = 677 MH^+, Retensjonstid = 4,17 minutter.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$-d1, δ i 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 bred, 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 bred, 2H) ; 7,07 (s bred, 1H) ; 7,53 (s, 2H) ; 7,63 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

1,3-bis-brommetyl-5-metoksybenzen kan fremstilles som følger:

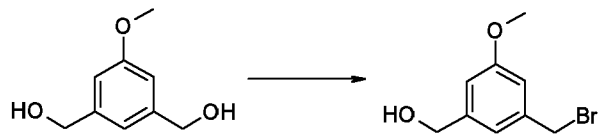


Karbontetrabromid (663 mg) ble tilsatt til en rørt løsning av 1-brommetyl-3-hydroksymetyl-5-metoksybenzen (420 mg) i vannfri diklormetan (10 ml) under argon. Etter avkjøling av den resulterende løsningen til 0°C ble en løsning av trifenylfosfin (500 mg) i vannfri diklormetan (10 ml) tilsatt dråpevis. Reaksjonsblandingen ble rørt ved romtemperatur i 20 timer og deretter konsentrert i vakuum til et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Merck Super VarioFlash 30 g kolonne, Si60 15-40 µm, eluert med diklormetan/heptan, 40:60) som ga 1,3-bis-brommetyl-5-metoksybenzen (170 mg):

EI (Fremgangsmåte C):	m/z = 292	M^+.
	m/z = 213	$[M - Br]^+$.
	m/z = 134	$[213 - Br]^+$.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): 3,77 (s, 3H) ; 4,65 (s, 4H) ; 6,98 (s bred, 2H) ; 7,10 (s bred, 1H).

1-brommetyl-3-hydroksymetyl-6-metoksybenzen kan fremstilles som følger:

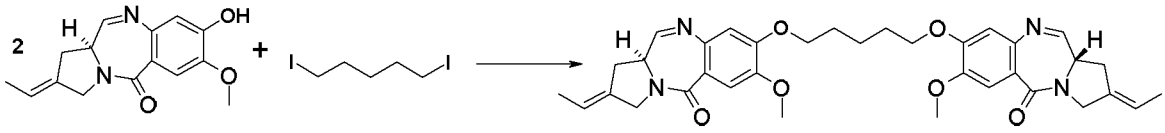


Karbontetrabromid (3,47 g) ble tilsatt til en rørt løsning av 1,3-dihydroksymetyl-5-metoksybenzen (800 mg) i vannfri diklormetan (16 ml) under argon. Etter avkjøling av den resulterende løsningen til 0°C ble en løsning av trifenylfosfin (2,68 g) i vannfri diklormetan (16 ml) tilsatt dråpevis. Reaksjonsblandingen ble rørt ved romtemperatur i 20 timer og deretter konsentrert i vakuum til et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Merck SuperVarioPrep 90 g kolonne, Si60, 15-40 µm, eluert med metanol/diklormetan, 4:96) som ga 1-brommetyl-3-hydroksymetyl-5-metoksybenzen (420 mg):

EI (Fremgangsmåte C): m/z = 230 M^+.
M(z = 151 $[M - Br]^+$.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): 3,75 (s, 3H) ; 4,46 (d bred, J = 5,5 Hz, 2H) ; 4,65 (s, 2H) ; 5,22 (t bred, J = 5,5 Hz, 1H) ; 6,83 (s bred, 1H) ; 6,88 (s bred, 1H) ; 6,97 (s bred, 1H).

Referanseeksempel 3: 8,8'-[1,5-pentandiylbis(oksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-5-on]



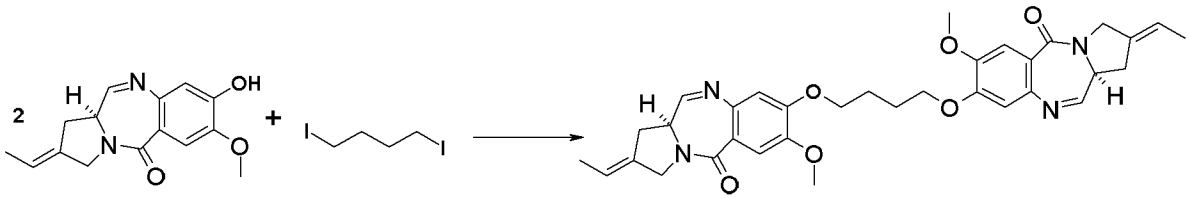
Kaliumkarbonat (22,8 mg) og 1,5-dijodpentan (8,2 µl) ble tilsatt til en rørt løsning av pre-tomaymycin (15 mg) i dimetylformamid (0,5 ml). Reaksjonsblandingen ble rørt i 20 timer ved romtemperatur og en ytterligere porsjon kaliumkarbonat (8 mg) ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble rørt i ytterligere 20 timer ved romtemperatur.

Faste stoffer ble filtrert fra og dimetylformamidløsningen ble injisert for HPLC-rensing i henhold til fremgangsmåte B2. Passende fraksjoner ble kombinert og konsentrert ved sentrifugal fordampning over en Jouan modell RC10.10-apparatur som ga 8,8'-[1,5-pentandiylbis(oksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] som et hvitt pulver (4 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte A2): ES : m/z = 613 MH^+, Retensjonstid = 9,04 minutter.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$-d1, δ i ppm): 1,66 (m delvis maskert, 2H) ; 1,75 (d bred, J = 7,0 Hz, 6H) ; 1,96 (m, 4H) ; 2,97 (d bred, J = 7,0 Hz, 4H) ; 3,89 (m, 2H) ; 3,94 (s, 6H) ; 4,06 (m, 2H) ; 4,13 (m, 2H) ; 4,26 (s bred, 4H) ; 5,60 (m, 2H) ; 6,80 (s, 2H) ; 7,50 (s, 2H) ; 7,66 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

Referanseeksempel 4: **5,5'-[1,4-butandiylbis(oksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]**

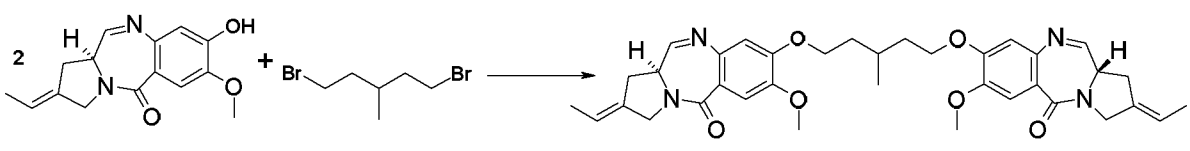


8,8'-[1,4-Butandiylbis(oksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 8,8'-[1,5-pentandiylbis(oksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (Eksempel 3), med utgangspunkt 1,4-dijodbutan:

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform II): ES : m/z = 599 MH^+, m/z = 318,5 $(M + H + K)^{2+}$ / 2, Retensjonstid = 3,23 minutter.

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

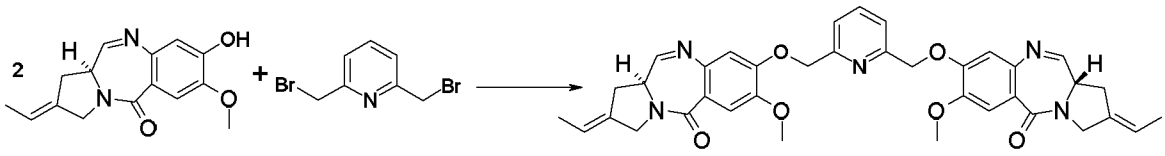
Referanseeksempel 5: **8,8'-[3-metyl-1,5-pentandiylbis(oksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on**



8,8'-[3-metyl-1,5-pentandiylbis(oksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 8,8'-[1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (Eksempel 1), med utgangspunkt i 1,5-dibrom-3-metylpentan:

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform II): ES: m/z = 627 MH^+, Retensjonstid: 3,92 minutter.

Referanseeksempel 6: 8,8'-[2,6-pyridindiylbis(oksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]



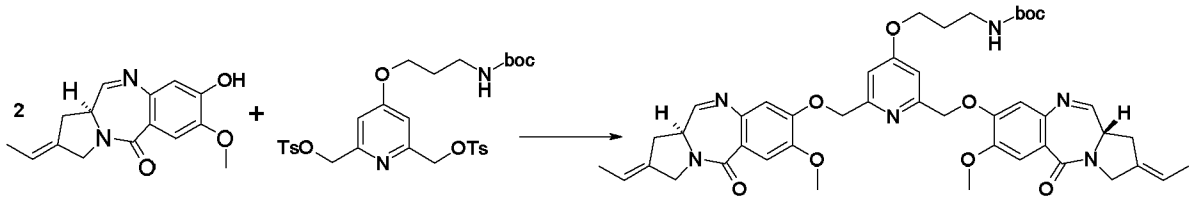
8,8'-[2,6-pyridindiylbis(oksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzidiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 8,8'-[1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (Eksempel 1), med utgangspunkt i 2,6-bis-brommetylpyridin:

LC/MS (Fremgangsmåte A1, ZQ): ES: m/z = 648 MH^+, Retensjonstid = 3,21 minutter.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$-d1, δ i ppm): 1,75 (d bred, J = 6,5 Hz, 6H) ; fra 2,94 til 2,99 (m, 4H) ; 3,90 (m, 2H) ; 3,99 (s, 6H) ; 4,27 (s bred, 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).

Eksempel 7: 8,8'-[4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropyloksy)-2,6-pyridiniylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

Kan fremstilles som følger:



Til en rørt løsning av pre-tomaymycin (30 mg) i dimetylformamid (0,5 ml), ble det tilsatt kaliumkarbonat (45,7 mg), en løsning av 4-(3-tert-butoksykarbonylamionopropoksy)-2,6-bis(tosyloksymetyl)-pyridin (41 mg) i dimetylformamid (0,5 ml) og kaliumjodid (18,3 mg). Reaksjonsblandingen ble rørt i 20 timer ved 30°C. Faste stoffer ble filtrert fra og vasket med dimetylformamid (0,2 ml). Vann (0,5 ml) ble tilsatt til den kombinerte dimetylformamidløsningen og maursyre ble tilsatt til fullstendig oppløsning av presipitatet. Den resulterende løsningen ble injisert for HPLC-rensing i henhold til fremgangsmåte B1. Passende fraksjoner ble kombinert og konsentrert ved sentrifugal fordampning over en Jouan Modell RC10.10-apparatur som ga 8,8'-[4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropyloksy)-2,6-pyridindiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (8,3 mg).

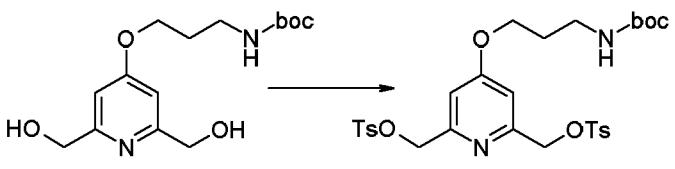
LC/MS (Fremgangsmåte A, Platform I): ES:

m/z = 857	$MH^+ + 2\ H_2O$
m/z = 839	$MH^+ + H_2O$
m/z = 821	MH^+
m/z = 721	$[M\text{-}C_5O_2H_8] + H^+$

Retensjonstid = 3,67 minutter.

^{1}H NMR (500 MHz, CD3CO2D-d4, δ i 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) ; fra 4,24 til 4,36 (m, 4H) ; 4,43 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 5,50 (s bred, 4H) ; 5,61 (m, 2H) ; fra 6,80 til 7,70 (m svært bred, 2H) ; 6,95 (s bred, 2H) ; fra 7,48 til 7,58 (m, 4H).

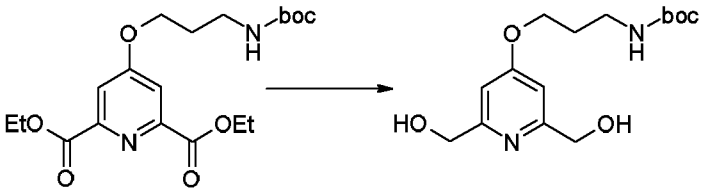
4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-2,6-bis-(tosyloksymetyl)-pyridin kan fremstilles som følger:



Til en forhåndsavkjølt (0°C) løsning av 4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin (76 mg) i diklormetan (0,7 ml) ble det tilsatt en løsning av kaliumkydroksid (30 mg) i vann (0,3 ml). Tosylklorid (93,7 mg) ble tilsatt og den resulterende heterogene blandingen ble ristet kraftig i 1 time og deretter vasket i skilletrakt ved anvendelse av diklormetan og vann. Sjiktene ble separert og vannsjiktet ekstrahert tre ganger med diklormetan. De kombinerte, organiske løsningene ble tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum til et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Interchrom Puriflash 10 g kolonne, SiOH 15-35 µm), ved anvendelse av gradienteluering med en blanding av heptan (A) og etylacetat (B) (gradient: 90% A : 10% B opp til 50% A : 50% B) som ga 4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-2,6-bis-(tosyloksymetyl)pyridin (56 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte 1, Platform I: ES: m/z = 621 MH^+
Retensjonstid = 4,90 minutter.

4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles som følger:

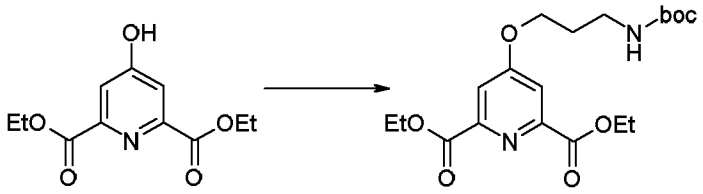


Til en løsning av 4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester (150 mg) i absolutt etanol (5 ml) ble det tilsatt natriumborhydrid (43 mg) og kalsiumklorid (128 mg). Etter røring i 4 timer stoppet hydrogenutvikling opp og reaksjonen ble stoppet med vann. Løsemiddelet ble fordampet under redusert trykk. Residuet ble deretter vasket i skilletrakt ved anvendelse av diklormetan og vann. Sjiktene ble separert og vannsjiktet ekstrahert tre ganger med diklormetan. De kombinerte, organiske løsningene ble tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum som ga 4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin (80 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte 1, ZQ): ES m/z = 313 MH^+
Retensjonstid = 1,90 minutter.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i 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 bred, J = 6,5 Hz, 1H).

4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester kan fremstilles som følger:

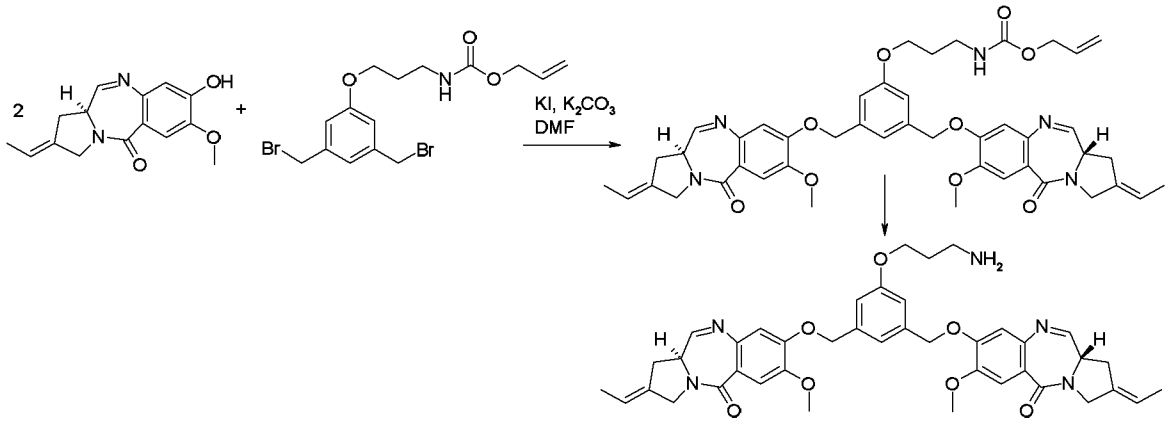


Dietylesteren av chelidamsyre (Scrimin, P., Tecilla, P., Tonellato, U., Vendrame, T., J. Org. Chem., 1989, 54, 5988) (150 mg) ble løst i tørr dimetylformamid (2 ml). 3-(tert-Butoksyamino)-propylbromid (164 mg) og kaliumkarbonat (130 mg) ble tilsatt. Den resulterende blandingen ble rørt i 15 timer ved 70°C. Reaksjonen ble stoppet med mettet ammoniumkloridvandig løsning og deretter vasket i skilletrakt ved anvendelse av etylacetat. Sjiktene ble separert og det vandige sjiktet ble ekstrahert 3 ganger med etylacetat. De kombinerte, organiske løsningene ble tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum til et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Merck SuperVarioFlash, 30 g kolonne, Si60, 15-40 µm), ved anvendelse av gradienteluering med en blanding av heptan (A) og etylacetat (B) (gradient: 60% A : 40% B opp til 50% A : 50% B) som ga 4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester (150 mg):
CI (Fremgangsmåte D): m/z = 397 MH^+.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i 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 bred, 1H) ; 7,71 (s, 2H).

Eksempel 8: 8,8'-[5-(3-aminopropyloksy)-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

Kan fremstilles som følger:

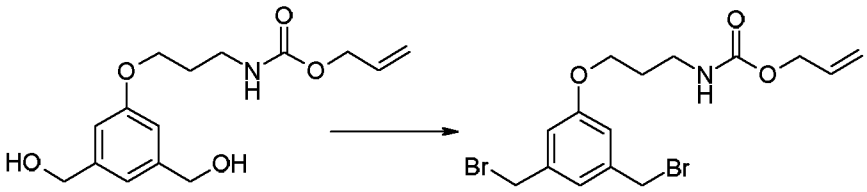


Til en rørt løsning av pre-tomaymycin (21 mg) i dimetylformamid (0,7 ml), ble det tilsatt kaliumkarbonat (32 mg), 1-(3-allyloksykarbonlyaminopropyloksy)-3,5-bis-(brommetyl)-benzen (16,2 mg) og kaliumjodid (12,8 mg). Reaksjonsblandingen ble rørt i 20 timer ved 30°C. Faste stoffer ble filtrert fra, vasket to ganger med dimetylformamid (0,2 ml) og deretter kastet. Vann (0,5 ml) ble tilsatt til den kombinerte dimetylformamidløsningen og det resulterende presipitatet ble filtrert fra, vasket med vann og tørket ved sentrifugal fordampning over en Jouan Modell RC10.10-apparatur.

Til den urene forbindelsen (27 mg) løst i dimetylformamid (0,8 ml), ble tetrakis(trifenylfosfin)palladium (2 mg), trifenylfosfin (0,9 mg) og pyrrolidin (6,5 µl) tilsatt. Etter røring i 15 timer ved 30°C ble tetrakis(trifenylfosfin)palladium (2 mg), trifenylfosfin (1 mg) og pyrrolidin (2,8 µl) tilsatt, og reaksjonsblandingen ble rørt ved romtemperatur i ytterligere 15 timer. Vann (0,4 ml) ble tilsatt dimetylformamidløsningen og maursyre ble tilsatt til fullstendig oppløsning av presipitatet. Den resulterende løsningen ble injisert for HPLC-løsning i henhold til fremgangsmåte B1. Passende fraksjoner ble kombinert og konsentrert ved sentrifugal fordampning over en Jouan Modell RC10.10.-apparatur som ga 8,8'-[5-(3-aminopropyloksy)-1,3-benzendiylbis-(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a—tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (0,2 mg).

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform II): ES: m/z = 800 MH^+
Retensjonstid = 2,84 minutter.

1-(3-Allyloksykarbonylaminopropyloksy)-3,5-bis-(brommetyl)-benzen kan fremstilles som følger:

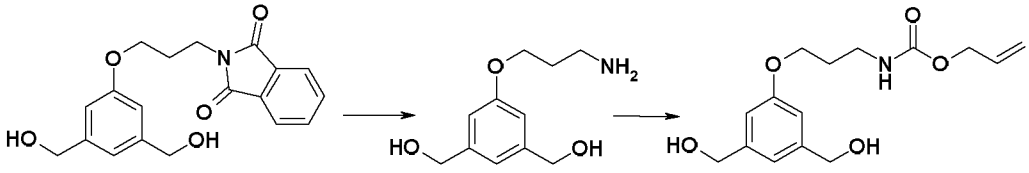


Til en suspensjon av 1-(3-allyloksykarbonylaminopropyloksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen (70 mg) i diklormetan (3 ml) ble det tilsatt karbontetrabromid (248 mg) og en løsning av trifenylfosfin (199 mg) i diklormetan (2 ml). Etter refluksering i 3 timer ble reaksjonsblandingen renset med silikagel kromatografi (Merck SuperVarioFlash, 25 g kolonne, Si60, 15-40 µm), eluert med diklormetan som ga 1-(3-allyloksykarbonylaminopropyloksy)-3,5-bis-(brommetyl)-benzen (52 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform II): ES m/z = 420 MH^+
Retensjonstid = 4,50 minutter.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): 1,85 (m, 2H) ; 3,15 (q, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,99 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; 4,46 (d bred, J = 5,5 Hz, 2H) ; 4,65 (s, 4H) ; 5,16 (d bred, J = 11,0 Hz, 1H) ; 5,26 (d bred, 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 bred, J = 6,5 Hz, 1H).

1-(3-Allyloksykarbonylaminopropyloksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles som følger:



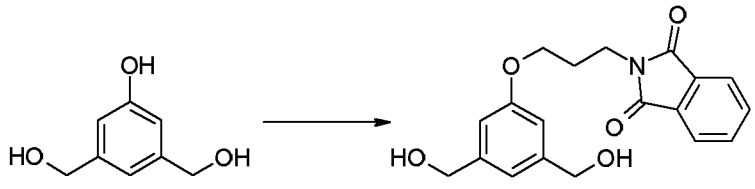
5-(3-Ftalimidopropyloksy)-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen (1,45 g) ble løst i en blanding av diklormetan og etanol (25 ml, 25 : 75). Hydrazinhydrat (0,62 ml) ble tilsatt og reaksjonsblandingen ble refluksert i 1 time. Løsemiddelet ble fjernet i vakuum og residuet løst i diklormetan. Det uløselige residuet ble filtrert fra og renset med silikagel kromatografi (Merck SuperVarioPrep 70 g kolonne, Si60, 15-40 µm), eluert med metanol/diklormetan, 20:80, deretter ammoniumhydroksid/metnaol/diklormetan, 0,5:25:75 som ga 1-(3-aminopropyloksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen (1 g) egnet for ytterligere omdanning.

En prøve av 1-(3-aminopropyloksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen (100 mg) ble løst i metanol (5 ml). Til den avkjølte løsningen (0°C) ble det tilsatt en løsning av natriumkarbonat (120 mg) i vann (5 ml) og allylklorformat (42 µl). Etter røring i 30 minutter ved 0°C ble reaksjonsblandingen rørt ved romtemperatur i ytterligere 15 timer. Løsemiddelet ble fjernet i vakuum. Residuet ble deretter vasket i skilletrakt ved anvendelse av etylacetat og vann. Sjiktene ble separert og vannsjiktet ble ekstrahert to ganger med etylacetat. De kombinerte organiske løsningene ble tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum som ga 5-(3-allyloksykarbonylaminopropyloksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)benzen (75 mg):

EI (Fremgangsmåte C): m/z = 295 M^+.
m/z = 142 $(M - C_8H_9O_3)^+$.
m/z = 41 $C_3H_5^+$.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): 1,85 (m, 2H) ; 3,14 (q, J = 6,5 Hz, 2H) ; 3,96 (t, J = 6,5 Hz, 2H) ; fra 4,41 til 4,48 (m, 6H) ; 5,11 (t delvis maskert, 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 bred, 2H) ; 6,83 (s bred, 1H) ; 7,26 (t bred, J = 6,5 Hz, 1H).

5-(3-Ftalimidopropyloksy)-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles som følger:



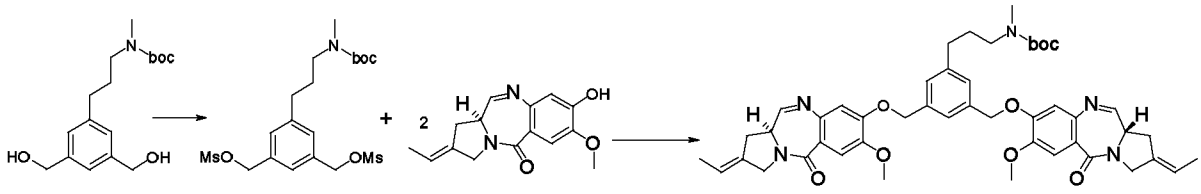
3,5-Bis-hydroksymetylfenol (Felder, D., Gutiérrez Nava, M., del Pilar Carreon, M., Eckert, J.F., Luccisano, M., Schall, C., Masson, P., Gallani, J.L., Heinrich, B., Guillon, D., Nierengarten, J.F., Helv. Chimic Acta, 2002, 85, 288) (2,35 g), N-(3-brompropyl)-ftalimid (4,49 g) i kaliumkarbonat (10,53 g) ble blandet i acetonitril (25 ml) og refluksert i 12 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til romtemperatur og løsemiddelet fjernet under redusert trykk. Residuet ble løst opp en gang til i diklormetan og det uløselige residuet filtrert fra. Filtratet ble vasket med vann, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum til et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Merck SuperVarioPrep, 90 g kolonne, Si60, 15-40 µm), eluert med metanol/diklormetan, 4:96 som ga 5-(3-ftalimidopropyloksy)-1,3-bis-(hydroksymetyl)benzen (1,45 g):

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform II): ES m/z = 342 MH^+
m/z = 324 $(MH^+ - H_2O)$
Retensjonstid = 2,90 minutter.

^1H NMR (300 MHz, DMSO-d6, δ i 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 bred, 2H) ; 6,82 (s bred, 1H) ; fra 7,80 til 7,90 (m, 4H).

Eksempel 9: 8,8'-[5-(N-metyl-3-tert-butoksykarbonylaminopropyl)-1,3-benzeniylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

Kan fremstilles som følger:



Til en avkjølt (0°C) løsning av 5-(N-metyl-3-tert-butoksykarbonylaminopropyl)-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen (50 mg) og trietylamin (113 µl) i diklormetan (2 ml), ble det tilsatt metansulfonylklorid (26 µl). Etter 30 minutter ble reaksjonsblandingen vasket to ganger med vann og den resulterende diklormetanløsningen ble tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum til en viskøs olje (50,3 mg).

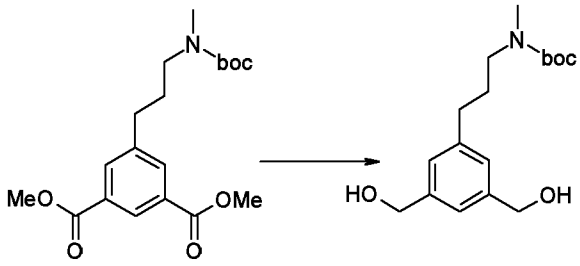
En løsning av pre-tomaymycin(15 mg) i dimetylformamid (0,5 ml) ble tilsatt til en blanding av den urene forbindelsen (13 mg), kaliumkarbonat (23 mg) og kaliumjodid (9 mg). Reaksjonsblandingen ble rørt i 20 timer ved 30°C. En annen prøve av den urene forbindelsen ble tilsatt (6 mg), og reaksjonsblandingen ble rørt i ytterligere 20 timer ved 30°C. Faste stoffer ble filtrert fra, vasket med dimetylformamid (0,2 ml) og deretter tatt ut. Vann (0,4 ml), en dråpe maursyre og ytterligere vann (1,5 ml) ble tilsatt til den kombinerte dimetylformamidløsningen.

En prøve av den resulterende suspensjonen (2 ml) ble filtrert og det resulterende faste stoffet ble tørket under vakuum som ga 8,8'-[5-(N_metyl-3-tert-butoksykarbonylaminopropyl)-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-

yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (3,1 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform II): ES: m/z = 818 MH^+
Retensjonstid = 4,11 minutter.

5-(N-metyl-3-tert-butoksykarbonylaiminopropyl)-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles som følger:

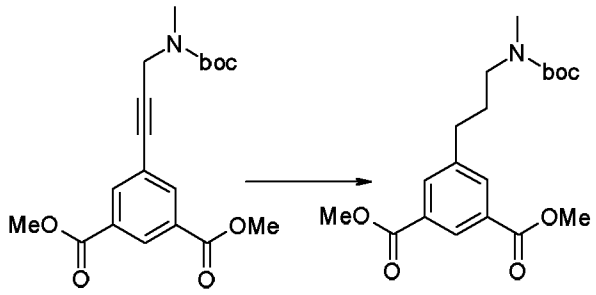


Til en avkjølt løsning (-5°C) av 5-(N-metyl-3-tert-butoksykarbonylaminopropyl)-benzen-1,3-dikarboksylsyredietyleter (100 mg) i tetrahydrofuran (2 ml) ble det sakte tilsatt en 1M løsning av litiumaluminiumhydrid i dietyleter (0,55 ml). 10 minutter etter endt tilsetting ble natriumsulfatdekahydrat tilsatt til gassutvikling stoppet opp. Det faste stoffet ble filtrert fra, vasket to ganger med etylacetat og de kombinerte, organiske løsningene ble konsentrert i vakuum som ga 5-(N-metyl-3-tert-butoksykarbonylaminopropyl)-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen (66,8 mg) som en viskøs olje:

CI (Fremgangsmåte D): m/z = 327 MNH_4^+
m/z = 310 MH^+
m/z = 271 $(MNH_4^+ - C_4H_8)$

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): 1,37 (s bred, 9H) ; 1,75 (m, 2H) ; fra 2,45 til 2,54 (m maskert, 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 bred, 2H) ; 7,08 (s bred, 1H).

5-(N-metyl-3-tert-butoksykarbonylaminopropyl)-benzen-1,3-dikarboksylsyredietylester kan fremstilles som følger:



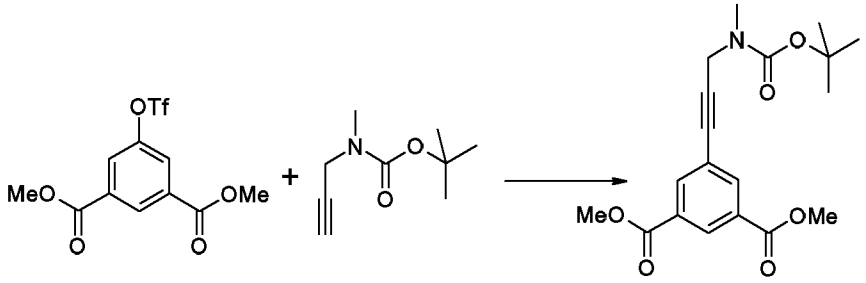
Til en løsning av 5-(N-metyl-3-tert-butoksykarbonylamiopropyn-1-yl)-benzen-1,3-dikarboksylsyredietylester (890 mg) i metanol (10 ml) ble det tilsatt palladium 10% på karbon (89 mg) og løsningen ble rørt ved romtemperatur under en hydrogenatmosfære (1 bar) i 18 timer. Det faste stoffet ble filtrert fra og løsemiddelet fjernet i vakuum som ga 5-(N-metyl-3-tert-butoksykarbonylaminopropyl)-benzen-1,3-dikarboksylsyredietylester (767 mg) som en gul olje:

EI (Fremgangsmåte C):

m/z = 365	M^+.
m/z = 309	$(M - C_4H_8)^+$.
m/z = 265	$(m/z = 309 - CO_2)^+$.
m/z = 57	$C_4H_9^+$.
m/z = 44	$C_2H_6N^+$.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): 1,32 (s bred, 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-metyl-3-tert-butoksykarbonylaminopropyn-1-yl)-benzen-1,3-dikarboksylsyredietylester kan fremstilles som følger:



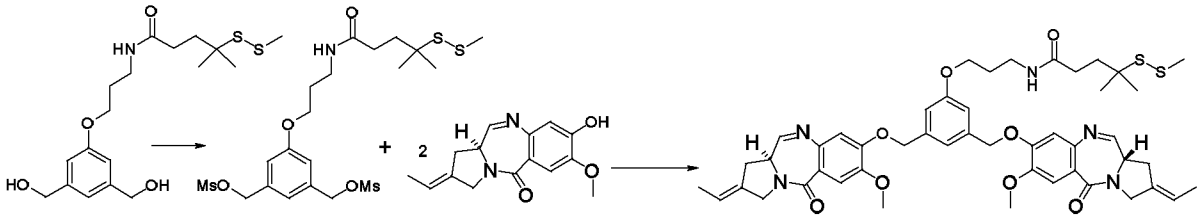
5-Trifluormetansulfonyloksyisoftalsyredimetylester (Bodwell, G.J., Fleming, J.J., Mannion, M.R., Miller, D.O., J. Org. Chem., 2000, 65 (17), 5360) (1 g) ble løst i 2 ml acetonitril. N-Metyl-N-tert-butoksykarbonylpropargylamin (Bradbury, B.J., Baumgold, J., Jacobsen, K.A., J. Med. Chem., 1990, 33 (2), 741) (643 mg),

bis(trifenylfosfin)palladiumklorid (205 mg), kobberjodid (56 mg) og trietylamin (591 mg) ble tilsatt. Den resulterende blandingen ble rørt i 15 timer ved romtemperatur. Løsemiddelet ble fjernet ved fordampning under redusert trykk og residuet ble deretter vasket i skilletrakt ved anvendelse av etylacetat og vann. Sjiktene ble separert og vannsjiktet ekstrahert en gang med etylacetat. De kombinerte, organiske løsningene ble vasket med mettet natriumklorid vandig løsning, tørket over mangesiumsulfat og konsentrert i vakuum til et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Biotage FLASH 40+M, 100 g kolonne, SiOH, 32-63 µm, eluert med etylacetat/heptan, 20:80) som ga 5-(N-metyl-3-tert-butoksykarbonylaminopropyn-1-yl)-benzen-1,3-dikarboksylsyredietylester (896 mg).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6, δ i 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).

Eksempel 10: 8,8'-{5-[3-(4-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-propoyloksy]-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)}-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

Kan fremstilles som følger:



Til en avkjølt (0°C) løsning av 1-[3-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-propyloksy]-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen (45 mg) og trietylamin (49 µl) i diklormetan (1,5 ml), ble det tilsatt metansulfonylklorid (19 µl). Etter 30 minutter ble reaksjonsblandingen vasket to ganger med vann og den resulterende diklormetanløsningen ble tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum til en viskøs olje (39 mg).

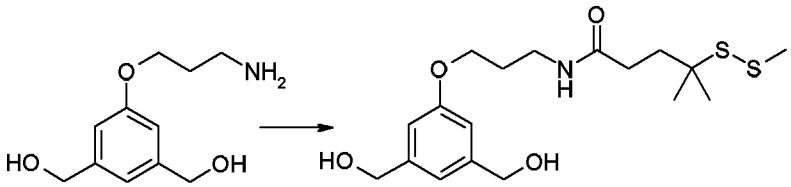
Til en løsning av pre-tomaymycin (26 mg) i dimetylformamid (0,9 ml) ble det tilsatt kaliumkarbonat (40 mg), kaliumjodid (16 mg) og en prøve av den urene forbindelsen (31 mg). Reaksjonsblandingen ble rørt i 20 timer ved 30°C. En annen prøve av den urene forbindelsen ble tilsatt (6 mg) og den resulterende blandingen ble rørt i ytterligere 20 timer ved 30°C. Faste stoffer ble filtrert fra, vasket med dimetylformamid (0,3 ml)

og deretter tatt ut. Vann (1,6 ml) ble tilsatt til den kombinerte dimetylformamidløsningen og det resulterende faste stoffet ble filtrert, vasket med vann og tørket i vakuum som ga et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Interchrom Paruflash, 2 g kolonne, SiOH, 15-35 µm, eluert med diklormetan/metanol, 95:5), og deretter en annen resing med silikagel kromatografi (Chromabond OH, 2 g kolonne, 45 µm, eluert med diklormetan som ga 8,8'-{5-[3-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)propyloksy]-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)}-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (0,2 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte 1, Platform I): ES: m/z = 896 MH^+
Retensjonstid = 4,09 minutter.

^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3-d1, δ i ppm): 1,29 (s, 6H) ; 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; fra 1,92 til 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 bred, 4H) ; 5,14 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,20 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,60 (m, 2H) ; 5,84 (t bred, 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-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-propyloksy]-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen

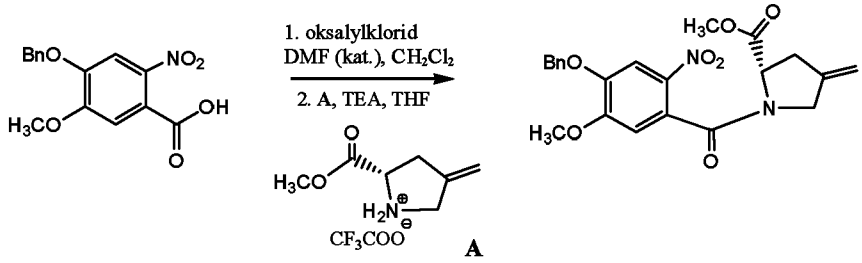


Til en løsning av 1-(3-aminopropyloksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen (50 mg) i dimetylformamid (1 ml) ble det tilsatt 4-metyl-4-metyldisulfanylpentansyre (44 mg), N,N'-diisopropylkarbodiimid (35 ml) og 1-hydroksybenzotriazolhydrat (5,8 mg). Etter 15 timer ved romtemperatur ble vann tilsatt til reaksjonsblandingen og den vandige løsningen ble ekstrahert to ganger med etylacetat. De kombinerte, organiske løsningene ble vasket med mettet natriumklorid vandig løsning, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum til et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Interchrom Puriflash, 5 g kolonne, SiOH 15-35 µm), eluert med metanol/diklormetan, 5;95 som ga 1-[3-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-propyloksy]-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen (48 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte A1, ZQ): ES m/z = 388 MH^+
Retensjonstid = 3,03 minutter.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): 1,24 (s, 6H) ; fra 1,76 til 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 bred, J = 5,5 Hz, 4H) ; 5,12 (d, J = 5,5 Hz, 2H) ; 6,73 (s bred, 2H) ; 6,83 (s bred, 1H) ; 7,92 (t bred, J = 5,5 Hz, 1H).

Eksempel 11: Fremstilling av utgangsproduktene og/eller intermediatene



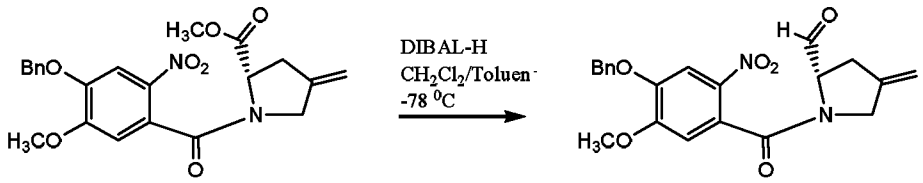
Til en løsning av 4-benzyloksy-5-metoksy-2-nitrobenzosyre (4,8 g, 16 mmol) i vannfri diklormetan (80 ml) og THF (5 ml) ble det tilsatt oksalylklorid (2,8 ml, 32 mmol) og DMF (30 µl, 0,38 mmol) ved romtemperatur. Store mengder av bobler ble dannet etter tilsetting av DMF. Blandingen ble rørt over natten og deretter ble løsemidlene fjernet ved rotasjonsfordampning i vakuum. Residuet ble samtidig fordampet en ytterligere gang ved tilsetting av vannfri diklormetan som ga acetylkloridet som et gult faststoff.

Til en løsning av 4-metylen-L-prolinmetylester, forbindelse A (3,95 g, 15,5 mmol) i vannfri THF (80 ml) ble det tilsatt trietylamin (6,7 ml, 48 mmol) ved 0°C. Etter 2 minutter ble den ovenfor angitte acetylkloriden i vannfri THf (80 ml) tilsatt raskt i løpet av 10 minutter via en kanyle ved samme temperatur. Den oppnådde gule, blakkede løsningen ble rørt ved 0 ~5°C i 30 minutter, og deretter ved romtemperatur i 4 timer. Reaksjonsløsningen ble fortynnet med etylacetat og vann. Vannsjiktet ble ekstrahert med etylacetat to ganger og de kombinerte, organiske sjiktene ble vasket med 2% HCl-løsning og saltvann, og tørket over vannfri magnesiumsulfat. Blandingen ble filtrert og løsemidlene ble fjernet. Residuet ble renset med flashkromatografi (heksan/AcOEt, 1:1, 1:1,5) som ga (2S)-4-(metylen)-1-[5-metoksy-2-nitro-4-(fenylmetoksy)-benzoyl]-2-pyrrolidinkarboksylsyremetylester som et gult faststoff (5,6 g, y = 85%).

^{1}H NMR (400 Hz, $CDCl_3$): forbindelsen synes som et par av adskilte rotamerer. 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)+.

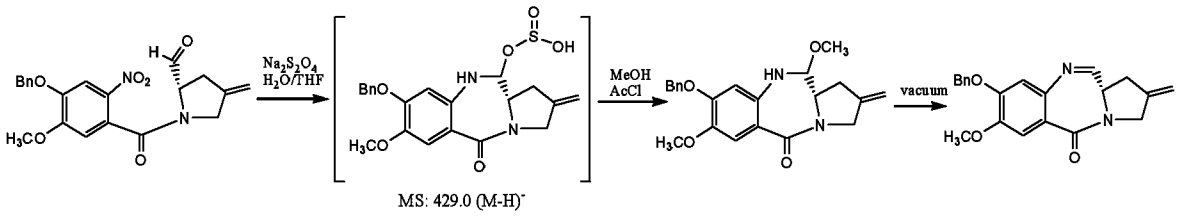


Til en løsning av esteren (3,15 g, 7,39 mmol) i vannfri diklormetan (9 ml) og toluen (27 ml) ble det tilsatt dibal-H (15 ml, 1,0 M i toluen) dråpevis via en sprøytepumpe i 30 minutter ved -78°C. Blandingen ble rørt videre ved -78°C i 2 timer og TLC (heksan/AcOEt, 1:1,5) viste at alt utgangsmaterialet var konsumert. Reaksjonen ble stoppet med metanol (0,3 ml, 7,4 mml) ved -78°C og 5% HCl (20 ml) ble tilsatt fulgt av tilsetting av AcOEt (50 ml). Tørris/acetonbadet ble fjernet og blandingen ble varmet opp til 0°C og rørt i 15 minutter. Vannsjiktet ble ekstrahert med EtOAc to ganger og de kombinerte organiske sjiktene ble vasket med kald 5% HCl og saltvann og tørket over vannfri natriumsulfat. Blandingen ble filtrert gjennom celite og løsemiddelet ble fjernet. Residuet ble renset med flashkromatografi (heksan/AcOEt, 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 100% AcOEt) som ga (2S)-4-(metylen)-1-[5-metoksy-2-nitro-4-(fenylmetoksy)benzoyl]-2-pyrrolidinkarboksaldehyd som et fluffy gult faststoff (2,69 g, y = 92%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): forbindelsen finnes som et par adskilte rotomerer. 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;

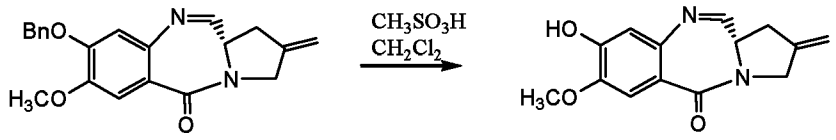
MS (ESI): m/z 419,2 (M + Na)+.



Fremgangsmåte 1: Til en løsning av (2S)-4-(metylen)-1-[5-metoksy-2-nitro-4-(fenylmetoksy)benzoyl]-2-pyrrolidinkarboksaldehyd (1,0 ekvivalent) i THF/H_2O (v/v, 1,7:1, 0,03 M) ble det tilsatt natriumhydrosulfitt (5 ~8 ekvivalenter) i porsjoner i løpet av 2 minutter ved romtemperatur. Blandingen ble ytterligere rørt i 6~20 timer og overvåket med TLC (heksan/AcOEt 1:2 og CH_2Cl_2/MeOH 5:1). Etter at aldehydet var tilnærmet konsumert, ble reaksjonen stoppet med metanol (ca. samme volum som THF anvendt). Løsemidlene ble fjernet ved rotasjonsfordampning i vakuum (temperatur < 40°C) og resten i form av et faststoff ble satt på høyvakuum for å gjøre dette fullstendig tørt. Det faste stoffet ble suspendert i vannfri metanol (0,03 M) og AcCl (8~10 ekvivalenter) ble tilsatt dråpevis ved romtemperatur. Etter røring i 15 minutter ble den blakkede løsningen filtrert og det faste stoffet vasket med vannfri metanol. Det klare gule filtratet ble rørt ved romtemperatur i 1 til 2 timer, og reaksjonen ble stoppet med mettet natriumbikarbonat. Etter det meste av metanolen var fjernet ved rotasjonsfordampning, ble resten fortynnet med diklormetan og vann. Det vandige sjiktet ble ekstrahert med AcOEt. De kombinerte, organiske sjiktene ble tørket over vannfri natriumsulfat og filtrert. Løsemidlene ble fjernet og residuet renset med flashkromatografi (heksan/AcOEt, 1:3, 1:5) som ga (11aS)-7-metoksy-2-metyen-8-(fenylmetoksy)-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on i 70% til 85% utbytte. NRM-spektra er i overensstemmelse med det som er rapportert i litteraturen.

MS (ESI): *m/z* 371,2 $(M + Na)^+$. MS (ESI med CH_3OH): *m/z* 403,3 $(M + CH_3OH + Na)^+$. MS (ESI med H_2O): *m/z* 389,2 $(M + H_2O + Na)^+$.

Fremgangsmåte 2: Til en løsning av (2S)-4-(metylen)-1-[5-metoksy-2-nitro-4-(fenylmetoksy)benzoyl]-2-pyrrolidinkarboksaldehyd (1,0 ekvivalent) i MeOH/H_2O (v/v, 3,2:1, 0,03 M) ble det tilsatt natriumhydrosulfitt (6~8 ekvivalenter) i porsjoner i løpet av 2 minutter ved romtemperatur, fulgt av tilsetting av natriumhydrosulfat (0,5~1,0 ekvivalent). Blandingen ble ytterligere rørt i 12~20 timer og overvåket med TLC (heksan/AcOEt 1:2 og CH_2Cl_2/MeOH 5:1). Etter at intermediatet (MS (ESI): 459,0 $(M-H)^-$) var tilnærmet konsumert, ble reaksjonen stoppet med mettet natriumbikarbonat til pH 5~6. Løsemiddelet ble fjernet ved rotasjonsfordampning i vakuum (temperatur < 40°C) og resten i form av et faststoff ble satt på høyvakuum for å gjøre det fullstendig tørt. Det faste stoffet ble suspendert i vannfri metanol (0,03 M) og AcCl (80 ekvivalenter) ble tilsatt dråpevis ved romtemperatur. Etter røring i 15 minutter ble den blakkede løsningen filtrert og det faste stoffet vasket med vannfri metanol. Det klare gule filtratet ble rørt ved romtemperatur i 1-2 timer, og reaksjonen ble stoppet med mettet natriumbikarbonat. Etter at metanolen var tilnærmet fjernet ved rotasjonsfordampning, ble resten fortynnet med diklormetan og vann. Vannsjiktet ble ekstrahert med AcOEt. De kombinerte, organiske sjiktene ble tørket over vannfri natriumsulfat og filtrert. Løsemiddelet ble fjernet og residuet renset med flashkromatografi (heksan/AcOEt, 1:3, 1:5) som ga (11aS)-7-metoksy-2-metylen-8-(fenylmetoksy)-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on i 65% til 80% utbytte.



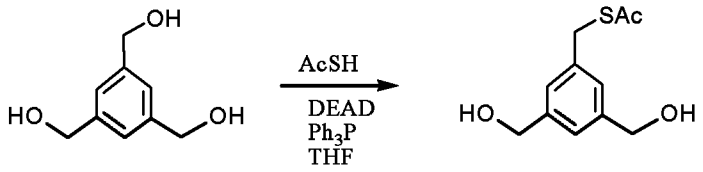
Til en løsning av utgangsmaterialet (98 mg, 0,28 mmol) i vannfri diklormetan (2 ml) ble det tilsatt en nylig blandet løsning av metansulfonsyre (2 ml) i vannfri diklormetan (4 ml) ved romtemperatur. Blandingen ble rørt ved romtemperatur i 1,5 timer og ble helt over på is (~30 g), reaksjonen stoppet med $NaHCO_3$ og blandingen fortynnet med diklormetan. Vannsjiktet ble ekstrahert med diklormetan en gang og de kombinerte organiske sjiktene ble tørket over vannfri natriumsulfat, filtrert og løsemidlene ble fjernet. Residuet ble renset med flashkromatografi (CH_2Cl_2/MeOH, 15:1) som ga produktet som et gult faststoff (29 mg). Det vandige sjiktet ovenfor ble rørt ved romtemperatur over natten og ekstrahert med diklormetan og AcOEt deretter. Det kombinerte diklormetan og AcOEt ble tørket over vannfri natriumsulfat, filtrert og løsemidlene ble fjernet som ga (11aS)-8-hydroksy-7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-

tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on (25 mg). Det totale utbyttet er 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 med vann): *m/z* 258,9 $(M + H)^+$, *m/z* 299,1 $(M + H_2O + Na)^+$.

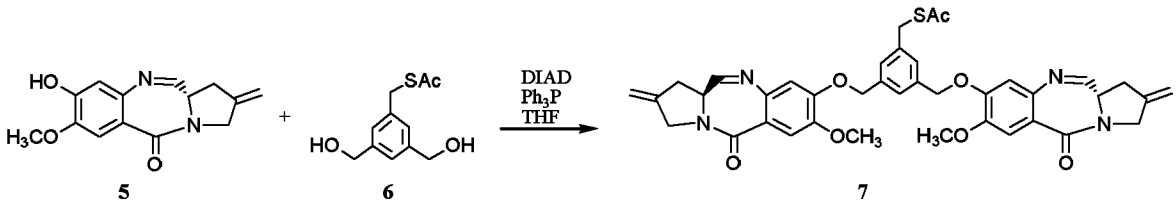
Eksempel 12: 8,8'-[5-acetyltiometyl-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-metylen-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on



Til en løsning av trifenylfosfin (577 mg, 2,2 mmol) i vannfri THF (5 ml) ble det tilsatt dietylazodikarboksylat (2,2 M i toluen, 791 µl, 1,7 mmol) dråpevis ved 0°C. Etter røring ved 0°C i 50 minutter ble en løsning av 1,3,5-tri(hydroksymetyl)benzen (269 mg, 1,6 mmol, fremstilt ved reduksjon av trimetyl-1,3,5-bezentrikarboskylat med litiumaluminiumhydrid i THF, samtidig fordampet med tørr benzen og tørket på høyvakuum i noen timer før anvendendelse) og tioeddiksyre (108 µl, 1,45 mmol) i tørr THF (4 ml) ble tilsatt dråpevis. Etter 1 time ble is/vannbadet fjernet og reaksjonsblandingen ble rørt ved romtemperatur i 15 timer. Løsemidlene ble fjernet ved rotasjonsfordampning i vakuum. Residuet ble renset med flashkromatografi som ga 5-acetyltiometyl-1,3-bis(hydroksymetyl)-benzen som et fargeløst faststoff (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 $(M + Na)^+$.

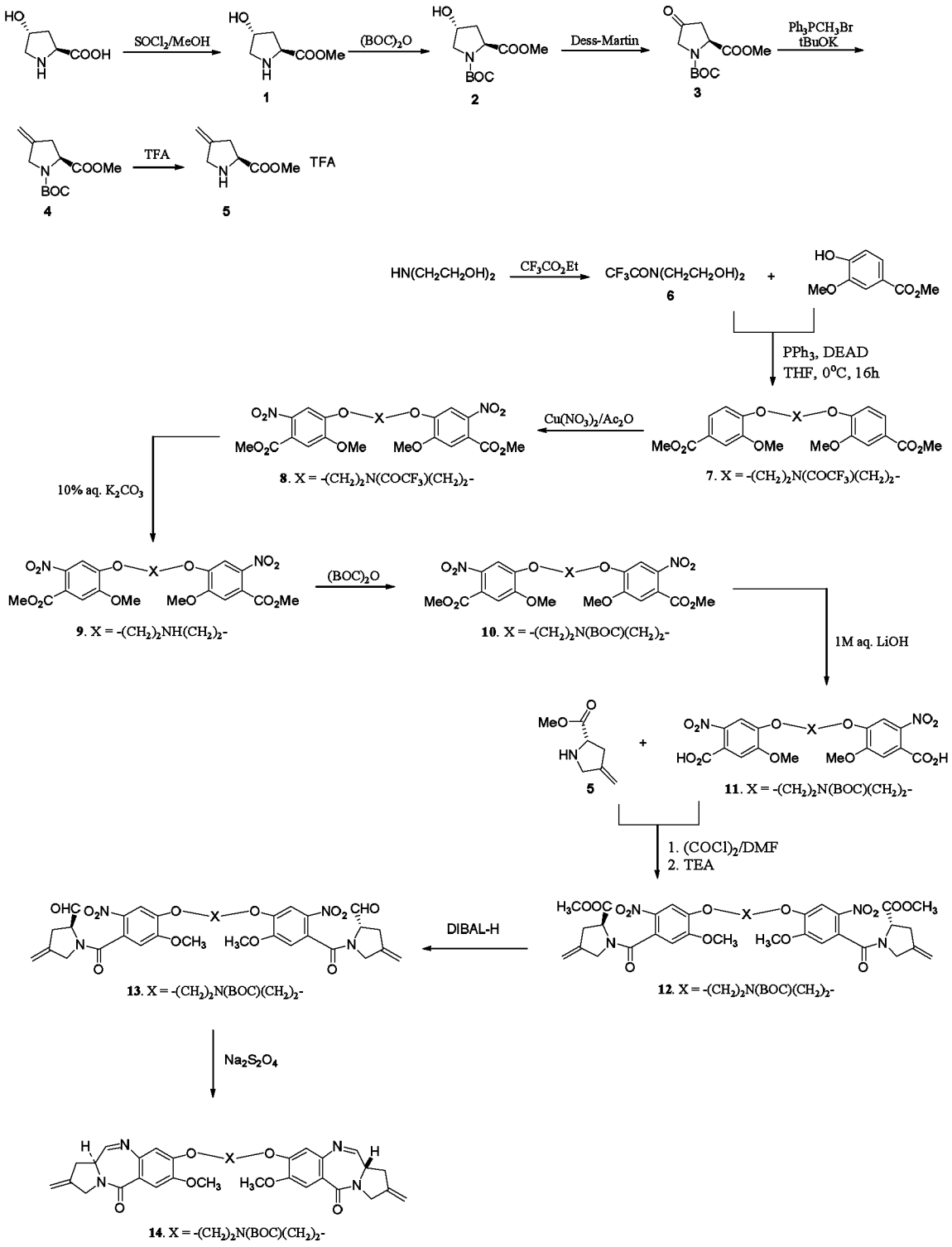


Til en løsning av trifenylfosfin (28 mg, 0,1 mmol) i vannfri THF (0,3 ml) ble det tilsatt diisopropylazodikarboksylat (19 µl, 0,09 mmol) dråpevis ved 0°C. Etter røring ved 0°C i 35 minutter ble en løsning av (11aS)-8-hydroksy-7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on, forbindelse 5 (18 mg, 0,07 mmol, samtidig fordampet med tørr benzen og tørket på høyvakuum i noen timer før anvendelse) i tørr THF (0,2 ml) tilsatt. Blandingen ble rørt fortsatt i 10 minutter før 5-acetyltiometyl-1,3-bis(hydroksymetyl)-benzen, forbindelse 6, (6,6 mg, 0,03 mmol, samtidig fordampet med tørr benzen og tørket på høyvakuum i noen timer før anvendelse) i tørr THF (0,2 ml) ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble rørt ved 0°C i 35 minutter. Is/vannbadet ble fjernet og løsningen ble rørt ved romtemperatur i 21 timer. Løsemiddelene ble fjernet ved rotasjonsfordampning i vakuum. Residuet ble renset med flashkromatografi som ga det urene produktet som ble ytterligere renset med preparativ HPLC (C18-kolonne, CH_3CN/H_2O) som ga 0,7 mg av 8,8'-[5-acetyltiometyl-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-metylen-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]bnezodiazepin-5-on], forbindelse 7.

MS (ESI med 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 $(M - Ac)^-$.

Referanseeksempel 13: **Bis-{2-[(S)-2-metylen-7-metoksy-5-okso-1,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yloksy]-etyl}-karbaminsyre-tert-butylester**

Skjema 1



Forbindelse 1. Tionylklorid (5,6 ml, 76,3 mmol) ble tilsatt dråpevis til tørr metanol (76 ml) ved -20°C, fulgt av tilsetting av trans-4-hydroksy-L-prolin (5,0 g, 38,1 mmol). Den resulterende blandingen ble varmet opp til romtemperatur og rørt i 20 timer. Løsemiddelet ble fjernet under redusert trykk og residuet ble ytterligere tørket under høyvakuum som ga trans-4-hydroksy-L-prolinmetylester 1 som et hvitt faststoff.

^{1}H NMR (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).

Forbindelse 2. Til en løsning av trans-4-hydroksy-L-prolinmetylester 1 (3,38 g, 30,9 mmol) og natriumbikarbonat (1,56 g, 18,5 mmol) I vannfri DMF (42 ml) ble det tilsatt en løsning av $(BOC)_2O$ i DMF (20 ml) ved 0°C under argon. Etter røring over natten ved romtemperatur ble reaksjonen stoppet ved tilsetting av 100 ml H_2O ved 0°C, og blandingen ekstrahert med EtOAc (4 x 80 ml). Det kombinerte, organiske sjiktet ble vasket med saltvann (100 ml), tørket ($MgSO_4$), filtrert og konsentrert med rotavapor. Residuet ble renset med flashkromatografi (silikagel, 1:1 heksan/EtOAc) som ga N-BOC-beskyttet trans-4-hydroksy-L-prolinmetylester 2 som fargeløs olje:

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotamerer) δ 1,38 og 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).

Forbindelse 3. (Franco Manfre, Jean-Marc Kern og Jean-Francois Biellmann, J. Org. Chem., 1992, 57, 2060-2065). N-BOC-beskyttet trans-4-hydroksy-L-prolinmetylesterforbindelse 2 (3,24 g, 13,2 mmol) ble løst i CH_2Cl_2 (132 ml) og avkjølt til 0°C. Pyridin og Dess-Martin perjodinan ble tilsatt og røring fortsatte til TLC viste noe utgangsmateriale tilbake. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med CH_2Cl_2, vasket med 10% vandig $Na_2S_2O_3$ (3 x 50 ml), 1 N vandig HCl (50 ml), mettet, vandig $NaHCO_3$ (50 ml), saltvann (50 ml), tørket over $MgSO_4$, filtrert og konsentrert. Rensing av residuet ved flashkromatografi (silikagel, 7:3 heksan/EtOAc) ga N-BOC-beskyttet 4-okso-L-prolinmetylester 3 som lys gul olje:

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotamerer) δ 1,44 (s, 9H), 2,53 – 2,57 (m, 1H), 2,85 – 2,96 (m, 1H), 3,72 og 3,74 (2 x s, 3H), 3,85 – 3,87 (m, 2H), 4,67 – 4,77 (m, 1H).

Forbindelse 4. (Kuei-Ying, Lin, Mark Matteucci, US 5414077). En løsning av kalium-t-butoksid (2,51 g, 22,3 mmol) i vannfri THF (40 ml) ble tilsatt til en suspensjon av metyltrifenylfosfoniumbromid (7,99 g, 22,3 mmol) i THF (40 ml) ved 0°C. Den resulterende gule ylidsuspensjonen ble rørt ved 0°C i 2 timer før tilsetting av løsningen av N-BOC-beskyttet 4-okso-L-prolinmetylester 3 (2,72 g, 11,2 mmol) i THF (32 ml).

Etter røring ved romtemperatur i 1 time ble reaksjonsblandingen fortynnet med EtOAc (100 ml), vasket med H_2O (80 ml), saltvann (80 ml), tørket ($MgSO_4$) og konsentrert. Rensing av residuet med flashkromatografi (silikagel, 9:1 heksan/EtOAc) ga N-BOC-beskyttet 4-metylen-L-prolinmetylester, forbindelse 4, som fargeløs olje.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotamerer) δ 1,40 og 1,45 (2 x s, 9H), 2,58 – 2,62 (m, 1H), 2,88 – 2,98 (m, 1H), 3,69 og 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).

Forbindelse 5. N-BOC-beskyttet 4-metylen-L-prolinmetylester, forbindelse 4, (0,8 g, 3,31 mmol) ble løst i CH_2Cl_2 (6,5 ml) og avkjølt til 0°C. En løsning av trifluoreddiksyre (6,5 ml) i CH_2Cl_2 (6,5 ml) ble tilsatt dråpevis og den resulterende blandingen ble rørt ved rt i 1,5 timer. Etter fjerning av flyktige løsemidler med rotavapor ble det brune residuet løst i 10 ml H_2O og vasket med Et_2O (3 x 5 ml). Den vandige løsningen ble konsentrert, og ble ytterligere tørket under høyvakuum som ga 4-metylen-L-prolinmetylester 5 som TFA-salt:

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotamerer) δ 2,83 – 2,87 (m, 1H), 3,05 – 3,11 (m, 1H), 3,80 og 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).

Forbindelse 6. (Kamal, A., et al., J. Med. Chem., 2002, 45, 4679-4688). Dietanolamin (3,57 g, 34 mmol) ble løst i metanol (20 ml) og behandlet med Et_3N (4,7 ml, 34 mmol) og etyltrifluoracetat (4,90 g, 34 mmol) i 20 timer ved rt, fulgt av tilsetting av ytterligere 1 ml CF_3COOEt. Etter ytterligere 20 timer ga fjerning av flyktige løsemidler under høyvakuum N-trifluoracetyldietanolaminforbindelse 6 som en lys gul olje, som ble anvendt uten ytterligere rensing.

Forbindelse 7. Dietylazodikarboksylat (7,66 g, 44 mmol) ble dråpevis tilsatt til en rørt løsning av metylvanillat (7,30 g, 40,1 mmol) og trifenylfosfin (15,67 g, 59,7 mmol) i vannfri THF (57 ml) ved 0°C og den resulterende blandingen ble rørt i 1 time ved denne temperaturen fulgt av tilsetting av en løsning av N-trifluoracetyldietanolamin 6 (7,30 g,

40,1 mmol) i vannfri THF (20 ml). Etter røring over natten ved romtemperatur ble reaksjonen stoppet med H_2O (100 ml) og blandingen ekstrahert med Et_2O (3 x 80 ml). De kombinerte Et_2O-sjiktene ble vasket med saltvann (100 ml), tørket ($MgSO_4$) og konsentrert. Rensing av residuet med flashkromatografi (silikagle, 8:2 til 7:3 heksan/EtOAc) ga N-trifluoracetyl-N,N-di[2-(4-metoksykarbonyl-2-metoksyfenoksy)etyl]amin, forbindelse 7, som et hvitt faststoff:

^{1}H NMR (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 og 6,85 (2 x d, J = 6,3 Hz, 2H), 7,50 og 7,51 (2 x d, J = 1,5 Hz, 2H), 7,61 (dd, J = 1,5, 6,3 Hz, 2H).

Forbindelse 8. Fast $Cu(NO_3)_2.xH_2O$ (2,33 g, 12,41 mmol) ble tilsatt til en rørt løsning av N-trifluoracetyl-N,N-di[2-(4-metoksykarbonyl-2-metoksyfenoksy)etyl]amin 7 (2,62 g, 4,96 mmol) i eddiksyreanhydrid (50 ml) ved 0°C. Reaksjonsblandingen ble rørt ved 0°C i 1 time og ved romtemperatur i 2 timer og deretter helt over i 200 ml isvann. Røring fortsatte i ytterligere 1 time. Det resulterende gule presipitatet ble samlet opp ved filtrering. Ytterligere rensing med flashkromatografi (silikagel, 6:4 heksan/EtOAc) ga N-trifluoracetyl-N,N-di[2-(4-metoksykarbonyl-2-metoksy-5-nitrofenyloksy)etyl]amin, forbindelse 8, som et lys gult faststoff:

^{1}H NMR (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 og 6,99 (2 x s, 2H), 7,37 og 7,40 (2 x s, 2H).

Forbindelse 9. En løsning av N-trifluoracetyl-N,N-di[2-(4-metoksykarbonyl-2-metoksy-5-nitrofenyloksy)etyl]amin 8 (2,58 g, 4,16 mmol) i THF-MeOH (1:2, 48 ml) ble behandlet med 10% vandig K_2CO_3 (16 ml) ved romtemperatur i 12 timer. Etter fjerning av flyktige forbindelser med rotavapor ble residuet fortynnet med 100 ml H_2O, ekstrahert med EtOAc (3 x 100 ml). De kombinerte EtOAc-sjiktene ble vasket med saltvann (100 ml), tørket ($MgSO_4$) og konsentrert som ga N,N-di[2-(4-metoksykarbonyl-2-metoksy-5-nitrofenyloksy)etyl]amin, forbindelse 9, som et gult faststoff, som ble anvendt uten ytterligere rensing:

^{1}H NMR (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).

Forbindelse 10. N,N-di[2-(4-metoksykarbonyl-2-metoksy-5-nitrofenyloksy)etyl]amin, forbindelse 9, (uren, 4,16 mmol) og $NaHCO_3$ (210 mg, 2,50 mmol) ble suspendert i THF og behandlet med $(BOC)_2O$ (999 mg, 4,58 mmol) ved 0°C, og røring fortsatte ved romtemperatur i 3 timer. Etter fjerning av THF ble residuet fordelt mellom H_2O og EtOAc (100 ml/100 ml). Det vandige sjiktet ble ytterligere ekstrahert med EtOAc /2 x 50 ml). De kombinerte EtOAc-sjiktene ble vasket med saltvann (80 ml), tørket ($MgSO_4$) og konsentrert. Rensing av residuet med flashkromatografi (silikagel, 6:4 heksan/EtOAc) ga N-tert-butoksykarbonyl-N,N-di[2-(4-metoksykarbonyl-2-metoksy-5-nitrofenyloksy)etyl]amin, forbindelse 10, som et lys gult faststoff:

^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,44 (s, 9H), 3,77 (m, 4H), 3,83, 3,86 og 3,87(3 x s, 12H), 4,20 og 4,26 (2 x t, J = 3,9 Hz, 4H), 6,97 og 6,99 (2 x s, 2H), 7,36 og 7,40 (2 x s, 2H);

EIMS *m/z* 646 ($[M]^+$+Na).

Forbindelse 11. N-tert-butoksykarbonyl-N,N-di[2-(4-metoksykarbonyl-2-metoksy-5-nitrofenyloksy)etyl]amin, forbindelse 10 (2,11 g, 3,39 mmol) ble suspendert i THF-MeOH-H_2O (3:1:1, 65 ml) og behandlet med 1M vandig LiOH (14 ml) ved romtemperatur i 3 timer. Etter fjerning av flyktige løsemidler ble residuet fortynnet med H_2O (25 ml). Den resulterende, vandige løsningen ble surgjort til pH ~1 med konsentrert HCl. Det presipiterte N-tert-butoksykarbonyl-N,N-di[2-(4-karboksy-2-metoksy-5-nitrofenyloksy)etyl]amin, forbindelse 11, ble samlet opp ved filtrering, vasket med H_2O og ytterligere tørket under høyvakuum:

^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotamerer) δ 1,39 (s, 9H), 3,70 (m, 4H), 3,88 og 3,89(2 x s, 6H), 4,29 (m, 4H), 7,29 og 7,31 (2 x s, 2H), 7,63 (s, 2H), 13,60 (br, s, 2H);

^{13}CNMR δ 27,8, 46,2 og 46,6, 56,3 og 56,4, 67,2, 79,2, 107,9 og 108,0, 111,3, 141,4 og 141,5, 149,1, 151,7, 154,5, 165,9;

HRMS *m/z* beregnet for $C_{25}H_{29}N_3O_{14}Na$ 618,1547, funnet 618,1552 ($[M]^+$+Na).

Forbindelse 12. En katalytisk mengde DMF (2 dråper) ble tilsatt til en løsning av N-tert-butoksykarbonyl-N,N-di[2-(4-karboksy-2-metoksy-5-nitrofenyloksy)etyl]amin 11 (194 mg, 0,33 mmol) og oksalylklorid (72,7 µl, 0,81 mmol) i vannfri THF (6,5 ml), og den resulterende blandingen ble rørt ved romtemperatur over natten. Overskudd THF

og oksalylklorid ble fjernet med rotavapor. Acetylkloridet ble resuspendert i ny THF (4 ml) og ble tilsatt dråpevis til en løsning av 4-metylen-L-prolinmetylester 5 (206,7 mg, 0,81 mmol), Et_3N (0,19 ml, 1,39 mmol) og H_2O (0,4 ml) i THF (1 ml) ved 0°C under argonatmosfære. Reaksjonsblandingen ble varmet opp til romtemperatur og røring fortsatte i 2 timer. Etter fjerning av THF ble residuet fordelt mellom H_2O og EtOAc (10/10 ml). Vannsjiktet ble ytterligere ekstrakert med EtOAc (2 x 8 ml). De kombinerte, organiske sjiktene ble vasket med saltvann (10 ml), tørket ($MgSO_4$) og konsentrert. Rensing av residuet med flashkromatografi (silikagel, 2:8 heksan/EtOAc) ga bis{2-[5-metoksy-2-nitro-4-[(S)-4-metylen-2-metoksykarbonyl-1-pyrrolidinylkarbonyl]-fenyloksy]-etyl}-karbaminsyre-tert-butylester 12 som en lys gul olje (rotamerer):

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotamerer) 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).

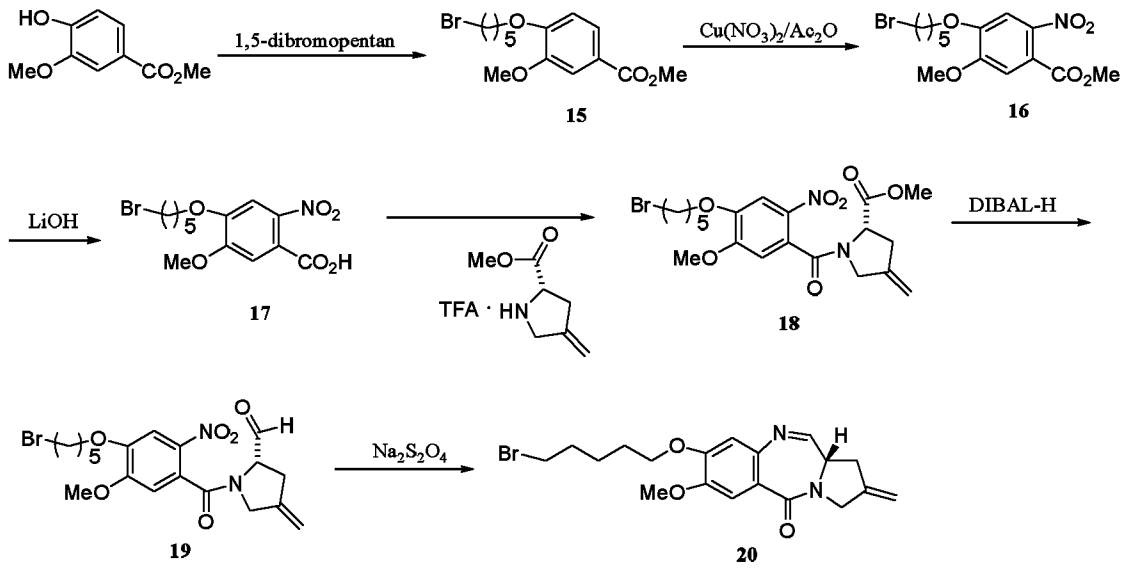
Forbindelse 13. Til en kraftig rørt løsning av bis{2-[5-metoksy-2-nitro-4-[(S)-4-metylen-2-metoksykarbonyl-1-pyrrolidinylkarbonyl]fenyloksy]-etyl}-karbaminsyre-tert-butylester 12 (100 mg, 0,12 mmol) i vannfri toluen (2,4 ml) ble det dråpevis tilsatt en løsning av DIBAL-H (480 µl av en 1M løsning i toluen) ved -78°C under argonatmosfære. Etter røring av blandingen i ytterligere 45 min, ble overskudd reagens nedbrutt ved tilsetting av 5 dråper metanol fulgt av 5% HCl (4 ml). Den resulterende blandingen ble varmet opp til 0°C. Sjiktene ble separerte og det vandige sjiktet ytterligere ekstrahert med CH_2Cl_2 (3 x 3 ml). De kombinerte organiske sjiktene ble vasket med saltvann, tørket ($MgSO_4$) og konsentrert. Rensing av residuet med flashkromatografi (silikagel, 95:5 $CHcl_3$/MeOH) ga bis{2-[5-metoksy-2-nitro-4-[(S)-4-metylen-2-formyl-1-pyrrolidinylkarbonyl]fenyloksy]-etyl}-karbaminsyre-tert-butylester 13 som en lys gul olje (84 mg, 91%).

Forbindelse 14. En blanding av bis-{2-[5-metoksy-2-nitro-4-[(S)-4-metylen-2-formyl-1-pyrrolidinylkarbonyl]fenyloksy]-etyl}-karbaminsyre-tert-butylester 12 (180 mg, 0,23 mmol), $Na_2S_2O_4$ (1,84 mmol, 8 ekviv.), 3,5 ml THF og 2,2 ml H_2O ble rørt ved romtemperatur i 20 timer. Løsemidler ble fjernet under høyvakuum. Residuet ble resuspendert i MeOH (30 ml) og AcCl ble tilsatt dråpevis til pH ~2. Den resulterende blandingen ble rørt ved romtemperatur i 1 time. Reaksjonsblandingen ble opparbeidet

ved en fjerning av det meste av MeOH og deretter fortynnet med EtOAc (25 ml). EtOAc-løsningen ble vasket med mettet, vandig $NaHCO_3$, saltvann, tørket ($MgSO_4$) og konsentrert. Rensing av residuet med flashkromatografi (silikagel, 97:3 $CHCl_3$/MeOH) ga bis-{2-[(S)-2-metylen-7-metoksy-5-okso-1,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yloksy]-etyl}-karbaminsyre-tert-butylester 14 som et hvitt faststoff (86 mg, 50%).

Referanseeksempel 14: (11aS)-7-(5-brompentyloksy)-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on

Skjema 2



Forbindelse 15. Til en løsning av metylvanillat (9,109 g, 50 mmol) i aceton (200 ml) ble det tilsatt K_2CO_3 (27,64 g, 200 mmol) og 1,5-dibrompentan (20,4 ml, 150 mmol). Den resulterende blandingen ble varmet opp til refluks. Etter 6 timer viste TLC at utgangsmaterialet ikke lenger var tilstede. Blandingen ble avkjølt til romtemperatur og det faste stoffet ble fjernet ved filtrering. Filtratet ble konsentrert. Rensing med flashkromatografi (silikagel, 8:2 heksan/EtOAc) ga 4-(5-brompentyloksy)-3-metoksybenzosyremetylester 15 som et hvitt faststoff (13,65 g, 82%);

^{1}H NMR (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 og 355 ($[M]^+$+Na).

Forbindelse 16. Fast $Cu/NO_3)_2.xH_2O$ (3,64 g, 19,42 mmol) ble tilsatt til en løsning av 4-(5-brompentyloksy)-3-metoksybenzosyremetylester 15 (5,36 g, 16,18 mmol) i eddiksyreanhydrid (81 ml) ved 0°C. Reaksjonsblandingen ble rørt ved 0°C i 1 time og ved romtemperatur i 2 timer og deretter helt over i 200 ml is-vann. Røring fortsatte i ytterligere 1 time. Det resulterende gule presipitatet ble samlet opp ved filtrering og vasket med vann. Ytterligere tørking under høyvakuum ga 4-(5-brompentyloksy)-5-metoksy-2-nitrobenzosyremetylester, forbindelse 16, som et lys gult faststoff (5,98 g), som ble anvendt direkte i neste trinn:

^{1}H NMR (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 og 400 ($[M]^+$+Na).

Forbindelse 17. 4-(5-Brompentyloksy)-5-metoksy-2-nitrobenzosyremetylester 16 (5,98 g, 15,9 mmol) ble suspendert i THF-MeOH-H_2O (3:1:1, 157 ml) og behandlet med 1M vandig LiOH (31 ml) ved romtemperatur i 5 timer. Etter fjerning av flyktige løsemidler ble residuet fortynnet med H_2O (70 ml). Den resulterende, vandige løsningen ble surgjort til pH ~2 med konsentrert HCl. Det presipiterte 4-(5-brompentyloksy)-5-metoksy-2-nitrobenzosyre 17 ble samlet opp ved filtrering, vasket med H_2O og ytterligere tørket under høyvakuum (5,47 g):

^{1}H NMR (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 og 386 ($[M]^+$+Na).

Forbindelse 18. En katalytisk mengde DMF (2 dråper) ble tilsatt til en løsning av 4-(5-brompentyloksy)-5-metoksy-2-nitrobenzosyre 17 (270 mg, 0,74 mmol) og oksalylklorid (80 µl, 0,89 mmol) i vannfri THF (7,5 ml), og den resulterende blandingen ble rørt ved romtemperatur over natten. Overskudd THF og oksalylklorid ble fjernet med rotavapor. Acetylkloridet ble resuspendert i ny THF (6 ml) og ble tilsatt dråpevis til en løsning av 4-metylen-L-prolinmetylester 5 (228 mg, 0,89 mmol), Et_3N (0,32 ml, 2,31 mmol) og H_2O (0,15 ml) i THF (1,5 ml) ved 0°C under argonatmosfære. Reaksjonsblandingen ble

varmet opp til romtemperatur og røring fortsatte i 4 timer. Etter fjerning av THF ble residuet fordelt mellom H_2O og EtOAc (20/20 ml). Vannsjiktet ble ytterligere ekstrahert med EtOAc (3 x 10 ml). De kombinerte, organiske sjiktene ble vasket med saltvann (20 ml), tørket ($MgSO_4$) og konsentrert. Rensing av residuet med flashkromatografi (silikagel, 6:4, heksan/EtOAc) ga 1-[4-(5-brompentyloksy)-5-metoksy-2-nitrobenzoyl]-4-metylen-L-prolinmetylester 18 som en lys gul olje (rotamerer):

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, rotamerer) 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 og 4,90 – 5,12 (m, 3H), 6,80 og 6,83 (2 s, 1H), 7,64 og 7,67 (2 s, 1H);

EIMS *m/z* 507 og 509 ($[M]^+$+Na).

Forbindelse 19. Til en kraftig rørt løsning av 1-[4-(5-brompentyloksy)-5-metoksy-2-nitrobenzoyl]-4-metylen-L-prolinmetylester 18 (61 mg, 0,12 mmol) i vannfri toluen – CH_2Cl_2 (3:1, 2,5 ml) ble det dråpevis tilsatt en løsning av DIBAL-H (188 µl av en 1M løsning i toluen) ved -78°C under argonatmosfære. Etter røring av blandingen med ytterligere 45 minutter ble overskuddsreagens nedbrutt ved tilsetting av tre dråper metanol fulgt av 5% HCl (2 ml). Den resulterende blandingen ble varmet opp til 0°C. Sjiktene ble separerte og vannsjitket ytterligere ekstrahert med CH_2Cl_2 (3 x 2 ml). De kombinerte organiske sjiktene ble vasket med saltvann og tørket ($MgSO_4$) og konsentrert. Rensing av residuet med flashkromatografi (silikagel, 1:1 heksan/EtOAc) ga (S)-1-[4-(5-brompentyloksy)-5-metoksy-2-nitrobenzoyl]-4-metylen-2-pyrrolidinkarboksaldehyd 19 som en lys gul olje (44 mg, 80%).

Forbindelse 20. En blanding av (S)-1-[4-(5-brompentyloksy)-5-metoksy-2-nitrobenzoyl]-4-metylen-2-pyrrolidinkarboksaldehyd 19 (43,7 mg, 0,096 mmol), $Na_2S_2O_4$ (0,58 mmol, 6 ekviv.), 1,5 ml THF og 0,9 ml H_2O ble rørt ved romtemperatur i 18 timer. Løsemidlene ble fjernet under høyvakuum. Residuet ble resuspendert i MeOH (6 ml) og AcCl ble tilstt dråpevis til pH ~2. Den resulterende blandingen ble rørt ved romtemperatur i 1 time. Reaksjonsblandingen ble opparbeidet ved fjerning av det meste av MeOH og deretter fortynnet med EtOAc (20 ml). EtOAc-løsningen ble vasket med mettet, vandig $NaHCO_3$, saltvann og tørket ($MgSO_4$) og konsentrert. Rensing av residuet med flashkromatografi (silikagel, 98:2 $CHCl_3$/MeOH) ga (11aS)-7-

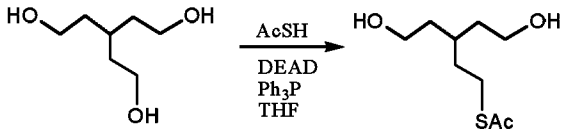
(5-brompentyloksy)-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on 20 som en lys gul olje (31 mg, 74%):

^{1}H NMR (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 (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 og 431 ($[M]^+$+Na).

Forbindelse 20 kan deretter kobles til en PBD-bestanddel fremstilt som i eksempel 11 for å danne en forbindelse ifølge oppfinnelsen.

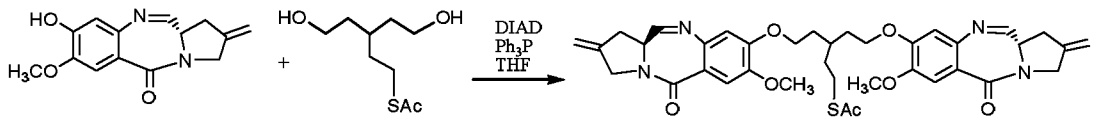
Referanseeksempel 15: 8,8'-[3-(2-Acetyltioetyl)-1,5-pentandiylbis(oksy)]-bis[(S)-2-metylen-7- metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]



Til en løsning av trifenylfosfin (1,77 g, 6,8 mmol) i vannfri THF (15 ml) ble det tilsatt dietylazodikarboksylat (2,2 M i toluen, 2,4 ml, 5,4 mmol) dråpevis ved 0°C. Etter røring ved 0°C i 55 minutter, ble en løsning av 3-(2-hydroksyetyl)pentan-1,5-diol (740 mg, 5 mmol) og tioeddiksyre (335 µl, 4,5 mmol) i tørr THF (7 ml) tilsatt dråpevis. Etter 1 time ble is/vannbadet fjernet og reaksjonsblandingen ble rørt ved romtemperatur i 16 timer. Løsemidlene ble fjernet ved rotasjonsfordamping i vakuum. Residu ble renset med flashkromatografi ($CHCl_3$/MeOH, 20:1, 15:1, 10:1, 4:1) som ga 3-(2-acetyltioetyl)pentan-1,5-diol som et hvitt faststoff (350 mg) og utvunnet utgangsmateriale triol (406 mg).

^{1}H 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 $(M + Na)^+$.



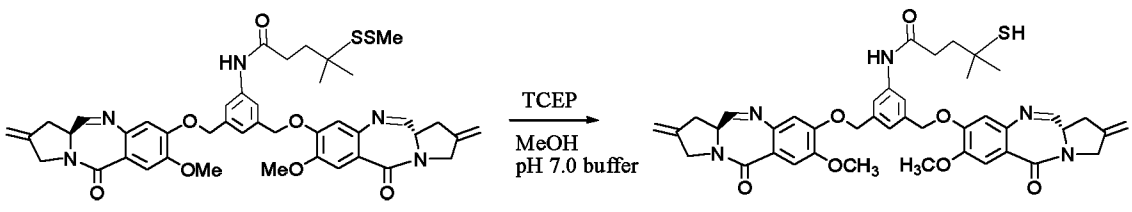
Til en løsning av trifenylfosfin (53 mg, 0,2 mmol) i vannfri THF (0,4 ml) ble det tilsatt diisopropylazodikarboksylat (36 µl, 0,17 mmol) dråpevis ved 0°C. Etter røring ved 0°C i 25 minutter, ble en løsning av (11aS)-8-hydroksy-7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11ª-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on, PBD-monomeren (38 mg, 0,14 mmol, samtidig fordampet med tørr benzen og tørket på høyvakuum i noen timer før anvendelse) i tørr THF (0,2 ml) satt til blandingen. Blandingen ble rørt fortsatt i 10 minutter før tioacetatforbindelsen (12 mg, 0,058 mmol, samtidig fordampet med tørr benzen og tørket på høyvakuum i noen timer før anvendelse) i tørr THF (0,2 ml) ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble rørt ved 0°C i 35 minutter. Is/vannbadet ble fjernet og løsningen ble rørt ved romtemperatur i 12 timer. Løsemidlene ble fjernet ved rotasjonsfordampning i vakuum. Residuet ble renset med flashkromatografi ($CHCL_3$/MeOH, 100:1, 50:1, 25:1, 20:1) som ga 8,8'-[3-(2-acetyltioetyl)-1,5-pentandiylbis(oksy)]-bis[(S)-2-metylen-7-metoksy-1,2,3,11ª-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (10 mg, y = 47%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 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 $(M + Na)^+$.

Eksempel 16: 8,8'-[5-(N-4-merkapto-4,4-dimetylbutanoyl)amino-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11°-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

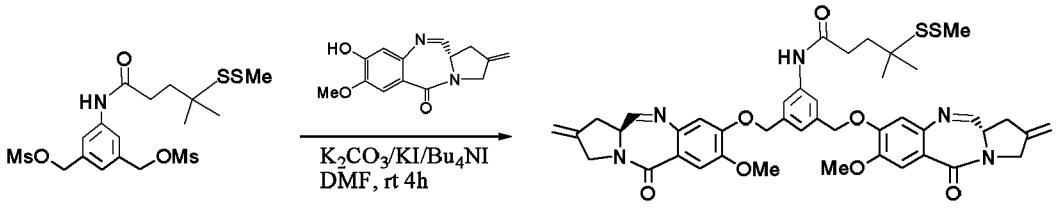
Kan fremstilles som følger:



Til en suspensjon av tris(2-karboksyetyl)fosfinhydroklorid (TCEP, 52 mg, 0,18 mmol) i vann (0,3 ml) ble det tilsatt mettet natriumbikarbonat (~0,6 ml) dråpevis for å justere pH til 6~7. En fosfatbuffer (pH 7,0, 10 mM, Na_2HPO_4/H_3PO_4, 0,5 ml) ble deretter tilsatt til blandingen. Den oppnådde TCEP-løsningen ble tilsatt til en blanding av 8,8'-[5-(N-4-metylditio-4,4-dimetylbutanoyl)-amino-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (29 mg, 0,036 mmol) i metanol (2,2 ml) og rørt ved romtemperatur i 3 timer. Reaksjonen ble stoppet med en fosfatbuffer (pH 6,5) og blandingen ble ekstrahert med diklormetan. De kombinerte, organiske sjiktene ble vasket med saltvann, tørket over vannfri natriumsulfat, filtrert og løsemidlene fjernet under redusert trykk som ga et hvitt faststoff. Det faste stoffet ble løst i diklormetan/MeOH (2:1) og fordampet igjen. Diklormetan ble tilsatt og blandingen fordampet. Residuet ble høyvakuumbehandlet og renset med omvendtfase C18-kolonne {CH_3CN/H_2O, det faste stoffet ble løst i CH_3CN/H_2O (3:1, 2 ml) og rørt i 30 minutter før tilsetting til kolonne} som ga 8,8'-[5-(N-4-merkapto-4,4-dimetylbutanoat)-amino-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (11 mg) som et hvitt faststoff (fremgangsmåte H).

MS (ESI): m/z = 786,3 MNa^+
m/z = 804,2 $MNa^+ + H_2O$

8,8'-[5-(N-4-Metylditio-4,4-dimetylbutanoyl)amino-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles som følger:



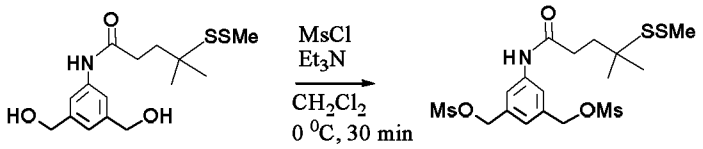
Til en løsning av 5-(N-4-metylditio-4,4-dimetylbutanoyl)-amino-1,3-bis-(mesyloksymetyl)-benzen (89 mg, 0,18 mmol) løst i vannfri DMF (2 ml) ble det tilsatt 8-hydroksy-7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on (93 mg, 0,36 mmol), kaliumkarbonatpulver (100 mg, 0,72 mmol), kaliumjodidpulver (15 mg, 0,09 mmol) og tetrabutylammoniumjodid (13 mg, 0,036 mmol) ved romtempeartur. Etter røring av blandingen i 1 time ble en andre porsjon 8-hydroksy-7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-

c][1,4]benzodiazepin-5-on tilsatt (22 mg, 0,085 mmol). Løsningen ble fortsatt rørt ved romtemperatur i ytterligere 3 timer. Reaksjonen ble stoppet med vann og blandingen fortynnet med diklormetan. Det organiske sjiktet ble separert og vannsjiktet ekstrahert med diklormetan. De kombinerte, organiske sjiktene ble vasket med saltvann og tørket over vannfri natriumsulfat. Blandingen ble filtrert og filtratet fordampet under redusert trykk, fulgt av høyvakuumbehandling for å fjerne rest-DMF. Residuet ble deretter renset med omvendtfase C18-kolonne (CH_3CN/H_2O) som ga 8,8'-[5-(N-4-metylditio-4,4-dimetylbutanoyl)amino-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (29 mg) som et hvitt faststoff (fremgangsmåte H).

MS (ESI) m/z = 832,2 MNa^+
m/z = 850,2 $NMa^+ + H_2O$

^{1}H NMR (400 Hz, $CDCl_3$-d1, i 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).

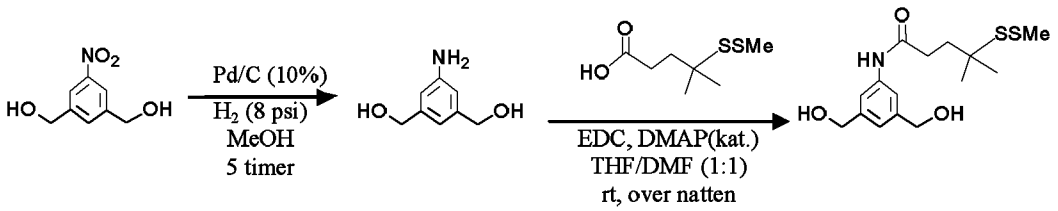
5-(N-4-Metylditio-4,4-dimetylbutanoyl)amino-1,3-bis-(mesyloksymetyl)-benzen kan fremstilles som følger:



Til en løsning av 5-(N-4-metylditio-4,4-dimetylbutanoyl)-amino-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen (329 mg, 1,0 mmol) i vannfri diklormetan (7 ml) ble det tilsatt trietylamin (348 µl, 2,5 mmol) fulgt av metansulfonylklorid (193 µl, 2,5 mmol) dråpevis i løpet av 10 minutter ved -2°C. Løsningen ble rørt ved 0°C i ytterligere 30 minutter, og reaksjonen ble deretter stoppet med en blanding av is og vann. Blandingen ble ekstrahert med kald diklormetan og de kombinerte diklormetansjiktene ble vasket med saltvann, tørket over vannfri natriumsulfat. Blandingen ble filtrert og filtratet fordampet ved rotasjonsfordampning i vakuum. Residuet ble raskt tørket med en kort silikagel kolonne (diklormetan/heksan/etylacetat, 1:2:4) som ga 5-(N-4-metylditio-4,4-dimetylbutanoyl)-amino-1,3-bis-(mesyloksymetyl)-benzen som en fargeløs olje (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-Metylditio-4,4-dimetylbutanoyl)-amino-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen ble fremstilt som følger:



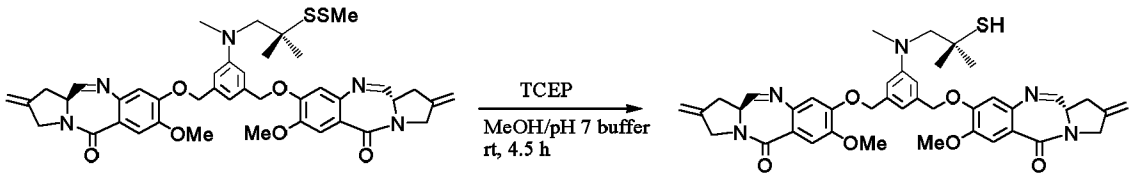
Til en løsning av 5-nitro-m-xylen-α,α'-diol (890 mg, 5,4 mmol) i metanol (50 ml) ble det tilsatt Pd/C (10%, 287 mg). En hydrogenatmosfære ble introdusert og blandingen ble hydrogenert under trykk (H_2, 5~8 psi) i 5 timer ved romtemperatur. Løsningen ble filtrert gjennom celit og filtratet ble fordampet ved rotasjonsfordampning i vakuum som ga 5-amino-m-xylen-α,α'-diol som deretter ble løst i THF (10 ml)/DMF (15 ml). 4-Metylditio-4,4-dimetylbutansyre (1,05 g, 5,4 mmol) løst i THF (5 ml) ble tilsatt ved romtemperatur fulgt av tilsetting av 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylkarbidiimidhydroklorid (2,1 g, 10,8 mmol) og 4-dimetylaminopyridin (66 mg, 0,54 mmol). Den oppnådde blandingen ble rørt ved romtemperatur over natten og deretter ble reaksjonen stoppet med 10% ammoniumklorid, ekstrahert med etylacetat, vasket og tørket. Blandingen ble filtrert og løsemidlene fjernet ved rotasjonsfordampning i vakuum. Residuet ble renset med flashkromatografi (CH_2Cl_2/MeOH, 15:1, 10:1, 7:1) som ga 5-(N-4-metylditio-4,4-dimetylbutanoyl)-amino-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen som et hvitt faststoff (729 mg).

MS (ESI): m/z = 352,1 MNa^+

^{1}H NMR (400 Hz, $CDCl_3$-d1, i 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).

Eksempel 17: 8,8'-[5-(N-metyl-N-(2-merkapto-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-benzendiyl(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

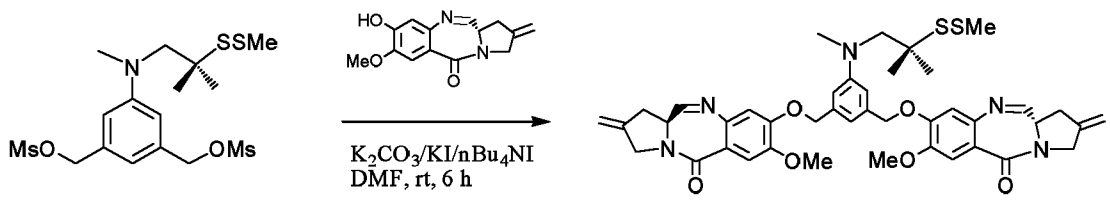
Kan fremstilles som følger:



Til en suspensjon av tris(2-karboksyetyl)fosfinhydroklorid (TCEP, 64 mg, 0,22 mmol) i vann (0,05 ml) ble det tilsatt mettet natriumbikarbonat (~0,7 ml) dråpevis for å justere pH til 6~7. En fosfatbuffer (pH 7,0, 10 mM, Na_2HPO_4/H_3PO_4, 0,8 ml) ble deretter tilsatt til blandingen. Den oppnådde TCEP-løsningen ble tilsatt til en blanding av 8,8'-[5-(N-metyl-N-(2-metylditio-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-benzendiyl(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (35 mg, 0,045 mmol) i metanol (5 ml) og blandingen rørt ved romtemperatur i 4,5 timer. Reaksjonen ble stoppet med en fosfatbuffer (pH 6,5) og blandingen ble ekstrahert med diklormetan. De kombinerte, organiske sjiktene ble vasket med saltvann, tørket over vannfri natriumsulfat, filtrert og løsemiddelet fjernet under redusert trykk som ga et hvitt faststoff. Det faste stoffet ble løst i diklormetan/MeOH (2:1) og fordampet igjen. Diklormetan ble tilsatt og blandingen fordampet. Residuet ble høyvakuumbehandlet og renset med omvendtfase C18-kolonne (CH_3CN/H_2O, det faste stoffet ble løst i CH_3CN/H_2O (3:1, 2 ml) og rørt i 30 minutter før tilsetting til kolonnen) som ga 8,8'-[5-(N-metyl-N-(2-merkapto-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-benzendiyl(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (19,5 mg, y = 32%) som et hvitt faststoff (fremgangsmåte 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-metyl-N-(2-metylditio-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-benzendiyl(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles som følger:

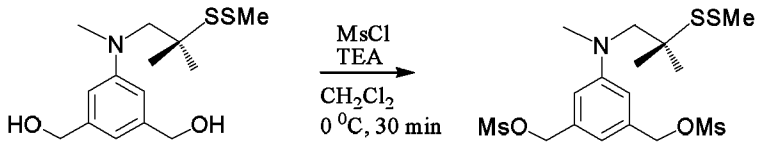


Til en løsning av 5-(N-metyl-N-(2-metylditio-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-bis-(mesyloksymetyl)-benzen (105 mg, 0,23 mmol) i vannfri DMF (2,5 ml) ble det tilsatt 8-hydroksy-7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on (119 mg, 0,46 mmol), kaliumkarbonat pulver (127 mg, 0,092 mmol), kaliumjodid pulver (20 mg, 0,12 mmol) og tetrabutylammoniumjodid (17 mg, 0,046 mmol) ved romtempeartur. Etter røring av blandingen i 1,5 timer ble en andre porsjon 8-hydroksy-7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on tilsatt (23 mg, 0,089 mmol). Løsningen ble fortsatt rørt ved romtemperatur i 4,5 timer. Reaksjonen ble deretter stoppet med vann og blandingen fortynnet med diklormetan. Det organiske sjiktet ble separert og vannsjiktet ekstrahert med diklormetan. De kombinerte organiske sjiktene ble vasket med saltvann og tørket over vannfri natriumsulfat. Løsningen ble filtrert og filtratet fordampet under redusert trykk, og deretter underkastet høytvakuum for å fjerne rest-DMF. Residuet ble suspendert i CH_3CN/H_2O (10:1) og filtrert. Filtratet ble fordampet og det urene produktet renset med omvendfase C18-kolonne (CH_3CN/H_2O) som ga 8,8'-[5-(N-metyl-N-(2-metylditio-2,2-dimetyletyl)-amino-1,3-benzendiyl(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (39 mg) som et hvitt faststoff (fremgangsmåte 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, i 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-metyl-N-(2-metylditio-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-bis-(mesyloksymetyl)-benzen kan fremstilles som følger:

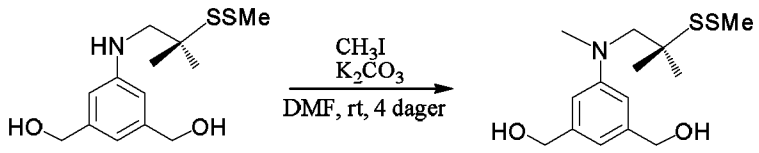


Til en løsning av 5-(N-metyl-N-(2-metylditio-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen (135 mg, 0,45 mmol) i vannfri diklormetan (3 ml) ble det tilsatt trietylamin (153 µl, 1,1 mmol) fulgt av metansulfonylklorid (87 µl, 1,1 mmol)

dråpevis i løpet av 10 minutter ved -2°C. Løsningen ble rørt ved 0°C i ytterligere 30 minutter og reaksjonen ble deretter stoppet med is/vann. Blandingen ble ekstrahert med kald diklormetan og de kombinerte diklormetansjiktene ble vasket med saltvann og tørket over vannfri natriumsulfat. Blandingen ble deretter filtrert og filtratet fordampet ved rotasjonsfordampning i vakuum. Residuet ble renset med en preparativ TLC-plate (heksan/etylacetat, 1:1,5) som ga 5-(N-metyl-N-(2-metylditio-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-bis-(mesyloksymetyl)-benzen som en fargeløs olje (105 mg).

MS (ESI): m/z = 480,0 MNa^+.

5-(N-metyl-N-(2-metylditio-2,2-dimetyletyl)amino-1,3,-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles som følger:

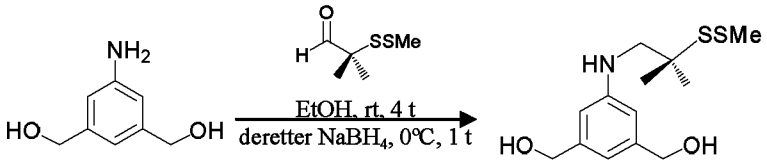


Til en løsning av 5-(N-(2-metylditio-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen (226 mg, 0,78 mmol) i DMF (4 ml) ble det tilsatt jodmetan (149 µl, 2,4 mmol) fuglt av kaliumkarbonatpulver (108 mg, 0,78 mmol). Etter røring ved romtempeartur i 4 dager, ble reaksjonen stoppet med mettet ammoniumklorid og blandingen deretter fortynnet med diklormetan. Det organiske sjiktet ble separert og vannsjiktet ekstrahert med diklormetan. De kombinerte organiske sjiktene ble vasket med saltvann og tørket over vannfri natriumsulfat. Løsningen ble filtrert og filtratet fordampet under redusert trykk. Residuet ble renset med flashkromatografi (heksan/etylacetat, 1:2) som ga 5-(N-metyl-N-(2-metylditio-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen som fargeløst skum (152 mg).

MS (ESI): m/z = 324,1 MNa^+

^1H NMR (400 Mhz, $CDCl_3$-d1, i 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-metylditio-2,2-dimetyletyl)-amino-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles som følger:

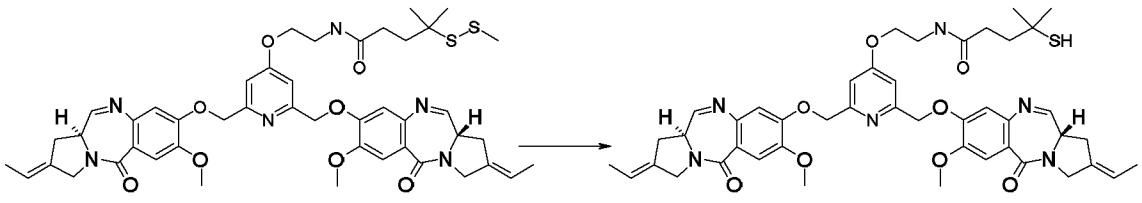


Til en løsning av 5-amino-1,3-bis-hydroksylmetylbenzen (765 mg, 5 mmol) i absolutt etanol (25 ml) ble det tilsatt 2-(metylditio)-isobutyraldehyd (751 mg, 5 mmol). Etter røring ved romtemperatur i 4 timer ble løsningen avkjølt til 0°C med et is/vannbad og natriumborhydrid (220 mg, 5,8 mmol) ble tilsatt. Blandingen ble fortsatt rørt ved 0°C i 1 time og reaksjonen ble deretter stoppet med kald 5% saltsyre og fortynnet med diklormetan. Mettet natriumbikarbonat ble tilsatt for å gjøre løsningen svakt basisk. Det organiske sjiktet ble separert og vannsjiktet ekstrahert med diklormetan. De kombinerte, organiske sjiktene ble vasket med saltvann og tørket over vannfri natriumsulfat. Løsningen ble filtrert og filtratet ble fordampet under redusert trykk. Residuet ble renset med flashkromatografi (CH_2Cl_2/MeOH, 15:1, 10:1) som ga 5-(N-(2-metylditio-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen som en fargeløs olje (832 mg).

MS (ESI): m/z = 310,0 $MNa^{+.}$

Eksempel 18: 8,8'-[(4-(2-(4-merkapto-4-metyl)-pentanamidoetoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodeiazepin-5-on

Kan fremstilles som følger:

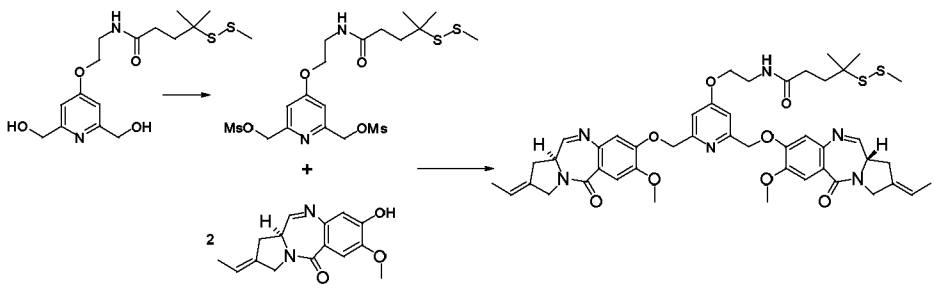


Til en løsning av 8,8'-[(4-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (60 mg) i metanol (1,6 ml) ble det tilsatt DMF (0,2 ml) og en løsning av tris(2-karboksyetyl)fosfinhydroklorid (48 mg) i vann (0,2 ml). Reaksjonsblandingen ble rørt i 18 timer ved romtemperatur og løsemiddelet fjernet i vakuum som ga et residu som ble renset med silikagel kromatografi (Merck SuperVarioFlash, 10 g kolonne, Si60 15-40 µm) ved anvendelse

av gradienteluering med en blanding av metanol (A) /diklormetan /acetonitril 9:1 (B), (gradient: 100% B ned til 10% A : 90% B) som ga 8,8'-[(4-(2-(4-merkapto-4-metyl)-pentanamidoetoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (17 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte A1, ZQ): ES: m/z = 855 $MH^+ + H_2O$
m/z = 837 MH^+
Retensjonstid = 3,70 minutter

8,8'-[(4-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan bli fremstilt som følger:



Til en avkjølt (0°C) løsning av 4-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin (360 mg) og trietylamin (810 µl) i diklormetan (4 ml) ble det tilsatt en løsning av metansulfonylklorid (298 µl) i diklormetan (4 ml). Etter 2 timer ble vann tilsatt. Sjiktene ble separert og vannsjiktet ekstrahert to ganger med diklormetan. De kombinerte organiske løsningene ble tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum til et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Interchrom Puriflash, 20 g kolonne, SiOH 15-35 µm), ved anvendelse av gradienteluering med en blanding av metanol (A) / diklormetan (B), (gradient: 100% B ned til 3% A : 97% B) som ga 280 mg av mesylatforbindelse.

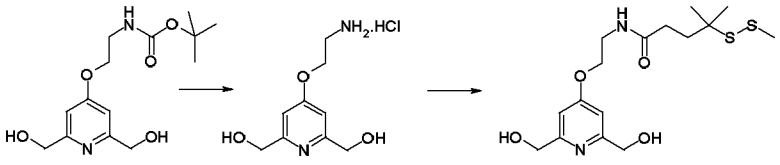
Til en løsning av pre-tomaymycin (120 mg) i dimetylformamid (4 ml) ble det tilsatt kaliumkarbonat (244 mg), kaliumjodid (147 mg) og en prøve av mesylatforbindelsen (137 mg). Reaksjonsblandingen ble rørt i 20 timer ved 30°C. Vann (20 ml) ble tilsatt og det resulterende faste stoffet ble filtrert, vasket med vann og tørket i vakuum som ga et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Interchrom Puriflash, 20 g kolonne, SiOH 15-35 µm), ved anvendelse av gradienteluering med en blanding av metanol (A) / diklormetan (B), (gradient: 100% B ned til 6% A : 94% B) som ga uren

forbindelse som ble løst i vann / acetonitril 1:1, og deretter konsentrert i vakuum som ga 8,8'-[(4-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (120 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte A1, ZQ): ES: m/z = 919 $MH^+ + 2\ H_2O$
m/z = 901 $MH^+ + H_2O$
m/z = 883 MH^+
Retensjonstid = 3,82 minutter.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$-d1, δ i 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) ; fra 3,50 til 4,20 (m, 6H) ; 4,00 (s, 6H) ; 4,27 (s, 4H) ; 5,27 (m, 4H) ; 5,61 (m, 2H) ; 5,87 (t bred, 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-Metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles som følger:



Til en løsning av 4-(2-tert-butoksykarbonylaminoetoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin (656 mg) i dioksan (3,5 ml) ble det tilsatt en løsning av saltsyre 4N i dioksan (5,5 ml). Etter 20 timer ved romtemperatur ble reaksjonsblandingen konsentrert i vakuum til et residu (603 mg).

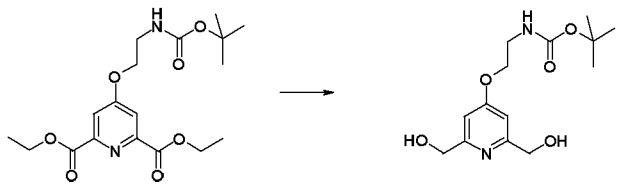
Til en løsning av en prøve fra foregående residu (150 mg) i dimetylformamid (3,5 ml) ble det tilsatt trietylamin (267 µl), 4-metyl-4-metyldisulfanylpentansyre (149 mg), N,N'-diisopropylkarbodiimid (119 µl) og 1-hydroksybenzotriazolhydrat (49 mg). Etter 15 timer ved romtemperatur ble vann tilsatt til reaksjonsblandingen og den vandige løsningen ble ekstrahert tre ganger med etylacetat. De kombinerte organiske løsningene ble vasket med en mettet natriumklorid vandig løsning, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum til et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Interchrom Puriflash, 20 g kolonne, SiOH 15-35 µm), ved anvendelse av gradienteluering med en blanding av metanol (A) / diklormetan (B) (gradient: 100% B

ned til 10% A : 90% B) som ga 4-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin (81 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 375 MH^+
m/z = 156 $C_7H_{10}NO_3^+$
Retensjonstid = 2,2 minutter.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i 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 bred, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,33 (d, J = 6,0 Hz, 2H) ; 6,84 (s, 2H) ; 8,13 (t bred, J = 5,5 Hz, 1H).

4-(2-tert-Butoksykarbonylaminoetoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin

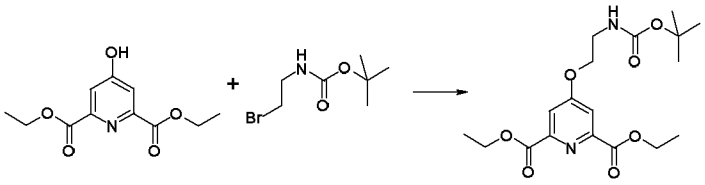


4-(2-tert-Butoksykarbonylaminoetoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstililng av 4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)pyridin, med utgangspunkt i 4-(2-tert-butoksykarbonylaminoetoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 299 MH^+
m/z = 156 $C_7H_{10}NO_3^+$
Retensjonstid = 1,7 minutter

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): δ = 1,39 (s, 9H) ; 3,32 (m delvis maskert, 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 bred, J = 6,0 Hz, 1H).

4-(2-tert-Butoksykarbonylaminoetoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester

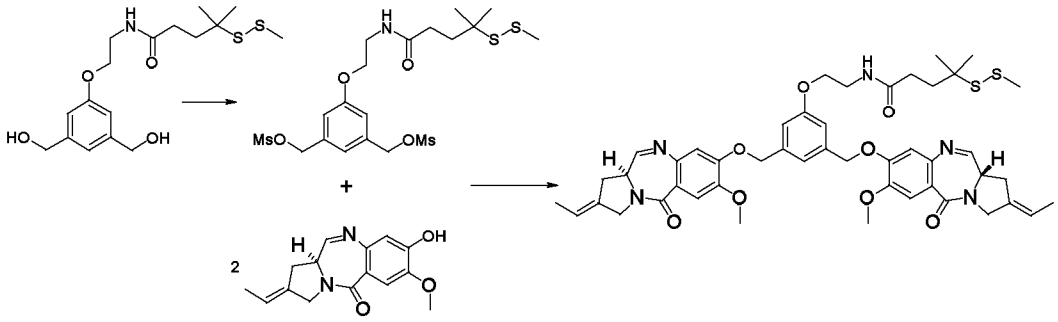


4-(2-tert-Butoksykarbonylaminoetoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester, ved anvendelse av 2-tert-butoksykarbonylaminoetylbromid:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 383 MH^+
m/z = 240 $C_{11}H_{14}NO_5^+$
Retensjonstid = 3,6 minutter

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): δ = 1,23 (t, J = 7,0 Hz, 6H) ; 1,37 (s, 9H) ; 3,33 (m delvis maskert, 2H) ; 4,22 (t, J = 5,5 Hz, 2H) ; 4,38 (q, J = 7,0 Hz, 4H) ; 7,01 (t bred, J = 5,5 Hz, 1H) ; 7,71 (s, 2H).

Eksempel 19: 8,8'-[(1-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

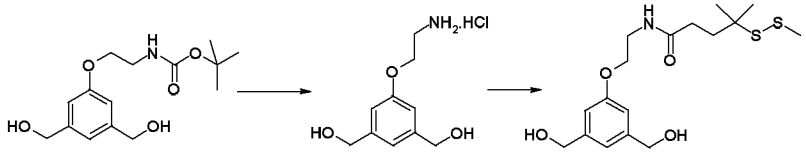


8,8'-[(1-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 8,8'-[(4-(2-(4-metyl-4-metylsidulfanyl)-pentanamidoetoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on], med utgangspunkt i 1-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen:

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform I): ES: m/z = 882 MH^+
Retensjonstid = 4,13 minutter

^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3-d1, δ i 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 bred, 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 bred, 2H) ; 7,09 (s bred, 1H) ; 7,53 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

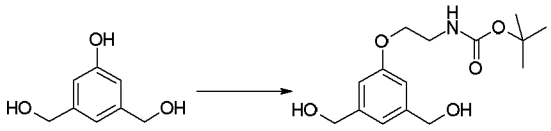
1-(2-(4-Metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen



1-(2-(4-Metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 4-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin ved anvendelse av 1-(2-tert-butoksykarbonylaminoetoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen:

^{1}H NMR (400 MHz, CDCl3-d1, δ i 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 bred, J = 6,0 Hz, 2H) ; 6,73 (s bred, 2H) ; 6,84 (s bred, 1H) ; 8,09 (t bred, 1H).

1-(2-tert-Butoksykarbonylaminoetoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen



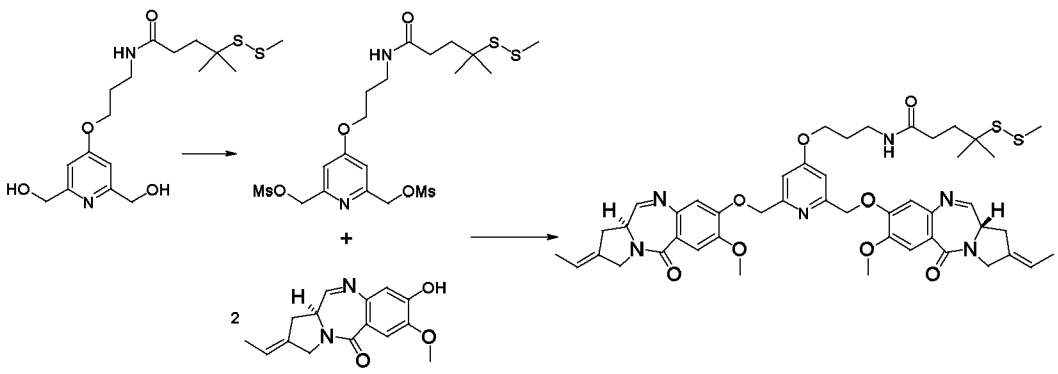
1-(2-tert-Butoksykarbonylaminoetoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 5-(3-ftalimidopropoksy)-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen ved anvendelse av 2-tert-butoksykarbonylaminoetylbromid:

LC/MS (Fremgangsmåte A3):	ES	m/z = 298	MH^+
		m/z = 242	$(M\ 0\ 2H - tBu)^+$
		m/z = 224	$(m/z = 242 - H_2O)^+$
		m/z = 206	$(m/z = 224 - H_2O)^+$
		m/z = 162	$(m/z = 206 - CO_2)^+$

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6, δ i 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 bred, 2H) ; 6,83 (s bred, 1H) ; 7,01 (t bred, J = 7,0 Hz, 1H).

Eksempel 20: 8,8'-[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

Kan fremstilles som følger:



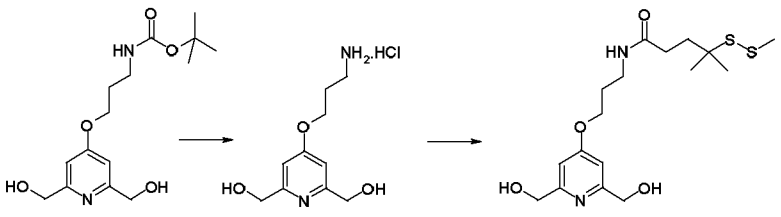
Til en avkjølt løsning (0°C) av 4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin (55 mg) og trietylamin (99 µl) i diklormetan (2 ml), ble det tilsatt metansulfonylklorid (36 µl). Etter 30 minutter ble vann tilsatt. Sjiktene ble separert og vannsjiktet ekstrahert to ganger med diklormetan. De kombinerte, organiske løsningene ble tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum til et residu (95 mg).

Til en rørt løsning av pre-tomaymycin (50 mg) i dimetylformamid (0,75 ml) ble det tilsatt kaliumkarbonat (114 mg), en løsning av det foregående residuet (55 mg) i dimetylformamid (1 ml) og kaliumjodid (46 mg). Reaksjonsblandingen ble rørt i 20 timer ved 30°C. De faste stoffene ble filtrert fra og vasket med dimetylformamid. Vann ble tilsatt til den kombinerte dimetylformamidløsningen og maursyre ble tilsatt til fullstendig oppløsning av presipitatet. Den resulterende løsningen ble injisert for HPLC-rensing i henhold til fremgangsmåte B. Passende fraksjoner ble kombinert og konsentrert ved sentrifugal fordampning over en Jouan Modell RC10.10.-apparatur som ga 8,8-[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (13,5 mg).

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 897 MH^+
m/z = 664 $(M - C_{10}H_{20}NOS2 + 2H)^+$
m/z = 234 $C_{10}H_{20}NOS_2^+$
Retensjonstid = 3,7 minutter

^{1}H NMR (500 MHz, CD3COOD-d4, δ i ppm): δ = 1,25 (s, 6H) ; fra 1,60 til 2,20 (m delvis maskert, 10H) ; 2,35 (m, 5H) ; fra 2,80 til 4,44 (m, 14H) ; 3,91 (s, 6H) ; 5,40 (s, 4H) ; 5,62 (m, 2H) ; fra 6,83 til 7,95 (m, 8H).

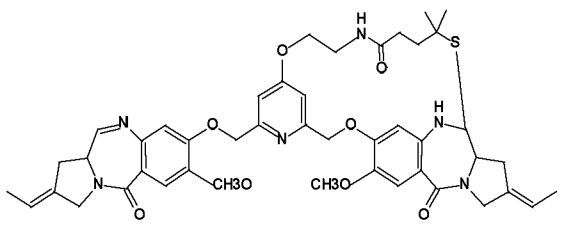
4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin



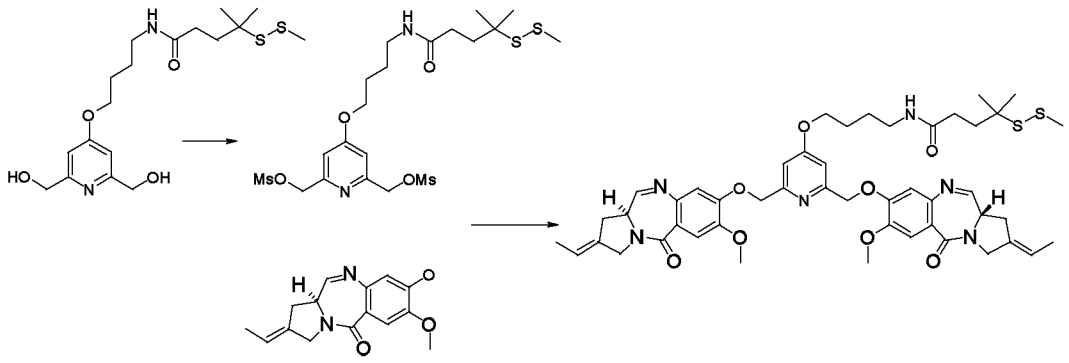
4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 4-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin ved anvendelse av 4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 389 MH^+
m/z = 234 $(M - C_7H_8NO_3)^+$
m/z =156 $C_7H_{10}NO_3^+$
Retensjonstid = 2,3 minutter.

Tiol (SH)-derivatet avledet fra forbindelsen i eksempel 20 er i likevekt med forbindelsen med formel:



Eksempel 21: 8,8'-[(4-(4-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidobutoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

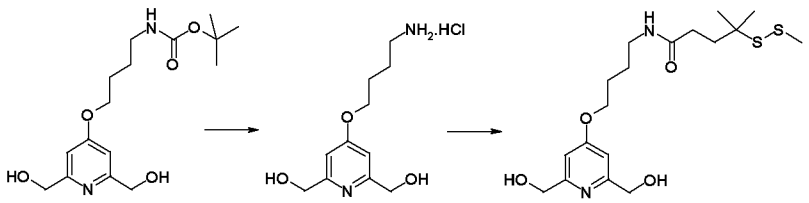


8,8'-[(4-(4-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidobutoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 8,8'-[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5-on] ved anvendelse 4-(4-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidobutoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin:

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform II): ES: m/z = 947 $MH^+ + 2\ H_2O$
m/z = 929 $MH^+ + H_2O$
m/z = 911 MH^+
Retensjonstid = 3,74 minutter

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

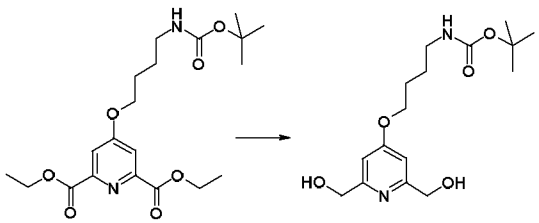
4-(4-(4-Metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidobutoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin



4-(4-(4-Metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidobutoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 4-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin ved anvendelse av (4-(4-tert-butoksykarbonylaminobutoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 403 MH^+
m/z = 248 $(M - C_7H_8NO_3)^+$
m/z = 156 $C_7H_{10}NO_3^+$
Retensjonstid = 2,3 minutter.

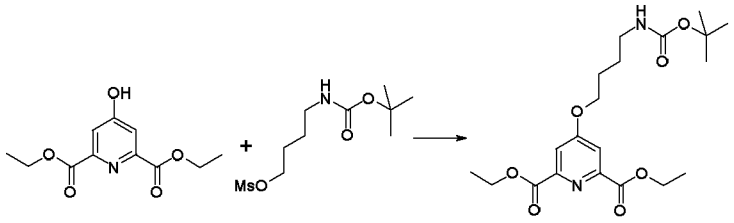
4-(4-tert-Butoksykarbonylaminobutoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin



4-(4-tert-Butoksykarbonylaminobutoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)pyridin med utgangspunkt i 4-(4-tert-butoksykarbonylaminobutoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 411 MH^+
m/z = 355 $(M + 2H - tBu)^+$
m/z = 240 $C_{11}H_{14}NO_5^+$
Retensjonstid = 3,9 minutter.

4-(4-tert-Butoksykarbonylaminobutoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester

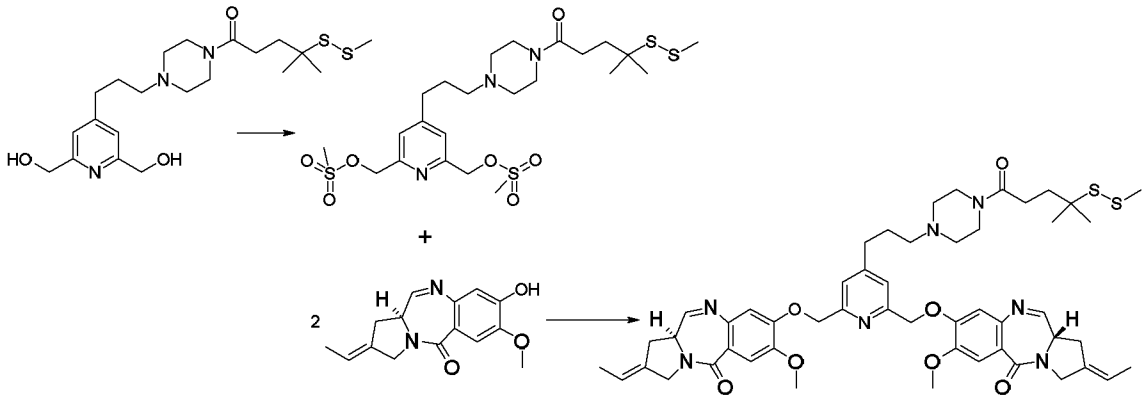


4-(4-tert-Butoksykarbonylaminobutoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 4-(3-tert-

butoksykarbonylaminopropoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester, ved anvendelse av metansulfonsyre-4-tert-butoksykarbonylaminobutylester (Cazenave Gassiot, A.; Charton, J., Girault-Mizzi, S., Gilleron, P., Debreu-Fontaine, M-A., Sergeraert, C., Melnyk, P., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005, 15(21), 4828):

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 327 MH^+
m/z = 271 $(M + 2H - tBu)^+$
m/z = 156 $C_7H_{10}NO_3^+$
Retensjonstid = 2,0 minutter

Eksempel 22: 8,8'-[(4-(3-[4-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

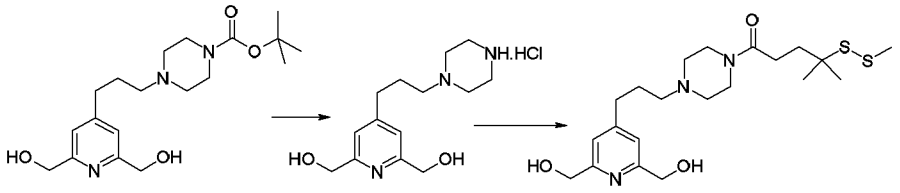


8,8'-[(4-(3-[4-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 8,8'-[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] ved anvendelse av 4-(3-[4-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-2,5-bis-(hydroksymetyl)-pyridin:

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform II): ES: m/z = 950 MH^+
Retensjonstid = 3,32 minutter

^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3, δ i ppm): δ = 1,32 (s, 6H) ; 1,76 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 1,80 (m, 2H) ; 1,94 (m, 2H) ; fra 2,27 til 2,46 (m, 11H) ; 2,67 (m, 2H) ; 2,97 (m, 4H) ; fra 3,40 til 3,70 (m, 4H) ; 3,90 (m, 2H) ; 4,00 (s, 6H) ; 4,27 (s bred, 4H) ; 5,29 (s bred, 4H) ; 5,60 (q bred, 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-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles som følger:



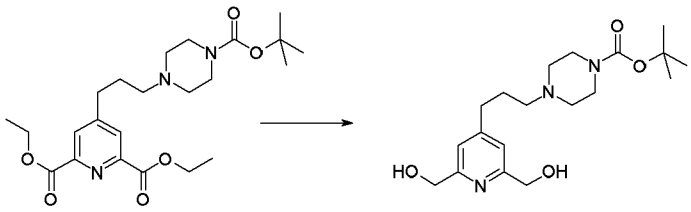
Til en løsning av 4-(3-(4-tert-butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-propyl)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin (610 mg) i dioksan (10 ml) ble det tilsatt en løsning av saltsyre 4N i dioksan (2,5 ml). Etter 4 timer ved romtemperatur ble reaksjonsblandingen konsentrert i vakuum til et residu (560 mg).

Til en løsning av en prøve av det foregående residuet (160 mg) i dimetylformamid (2,5 ml), ble det tilsatt N,N-diisopropyletylamin (181 µl), 4-metyl-4-metyldisulfanylpentansyre (158 mg), N,N'-diisopropylkarbodiimid (88 µl) og 1-hydroksybenzotriazolhydrat (15 mg). Etter 15 timer ved romtemperatur ble de faste stoffene filtrert fra og dimetylformamidløsningen ble injisert for HPLC-rensing i henhold til fremgangsmåte F. Passende fraksjoner ble kombinert og konsentrert ved frysetørking som ga 4-(3-[4-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin (105 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 442 MH^+
m/z = 266 $(M + 2H - C_7H_{13}OS_2)^+$
Retensjonstid = 2,3 minutter

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): δ = 1,27 (s, 6H) ; fra 1,70 til 1,83 (m, 4H) ; fra 2,25 til 2,39 (m, 8H) ; 2,40 (s, 3H) ; 2,63 (m, 2H) ; 3,43 (m, 4H) ; 4,49 (s, 4H) ; 5,28 (m bred, 2H) ; 7,18 (s, 2H).

4-(3-(4-tert-Butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-propyl)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin

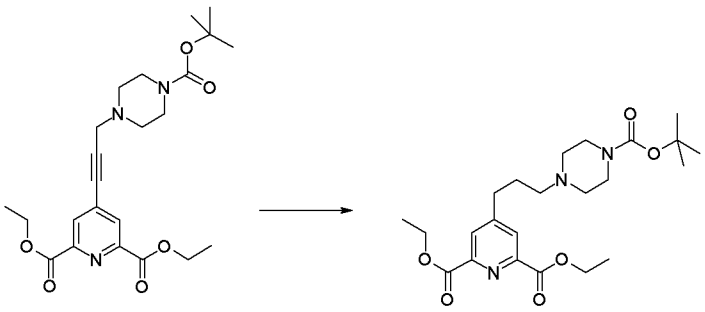


4-(3-(4-tert-Butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-propyl)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)pyridin, med utgangspunkt i 4-[3-(4-tert-butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-propyl]-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 366 MH^+
m/z = 310 $(M + 2H - tBu)^+$
m/z = 266 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$
Retensjonstid = 0,5 minutter

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): δ = 1,39 (s, 9H) ; 1,73 (m, 2H) ; 2,29 (m, 6H) ; 2,61 (m, 2H) ; 3,30 (m delvis maskert, 4H) ; 4,49 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,30 (t bred, J = 6,0 Hz, 2H) ; 7,18 (s, 2H).

4-[3-(4-tert-Butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-propyl]-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester

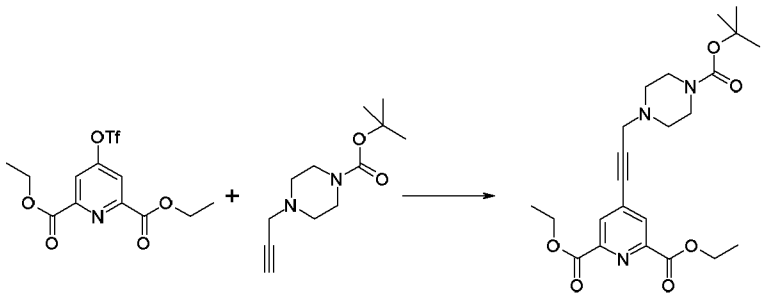


4-[3-(4-tert-Butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-propyl]-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 5-(3-tert-butoksykarbonyl-N-metylaminopropyl)-benzen-1,3-dikarboksylsyredietylester med utgangspunkt i 4-[3-(4-tert-butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-prop-1-ynyl]-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 450 MH^+
m/z = 394 $(M + 2H - tBu)^+$
m/z = 350 $(M\ 0\ 2H - CO_2tBu)^+$
Retensjonstid = 2,4 minutter

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i 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-Butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-prop-1-ynyl]-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester

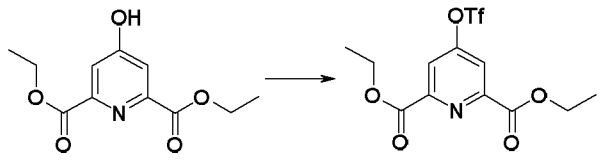


4-[3-(4-tert-Butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-prop-1-ynyl]-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 5-(3-tert-butoksykarbonyl-N-metylaminopropyn-1-yl)-benzen-1,3-dikarboksylsyredietylester med utgangspunkt i 4-trifluormetansulfonyloksypyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester og tert-butyl-4-propargylpiperazin-1-karboksylat (Zheng, H, Weiner, L.M., Bar-Am, O, Epsztein, S., Cabantchik, Z.I., Warshawsky, A., Youdim, M.B.H., og Fridkin, M., Bioorg. Med. Chem., 2005, 3, 773).

EI (Fremgangsmåte C) m/z = 445 M^+
m/z = 388 $(M - C_4H_9)^+$
m/z = 344 $(m/z = 388 - CO_2)^+$
m/z = 57 $C_4H_9^+$

^1H NMR (400 MHz, CDCl3-d1, δ i ppm): δ = 1,46 (t, J = 7,0 Hz, 6H) ; 1,48 (s, 9H) ; 2,60 (m bred, 4H) ; 3,52 (m bred, 4H) ; 3,62 (s bred, 2H) ; 4,49 (q, J = 7,0 Hz, 4H) ; 8,23 (s, 2H).

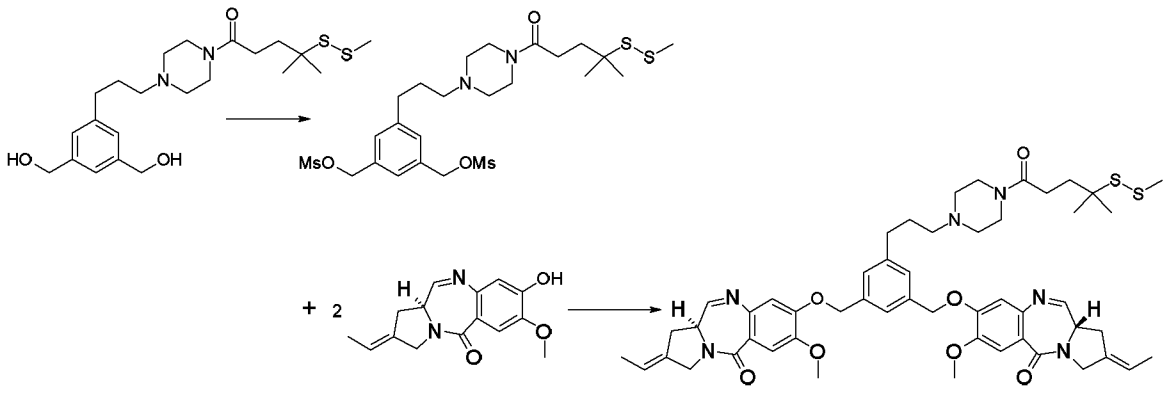
4-Trifluormetansulfonyloksypyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester kan fremstilles som følger:



Til en avkjølt (0°C) løsning av chelidamsyredietylester (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) i pyridin (35 ml) ble det dråpevis tilsatt trifluormetansulfonylklorid (2,6 ml). Reaksjonsblandingen ble deretter rørt ved romtemperatur i 3 timer. Vann og etylacetat ble tilsatt. Sjiktene ble separert og vannsjiktet ble ekstrahert to ganger med etylacetat. De kombinerte, organiske løsningene ble tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum til et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Merck SuperVarioPrep, 90 g kolonne, Si60 15-40 µm), eluert med diklormetan som ga 4-trifluormetansulfonyloksypyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester (4,2 g).

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform I): ES m/z = 372 MH^+
Retensjonstid = 4,38 minutter

Eksempel 23: 8,8'-[(1-(3-[4-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

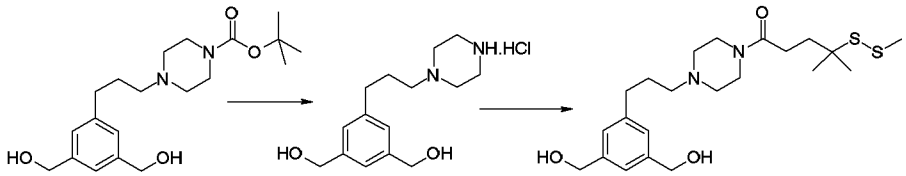


8,8'-[(1-(3-[4-(4-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-

tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 8,8'[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] ved anvendelse av 1-(3-[4-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 949 MH^+
m/z = 475,3 $(M + 2H)^{2+} / 2$
Retensjonstid = 3,3 minutter.

1-(3-[4-(4-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen

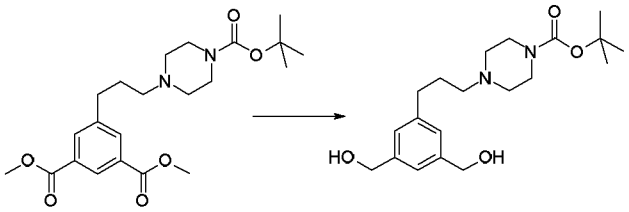


1-(3-[4-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 4-(3-[4-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin med utgangspunkt i 1-(3-(4-tert-butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-propyl)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 441 MH^+
Retensjonstid = 2,4 minutter

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): δ = 1,26 (s, 6H) ; 1,71 (m, 2H) ; 1,79 (m, 2H) ; fra 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 bred, 2H) ; 7,08 (s bred, 1H).

1-(3-(4-tert-Butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-propyl)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen

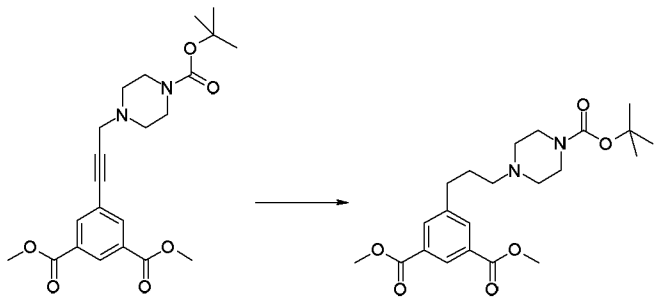


1-(3-(4-tert-Butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-propyl)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 5-(3-tert-butoksykarbonyl-N-metylaminopropyl)-1,3-bis-(hydroksymetyl)-benzen med utgangspunkt i 5-[3-(4-tert-butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-propyl]-isoftalsyredimetylester:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 365 MH^+
m/z = 309 $(M + 2H - tBu)^+$
Retensjonstid = 2,0 minutter

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): δ = 1,39 (s, 9H) ; 1,71 (m, 2H) ; 2,28 (m, 6H) ; 2,57 (m, 2H) ; 3,29 (m delvis maskert, 4H) ; 4,44 (d, J = 6,0 Hz, 4H) ; 5,08 (t, J = 6,0 Hz, 2H) ; 7,00 (s bred, 2H) ; 7,08 (s bred, 1H).

5-[3-(4-tert-Butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-propyl]-isoftalsyredimetylester



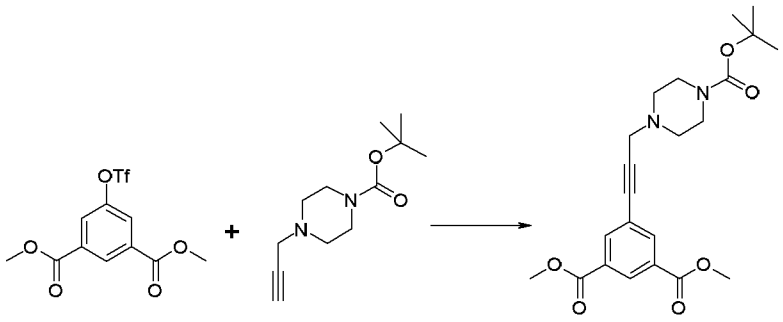
5-[3-(4-tert-Butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-propyl]-isoftalsyredimetylester kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 5-(3-tert-butoksykarbonyl-N-metylaminopropyl)-benzen-1,3-dikarboksylsyredimetylester med utgangspunkt i 5-[3-(4-tert-butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-prop-1-ynyl]-isoftalsyredimetylester:

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

Retensjonstid = 2,7 minutter

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): δ = 1,39 (s, 9H) ; 1,74 (m, 2H) ; 2,28 (m, 6H) ; 2,75 (m, 2H) ; 3,30 (m delvis maskert, 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-Butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-prop-1-ynyl]-isoftalsyredimetylester

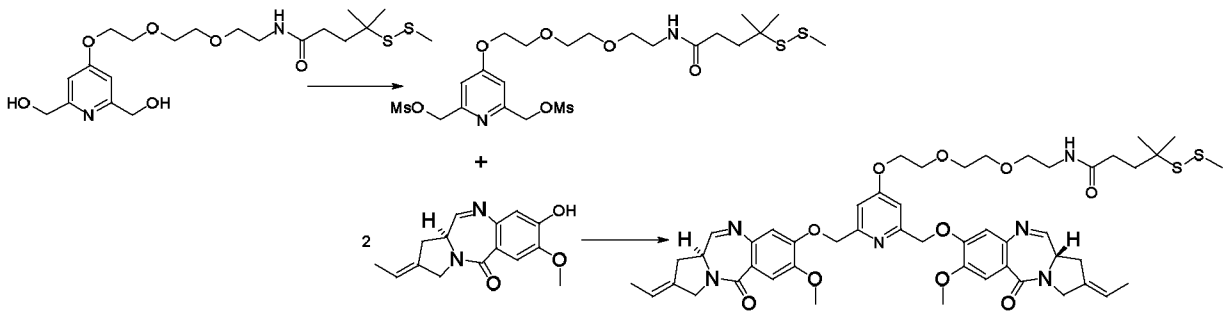


5-[3-(4-tert-Butoksykarbonylpiperazin-1-yl)-prop-1-ynyl]-isoftalsyredimetylester kan fremstilles ifølge fremgangsmåten for fremstilling av 5-(3-tert-butoksykarbonyl-N-metylaminopropyn-1-yl)-benzen-1,3-dikarboksylsyredietyelster med utgangspunkt i tert-butyl-4-propargylpiperazin-1-karboksylat:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 417 MH^+
m/z = 361 $(M + 2H - tBu)^+$
m/z = 317 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$
Retensjonstid = 3,1 minutter

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): δ = 1,40 (s, 9H) ; 2,50 (m maskert, 4H) ; 3,35 (m, 4H) ; 3,61 (s, 2H) ; 3,90 (s, 6H) ; 8,14 (s bred, 2H) ; 8,40 (s bred, 1H).

Eksempel 24: 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

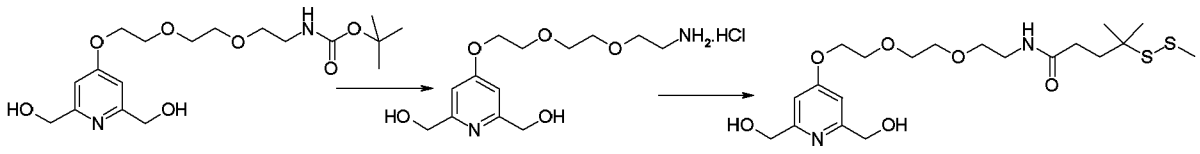


8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 8,8'-[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] ved anvendelse av 4-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 971 MH^+
m/z = 486,3 $(M + 2H)^{2+}/2$
Retensjonstid = 3,60 minutter

^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3-d1, δ i 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) ; fra 3,36 til 3,95 (m, 12H) ; 4,00 (s, 6H) ; 4,18 (m, 2H) ; 4,28 (s bred, 4H) ; 5,27 (m, 4H) ; 5,61 (m, 2H) ; 5,97 (m bred, 1H) ; 6,84 (s, 2H) ; 7,01 (s bred, 2H) ; 7,56 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

4-(2-{2-[2-(4-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin



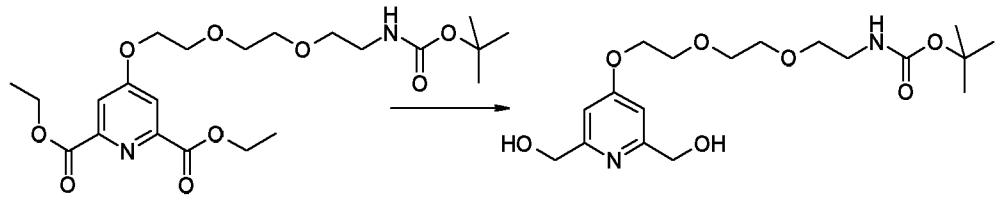
4-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 4-(3-[4-(4-metyl-4-metyldisulfanylpenanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-

2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin med utgangspunkt i 4-(2-{2-[2-tert-butoksykarbonylaminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 463 MH^+
Retensjonstid = 2,3 minutter

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i 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 bred, 2H) ; 6,85 (s, 2H) ; 7,90 (t bred, J = 6,0 Hz, 1H).

4-(2-{2-[2-tert-Butoksykarbonylaminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin

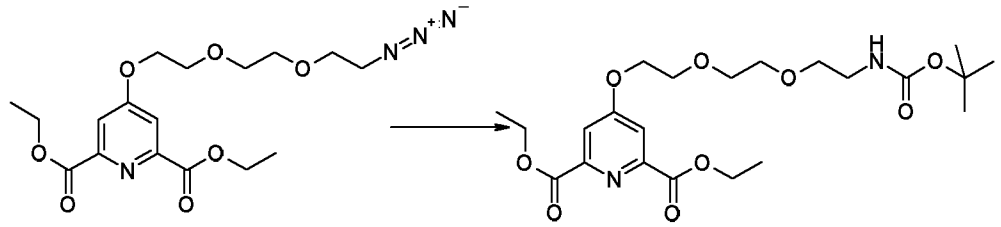


4-(2-{2-[2-tert-Butoksykarbonylaminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin med utgangspunkt i 4-(2-{2-[2-tert-butoksykarbonylaminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 387 MH^+
m/z = 331 $(M + 2H - tBu)^+$
Retensjonstid = 2,0 minutter

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i 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 bred, J = 6,0 Hz, 1H) ; 6,85 (s, 2H).

4-(2-{2-[2-tert-Butoksykarbonylaminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester kan fremstilles som følger:

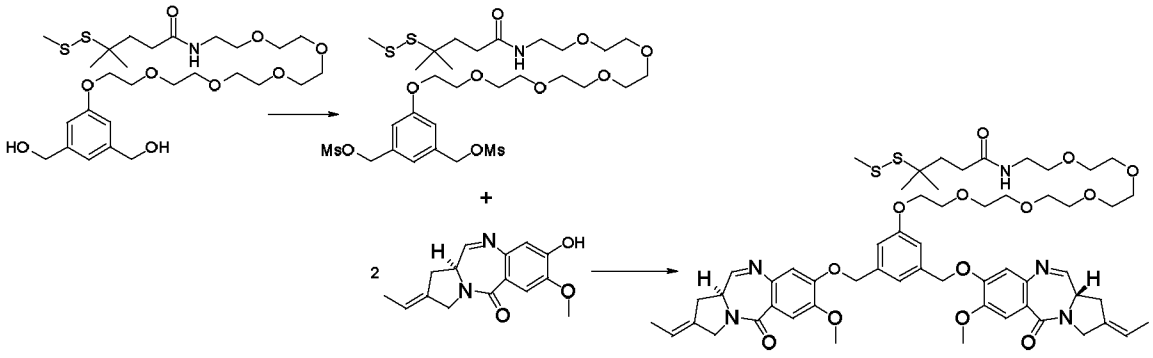


Til en løsning av 4-(2-{2-[2-azidoetoksy]-etoksy}-etoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester (Roy, B.C., Santos, M., Mallik, S., D. Campiglia, A.D., J. Org. Chem., 2003, 68(10), 3999) (900 mg) i etylacetat (18 ml) ble det tilsatt di-tert-butyldikarbonat (545 mg) og palladium 10% på karbon (73 mg). Løsningen ble rørt ved romtemperatur under en hydrogenatmosfære (2 bar) i 18 timer. Det faste stoffet ble filtrert fra og løsemiddelet fjernet i vakuum som ga et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Analogix Super Flash SiO_2 SF25-34 g), ved anvendelse av gradienteluering med en blanding av diklormetan (A) og metanol (B) (gradient: 100% A ned til 97,5% A : 2,5% B) som ga 4-(2-{2-[2-tert-butoksykarbonylaminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester (760 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES m/z = 471 MH^+
m/z = 415 $(M + 2H - tBu)^+$
m/z = 371 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$
Retensjonstid = 3,6 minutter

^1H NMR (300 MHz, DMSO-d6, δ i 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 maskert, 2H) ; 4,29 (q, J = 7,0 Hz, 4H) ; 6,70 (t bred, J = 6,0 Hz, 1H) ; 7,73 (s, 2H).

Eksempel 25: 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

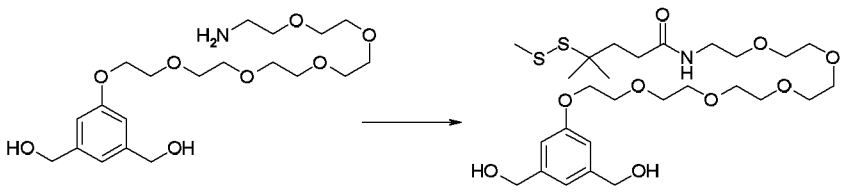


8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 8,8'-[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] ved anvendelse av 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen:

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform II): ES: m/z = 1102 MH^+
Retensjonstid = 4,49 minutter

^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3-d1, δ i 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) ; fra 3,33 til 3,96 (m, 24H) ; 3,96 (s, 6H) ; 4,12 (m, 2H) ; 4,27 (s bred, 4H) ; fra 5,07 til 5,24 (m, 4H) ; 5,60 (m, 2H) ; 6,21 (m bred, 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-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen

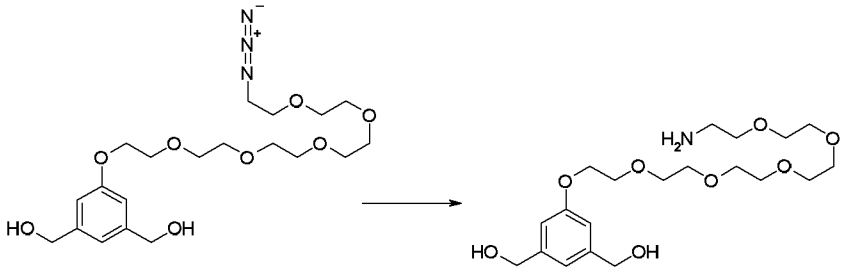


1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 1-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen med utgangspunkt i 1-(2-{2-[2-

(2-{2-[2-aminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen:

LC/MS (Fremgangsmåte G1): ES m/z = 594 MH^+
Retensjonstid = 1,9 minutter.

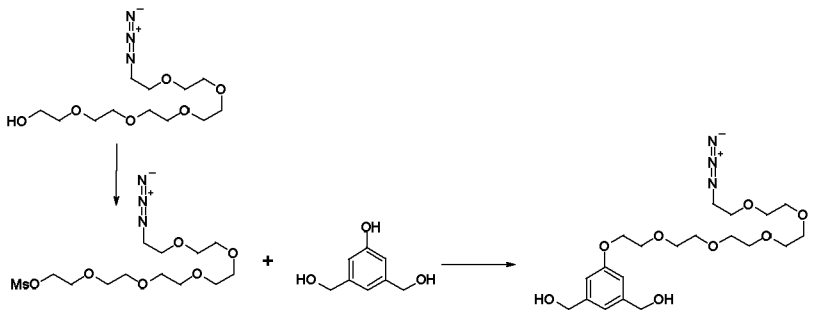
1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-Aminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles som følger:



Til en løsning av 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azidoetoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen (540 mg) i THF (5,5 ml) ble det tilsatt trifenylfosin (320 mg) og vann (22 µl). Løsningen ble rørt ved romtemperatur i 18 timer og løsemiddelet fjernet i vakuum til et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Merck SuperVarioFlash, 30 g kolonne, Si60, 15-40 µm, eluert med diklormetan / metanol 95:5, deretter diklormetan/metanol/NH_4OH 75:25:2,5 som ga 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-aminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen (430 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES: m/z = 418 MH^+
Retensjonstid = 1,3 og 1,7 minutter.

1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azidoetoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles som følger:

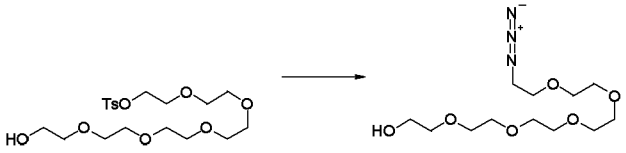


Til en avkjølt (0°C) løsning av 2-[2-(2-{2-[2-2-azidoetoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etanol (1,6 g) og trietylamin (1,45 ml) i diklormetan (40 ml) ble det tilsatt metansulfonylklorid (617 µl). Etter 1 time ble vann tilsatt. Sjiktene ble separert og det organiske sjiktet tørket over magnesiumsulfat, og konsentrert i vakuum til et residu 81,83 g).

En prøve av residuet (1,4 g), 3,5-bis-hydroksymetylfenol (510 mg) og kaliumkarbonat (686 mg) ble blandet i dimetylformamid (8 ml) og varmet opp til 70°C i 15 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til romtemperatur, vann ble tilsatt og den vandige løsningen ble ekstrahert 3 ganger med etylacetat. De kombinerte organiske løsningene ble vasket med en mettet natriumklorid vandig løsning, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum til et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Merck SuperVarioPrep, 70 g kolonne, Si60, 156-40 µm), eluert med en blanding av metanol (A) /diklormetan (B), (gradient: 2% A : 98% B til 10% A : 90% B) som ga 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azodietoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen (540 mg):

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

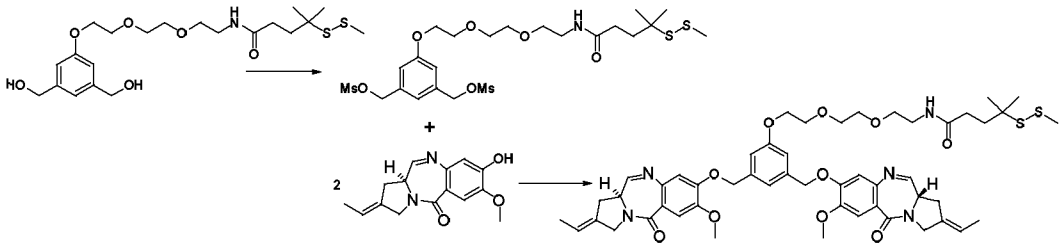
2-[2-(2-{2-[2-(2-Azidoetoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etanol kan fremstilles som følger:



Til en løsning av 2-[2-(2-{2-[2-(2-tosyloksyetoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etanol (Loiseau, F.A.; Hii, K.K.; Hill, A.M., J. Org. Chem., 2004, 69, 639) (4,5 g) i dimetylformamid (30 ml) ble det tilsatt natriumazid (0,89 g). Løsningen ble rørt ved 70°C i 18 timer og løsemiddelet ble deretter fjernet i vakuum til et residu. Diklormetan ble tilsatt og det resulterende presipitatet ble filtrert fra. Det organiske sjiktet ble konsentrert i vakuum som ga 2-[2-(2-{2-[2-(2-azidoetoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etanol (3,1 g):

CI (Fremgangsmåte D): m/z = 325 MNH_4^+.

Eksempel 26: 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

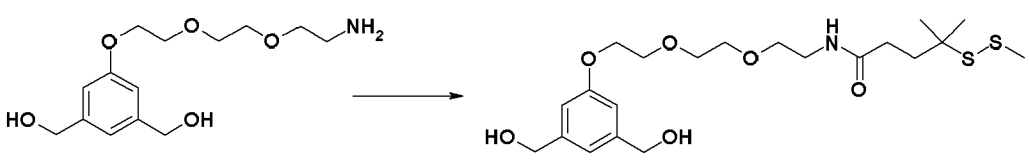


8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 8,8'-[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] ved anvendelse av 1-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen:

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform II): ES: m/z = 970 MH^+
Retensjonstid = 3,89 minutter

^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3-d1, δ i 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) ; fra 3,35 til 3,92 (m, 12H) ; 3,96 (s, 6H) ; 4,15 (m, 2H) ; 4,28 (s bred, 4H) ; fra 5,10 til 5,23 (m, 4H) ; 5,60 (q bred, J = 6,5 Hz, 2H) ; 6,05 (t bred, 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).

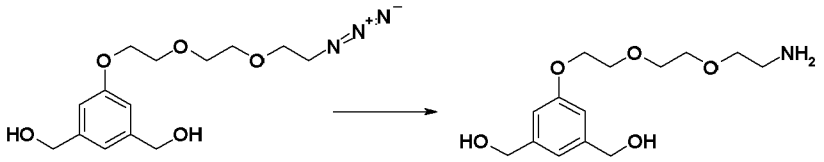
1-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen



1-(2-{2-[2-(4-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles ved å følge fremagngsmåten for fremstilling av 1-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen med utgangspunkt i 1-(2-{2-[2-aminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES: m/z = 462 MH^+
m/z = 444 $(M + H - H_2O)^+$
Retensjonstid = 3,0 minutter.

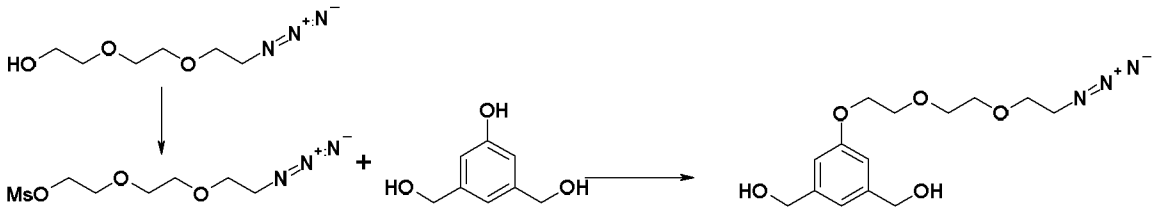
1-(2-{2-[2-Aminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen



1-(2-{2-[2-Aminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles ved følge fremgangsmåten for fremstilling av 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-aminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen med utgangspunkt i 1-(2-{2-[2-azidoetoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES: m/z = 286 MH^+
m/z = 268 $(M + H - H_2O)^+$
Retensjonstid = 0,8 minutter.

1-(2-{2-[2-Azidoetoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzenazido

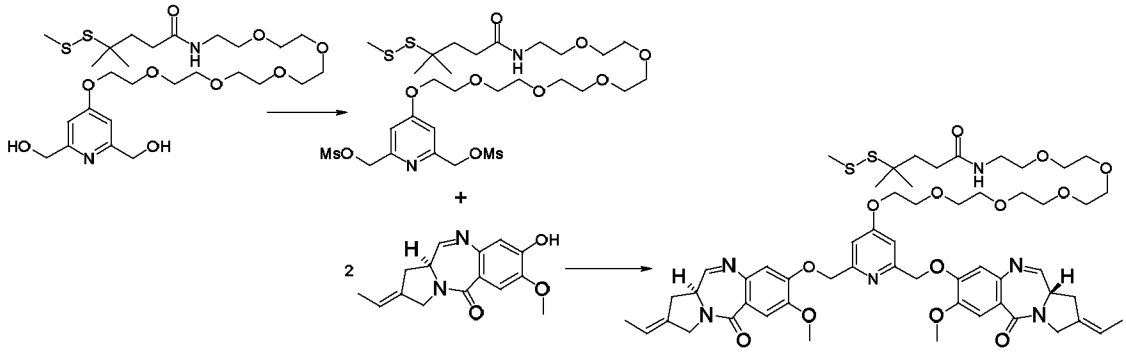


1-(2-{2-[2-azidoetoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azidoetoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen

med utgangspunkt i 2-[2-(2-azidoetoksy)-etoksy]-etanol (Roy, B.C.; Santos, M:, Mallik, S.; Campiglia, A.D., J. Org. Chem, 2003, 68(10), 3999):

CI (Fremgangsmåte D) m/z = 329 MNH_4^+.

Eksempel 27: 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

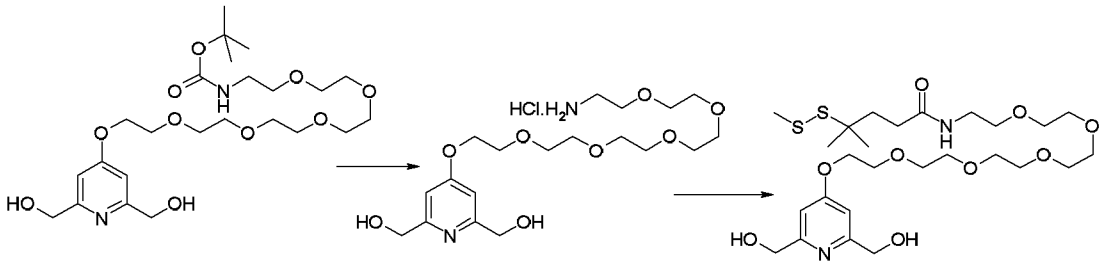


8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgansgmåten for fremstilling av 8,8'-[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] ved anvendelse av 4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES: m/z = 1103 MH^+
m/z = 552 $(M + 2H)^{2+}$ /2
Retensjonstid = 3,7 minutter

^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3-d1, δ i 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) ; fra 3,33 til 3,95 (m, 24H) ; 3,99 (s, 6H) ; 4,18 (m, 2H) ; 4,28 (s bred, 4H) ; 5,27 (m, 4H) ; 5,60 (m, 2H) ; 6,19 (m bred, 1H) ; 6,82 (s, 2H) ; 7,00 (s bred, 2H) ; 7,55 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

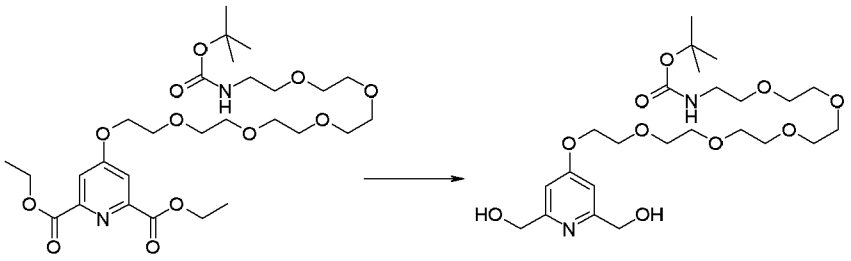
4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin



4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-Metyl-4-metyldisulfanylpentanoylamino)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 4-(3-[4-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin med utgangspunkt i 4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-tert-butoksykarbonylaminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin :

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES : m/z = 596 MH^+
Retensjonstid = 2,4 minutter

4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-tert-Butoksykarbonylaminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin

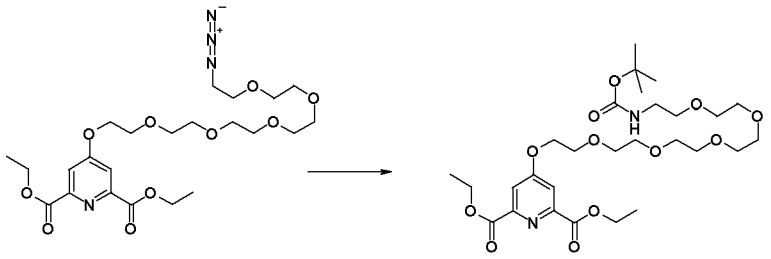


4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-tert-Butoksykarbonylaminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl) pyridin med utgangspunkt i 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-tert-butoksykarbonylaminoetoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES: m/z = 519 MH^+

Retensjonstid = 2,2 minutter.

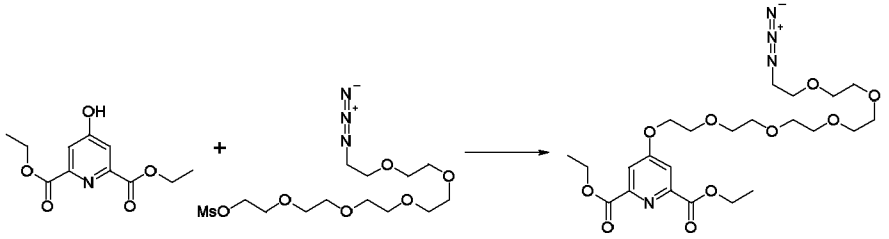
4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-tert-Butoksykarbonylaminoetoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester



4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-tert-Butoksykarbonylaminoetoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester kan fremstilles ved å følge fremagngsmåten for fremstilling av 4-(2-{2-[2-tert-butoksykarbonylaminoetoksy]-etoksy}-etoksy)-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester med utgangspunkt i 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-azidoetoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES: m/z = 603 MH^+
m/z = 271 $(M + 2H - CO_2tBu)^+$
Retensjonstid = 3,6 minutter

4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-Azidoetoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester kan fremstilles som følger:

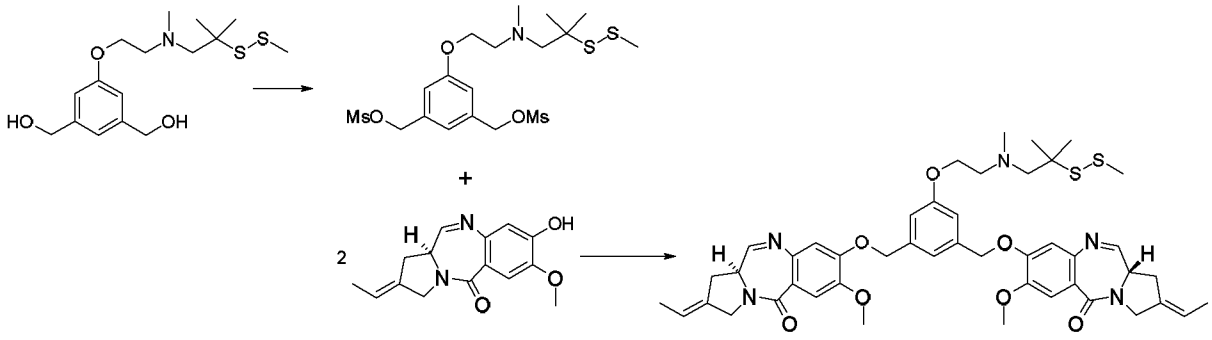


Til en løsning av chelidamsyredietylester (1,03 g) i dimetylformamid (10 ml) ble det tilsatt metansulfonsyre-2-[2-(2-{2-[2-(2-azidoetoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etylester (1,82 g) og kaliumkarbonat (893 mg). Den resulterende blandingen ble varmet opp til 70°C i 15 timer og ble deretter avkjølt til romtemperatur. Vann ble tilsatt og den vandige løsningen ble ekstrahert tre ganger emd etylacetat. De kombinerte organiske løsningene ble vasket med mettet natriumklorid vandig løsning, tørket over

magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum til et redisu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Merck SuperVarioPrep, 70 g kolonne, Si60, 15-40 µm), eluert med en blanding av metanol (A) / diklormetan (B) (gradient: 3% A : 97% B til 5% A : 95% B) som ga 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-azidoetoksy)-etoksy]-etoksy}-etoksy)-etoksy]-etoksy}-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester (2,19 g):

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES: m/z = 529 MH^+
Retensjonstid = 3,4 minutter

Eksempel 28: 8,8'-[(1-(2-[metyl-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-amino]-etoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]



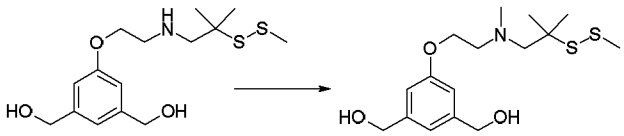
8,8'-[(1-(2-[Metyl-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-amino]-etoksy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgangmåten for fremstilling av 8,8'-[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] ved å benytte 1-(2-[metyl-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-amino]-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen:

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform I): ES: m/z = 872 $MH^+ + H_2O$
m/z = 854 MH^+
Retensjonstid = 3,40 minutter

^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3-d1, δ i 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 bred, 4H) ; 5,12 (d, J = 12,5 Hz,

2H) ; 5,19 (d, J = 12,5 Hz, 2H) ; 5,60 (q bred, J = 6,5 Hz, 2H) ; 6,82 (s, 2H) ; 6,95 (s bred, 2H) ; 7,06 (s bred, 1H) ; 7,52 (s, 2H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

1-(2-[metyl-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-amino]-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles som følger:

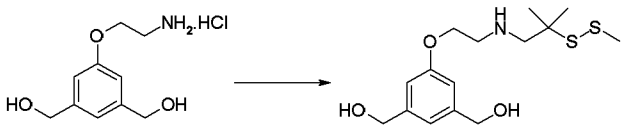


Til en avkjølt (5°C) suspensjon av 1-(2-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-aminoetoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen (280 mg) i formaldehyd (228 µL), ble det tilsatt maursyre (319 µl). Den resulterende blandingen ble varmet opp til 100°C i 1 time og 15 minutter og ble deretter avkjølt til romtemperatur. Vann og is ble tilsatt fulgt av en vandig løsning av natriumhydroksid til pH = 12. Den resulterende vandige løsningen ble ekstrahert tre ganger med etylacetat og de kombinerte, organiske løsningene ble tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum til et residu. Residuet ble renset med silikagel kromatografi (Merck SuperVarioFlash, 25g kolonne, Si60 15-40µm), eluert med en blanding av metanol (A) / diklormetan (B), (gradient: 2% A : 98% B til 5% A : 95% B) som ga 1-(2-[metyl-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-amino]-etoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen (210 mg):

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES: m/z = 346 MH^+
m/z = 212 $(M + 2H - C_5H_{11}S_2)^+$
m/z = 135 $C_5H_{11}S_2^+$
Retensjonstid = 2,1 minutter

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i 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 bred, 2H) ; 6,82 (s bred, 1H) .

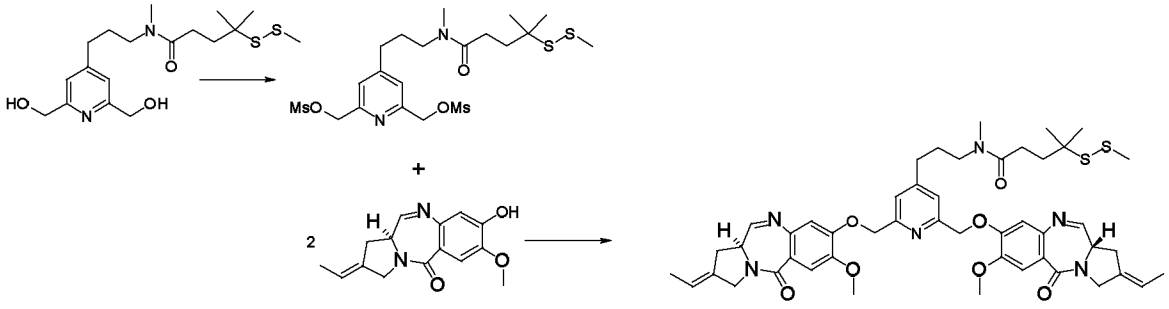
1-(2-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-aminoetoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen kan fremstilles som følger:



Til en suspensjon av 1-(2-aminoetoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzenhydroklorid (900 mg) i tetrahydrofuran (4,5 ml) ble det tilsatt trietylamine (1,07 ml). Etter røring i 15 minutter ble 2-(metylditio)isobutyraldehyd (530 µl) og titanisopropoksid (1,42 mg) tilsatt og den resulterende blandingen ble rørt ved romtemperatur i 2 timer. Etanol (9 ml) og natriumcyanoborhydrid (242 mg) ble tilsatt og den nye blandingen ble rørt ved romtemperatur i 18 timer. Faste stoffet ble filtrert fra og filtratet ble konsentrert i vakuum til et residu. Residuet ble deretter fortynnet med etylacetat og de resulterende faste stoffene ble filtrert fra. Den organiske løsningen ble deretter vasket med vann og med mettet natriumklorid vandig løsning, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert i vakuum som ga et nytt residu som ble renset med silikagel kromatografi (Merck SuperVarioFlash, 30 g kolonne, Si60 15-40µm), eluert med en blanding av metanol (A) / diklormetan (B), (gradient: 4% A : 96% B til 10% A : 90% B) som ga 1-(2-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-aminoetoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen (290 mg):

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ i ppm): δ = 1,27 (s, 6H) ; 1,82 (m bred, 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 bred, 2H) ; 6,83 (s bred, 1H).

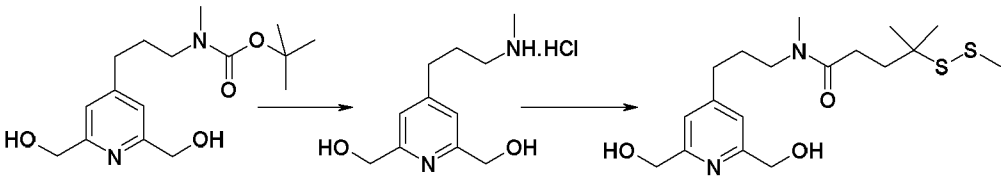
Eksempel 29: 8,8'-[(4-(3-[metyl-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]



8,8'-[(4-(3-[metyl-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 8,8'-[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidopropoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-on] ved anvendelse av 4-(3-[metyl-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-amino]-propyl)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin:

^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3-d1, δ i ppm): δ = 1,32 (s, 6H) ; 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H) ; 1,94 (m, 4H) ; fra 2,20 til 4,30 (m, 18H) ; 4,00 (s, 6H) ; 4,27 (s bred, 4H) ; fra 5,21 til 5,68 (m, 6H) ; fra 6,80 til 7,70 (m, 8H) .

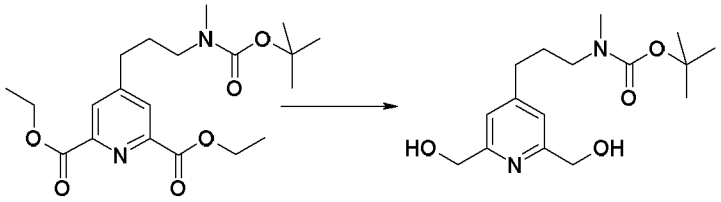
4-(3-[Metyl-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-amino]-propyl)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin



4-(3-[Metyl-(4-metyl-4-metyldisulfanylpentanoyl)-amino]-propyl)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 4-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin ved anvendelse av 4-(3-(tert-butoksykarbonylmetylamino)-propyl)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin:

LC/MS (Fremgangsmåte A3): ES: m/z = 387 MH^+
Retensjonstid = 2,5 minutter.

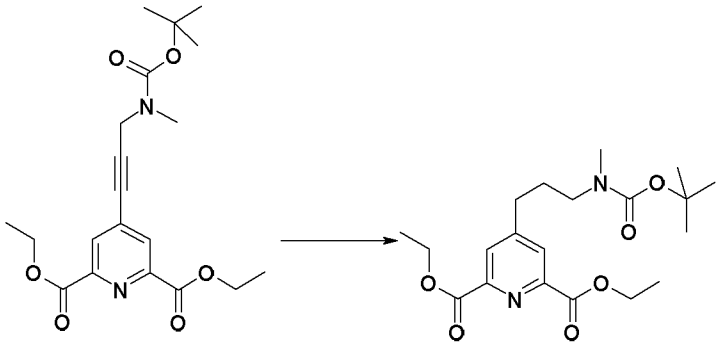
4-(3-(tert-Butoksykarbonylmetylamino)-propyl)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin



4-(3-(tert-Butoksykarbonylmetylamino)-propyl)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropoksy)-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin ved anvendelse av 4-(3-(tert-butoksykarbonylmetylamino)-propyl)-pyridin-2,6-bis-dikarboksylsyredietylester:

CI (Fremgangsmåte D) m/z = 311 MH^+.

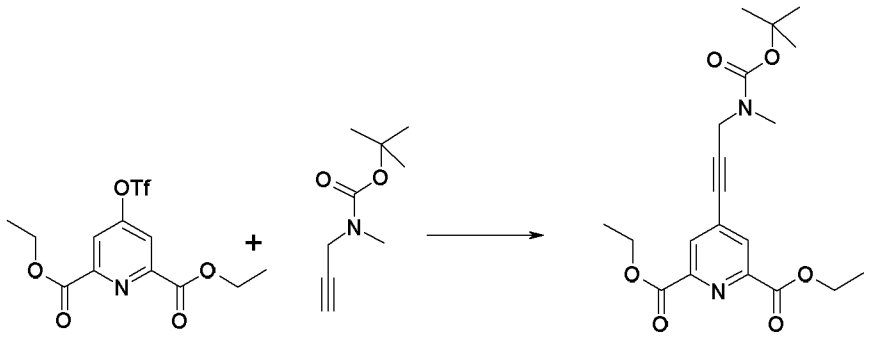
4-(3-(tert-Butoksykarbonylmetylamino)-propyl)-pyridin-2,6-bis-dikarboksylsyredietylester



4-(3-(tert-Butoksykarbonylmetylamino)-propyl)-pyridin-2,6-bis-dikarboksylsyredietylester kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 5-(3-tert-butoksykarbonyl-N-metylaminopropyl)-benzen-1,3-dikarboksylsyredietylester med utgangspunkt i 4-[3-(tert-butoksykarbonylmetylamino)-prop-1-ynyl]-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester:

LC/MS (Fremgangsmåte G2): ES: m/z = 395 MH^+
m/z = 339 $(M + 2H - tBu)^+$
Retensjonstid = 7,5 minutter.

4-[3-(tert-Butoksykarbonylmetylamino)-prop-1-ynyl]-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester

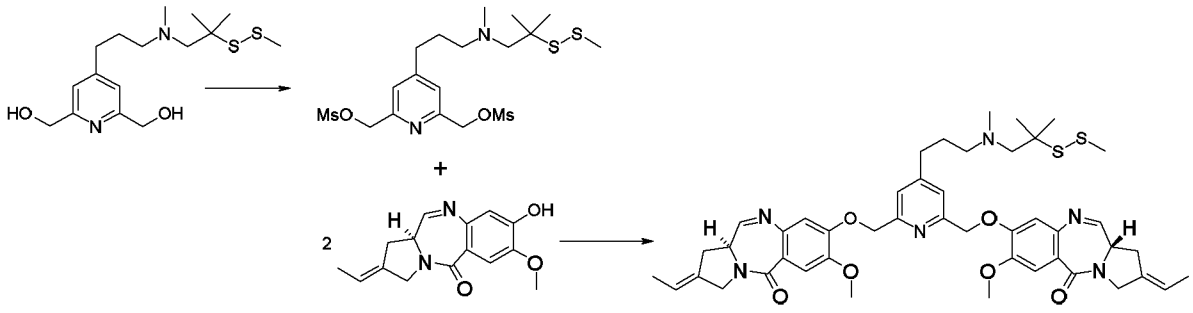


4-[3-(tert-Butoksykarbonylmetylamino)-prop-1-ynyl]-pyridin-2,6-dikarboksylsyredietylester kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 5-(3-tert-butoksykarbonyl-N-metylaminopropyn-1-yl)-benzen-1,3-

dikarboksylsyredietylester med utgangspunkt i tert-butoksykarbonyl-N-metylpropargylamin.

CI (Fremgangsmåte D) m/z = 391 MH^+.

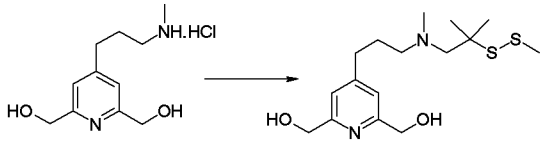
Eksempel 30: 8,8'-[(4-(3-[metyl-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]



8,8'-[(4-(3-[Metyl-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 8,8'-[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamido-propoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-on] ved anvendelse av 4-{3-[metyl-(2-metyl-2-metyldisulfanyl-propyl)-amino]-propyl}-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin:

^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3-d1, δ i ppm): δ = 1,28 (s, 6H) ; 1,65 (m delvis maskert, 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 bred, 4H) ; 5,29 (s, 4H) ; 5,60 (q bred, 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-[Metyl-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-amino]-propyl}-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin



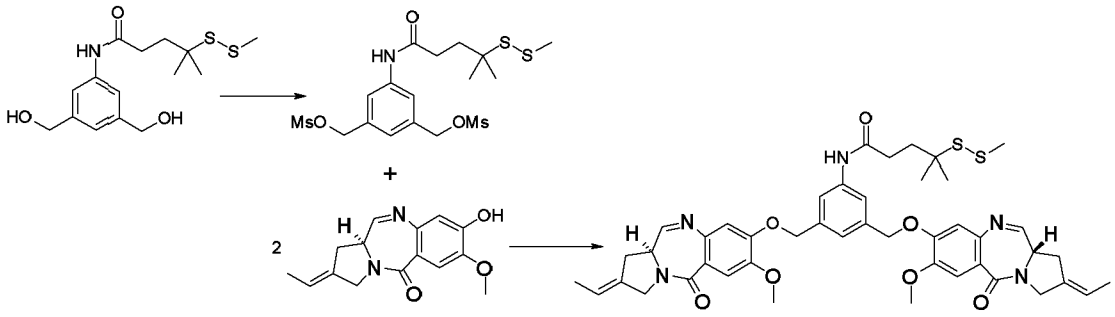
P-34409-034-3

4-{3-[Metyl-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-amino]-propyl}-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 1-(2-(2-metyl-2-metyldisulfanylpropyl)-aminoetoksy)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen ved anvendelse av 4-{3-[metylamino]-propyl}-2,6-bis-(hydroksymetyl)-pyridin:

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform II): ES m/z = 345 MH^+
Retensjonstid = 1,15 minutter.

Eksempel 31: 8,8'-[(1-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamido)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

Kan fremstilles som følger:



8,8'-[(1-(4-Metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamido)-benzen-3,5-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] kan fremstilles ved å følge fremgangsmåten for fremstilling av 8,8'-[(4-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamidoetoksy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioksy]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-dimetoksy-1,2,3,11a-tetrahydropyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] med utgangspunkt i (1-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamido)-3,5-bis-(hydroksymetyl)-benzen:

LC/MS (Fremgangsmåte A1, Platform I): ES: m/z = 838 MH^+
Retensjonstid = 4,11 minutter

^{1}H NMR (500 MHz, CDCl3-d1, δ i 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 bred, 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) ; fra 7,20 til 7,60 (m, 6H) ; 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H).

De korresponderende merkaptoderivatene til forbindelsene i eksempler 19-31 kan fremstilles ved anvendelse av fremgangsmåtene beskrevet i eksempel 18.

Eksempel A: Generell fremgangsmåte for konjugatfremstilling:

Anti-B4-antistoff som binder til CD19-antigenet foretrukket uttrykt på overflaten av humane lymfomceller velges for konjugering av tomaymycinderivater.

I første trinn blir antistoffet reagert med det modifiserte middelet N-sulfosuksinimidyl-5-nitro-2-pyridylditiobutanoat (SSNPB) for å introdusere nitropyriditiogrupper. En løsning av huC242-antistoff ved en konsentrasjon på 8 mg/ml i en vandig buffer som inneholder 0,05 M kaliumfosfat, 0,05 M natriumklorid og 2 mM etylendiamintetraeddiksyre (EDTA), pH 6,5 (65,6 ml) behandlet med et 8-ganger molart overskudd av en løsning av SSNPB i dimetylacetamid (DMA). Reaksjonsblandingen røres ved romtemperatur i 90 minutter og tilsettes deretter til en Sephadex G25-gel filtreringskolonne (50 mm x 35,5 mm, kolonne) som på forhånd har blitt likevektsinnstilt i en vandig buffer som inneholder 0,05 M kaliumfosfat, 0,05 M natriumklorid og 2 mM EDTA, pH 7,5. De modifiserte antistoffinneholdende fraksjonene ble samlet opp og satt sammen for å gi produktet. En liten alikvot av det modifiserte antistoffet ble behandlet med ditiotreitol for å spalte nitropyridyl disulfidet og frigivelse av nitropyridin-2-tion ble undersøkt spektrofotometrisk ($\varepsilon_{323\ nm}$ = 4,299 $M^{-1}cm^{-1}$, $\varepsilon_{280\ nm}$ = 565 $M^{-1}cm^{-1}$ for forbindelsen, og $\varepsilon_{280\ nm}$ = 217,560 $M^{-1}cm^{-1}$ for antistoffet). Et gjennomsnitt på 4-6 nitropyridyldisulfidmolekyler blir typisk bundet per molekylantistoff.

Det modifiserte antistoffet fortynnes til 2,5 mg/ml i bufferen ovenfor ved pH 7,5 og behandles deretter med en løsning av tomaymycinderivat i DMA, slik at sluttkonsentrasjonen av DMA i bufferen er 20%. Konjugasjonsblandingen røres ved romtemperatur i 16 timer. Reaksjonsblandingen renses ved passering gjennom en Sephacryl S300 gelfiltreringskolonne (50 mm x 42 cm, kolonne som på forhånd har blitt likevektsinnstilt i en fosfatbufret saltvann (PBS)-buffer ved pH 6,5). Fraksjoner som inneholder monomerisk antistoff-tomaymycinderivatkonjugat samles opp og dialyseres over i PBS-bufferen. Det endelige konjugatet undersøkes spektrofotometrisk ved anvendelse av ekstiksjonskoeffisitene som bestemmes separat for hvert tomaymycinderivat.

SPDB-PBD- og SMCC-PBD-konjugater til forbindelser ifølge oppfinnelsen

huB4-SPDB – Forbindelse i eksempel 16

Eksempel A1:
Anti-B4-antistoff som binder til CD19-antigenet uttrykt foretrukket på overflaten til humane lymfoceller velges for konjugering av tomaymycinderivatene.

Antistoffet ble først modifisert med 4-(2-pyridylditio)-butansyre-N-hydroksysuksinimidester (SPDB) for å introdusere pyridylditiogrupper. Et 4,5-ganger molart overskudd av SPDB (0,25 µmol, 81,1 µg) i dimetylaceatmid (DMA) (50 µl) tilsettes til en løsning av huB4 (8 mg, 0,055 µmol) i vandig buffer som inneholder 50 mM kaliumfosfat, 50 mM natriumklorid og 2 mM etylendiamintetraeddiksyre (EDTA), pH 6,5 (0,95 ml). Den endelige proteinkonsentrasjonen var 8 mg/ml med 5% DMA i buffer. Modifikasjonen ble rotert ved romtemperatur i 90 minutter og ble deretter renset på en Sephadex G25 gelfiltreringskolonne likevektsinnstilt i en vandig buffer som inneholder 50 mm kaliumfosfat, 50 mM natriuklorid og 2 mM EDTA, pH 7,5. En liten alikvot av det modifiserte antistoffet ble behandlet med ditiotreitol (DTT) for å spalte pyridyldisulfidgruppene. Det modifiserte antistoffet og frigjort pyridintiol ble undersøkt spektrofotometrisk (ε_{343} = 8,080 $M^{-1}cm^{-1}$ for frigitt pyridintiol, ε_{280} = 5100 $M^{-1}cm^{-1}$ for de modifiserte pyridylditiogruppene og ε_{280} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$ for antistoff). Et gjennomsnitt på 3,36 pyridylsulfidmolekyler per molekyl antistoff ble bundet.

Det modifiserte antistoffet (2,29 mg, 0,016 µmol) ble fortynnet i den ovenfor nevnte bufferen ved pH 7,5 (732,8 µl) og DMA (91,6 µl, 10% v/v) og deretter behandlet med en løsning av 8,8'-[5-(N-4-merkapto-4,4-dimetylbutanoyl)amino-1,3-benzen-iylbis(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (forbindelse i eksempel 16) (0,157 µmol, 0,12 mg) i DMA (91,6 µl, 10% v/v). Sluttproteinkonsentrasjonen var 2,5 mg/ml med 20% DMA i buffer. Konjugasjonen ble rotert ved romtemperatur over natten og deretter klartgjort ved sedimentering (13,200 RPM i 4 minutter). Supernatanten ble deretter renset på en Sephadex G25 gelfiltreringskolonne likevektsinnstilt i et fosfatbuffer saltvann (PBS)-buffer ved pH 6,5. Det resende konjugatet ble dialysert over i PBS, pH 6,5-buffer (~1:650 fortynning) med fire bufferutbyttinger. Konjugatet ble klargjort gjennom et 0,22 µm sprøytefilter og undersøkt spektrofotometrisk (ε_{280} = 7743 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{318} = 9137 $M^{-1}cm^{-1}$ for PBD og ε_{280} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$ for antistoff). Et gjennomsnitt på 1,76 PDB-molekyler (forbindelse i eksempel 16) per molekyl antistoff ble bundet.

huB4-SMCC – Forbindelse i eksempel 16

Eksempel 2:

Anti-B4-antistoff som binder til CD19-antigenet foretrukket uttrykt på overflaten til humane lymfomceller velges for konjugering av tomaymycinderivater.

I det første trinnet blir antistoffet omsatt med det modifiserte middelet suksinimidyl-4-[N-maleimidometyl]sykloheksan-1-karboksylat (SMCC) for å introdusere maleimidgrupper. En løsning av huB4-antistoffet ved en konsentrasjon på 6 mg/ml i en vandig buffer som inneholder 0,05 M kaliumfosfat, 0,05 M natriumklorid og 2 mM etylendiamintetraeddiksyre (EDTA), pH 6,7 (1 ml) behandles med et 6,5-gangers molart overskudd av en løsning av SMCC i dimetylacetamid (DMA). Reaksjonsblandingen røres ved romtemperatur i 90 minutter og tilsettes deretter til en Sephadex G25 gelfiltreringskolonne (NAP10) som på forhånd har blitt likevektsinnstilt i en vandig buffer som inneholder 0,10 M N-(2-hydroksyetyl)-piperazin-N'-2-etansulfonsyre (HEPES), pH 8,0. De modifiserte antistoffinneholdende fraksjonene samles opp og bringes sammen som gir et produkt. En liten alikvot av det modifiserte antistoffet behandles med β-merkaptoetanol i 10 minutter fulgt av tilsetting av 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzosyre (DTNB) for å undersøke gjenværende tiol ($\varepsilon_{280\,nm}$ = 14,150 $M^{-1}cm^{-1}$ for 5-tio-2-nitrobenzosyre (TNB) og $\varepsilon_{280\,nm}$ = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$ for antistoffet). Mengden av tiol konsumert i reaksjonen med maleimid på antistoffet (sammenlignet med kontroll uten antistoff) er likt med antall mol maleimid bundet til antistoffet (substraktiv Ellmans undersøkelse). Tilnærmet 3,2 reaktive maleimidgrupper per antistoff ble bundet.

Det modifiserte antistoffet (3 mg, 0,021 μmol) fortynnet til 3,0 mg/ml i HEPES-buffer ved pH 8,0 og behandlet deretter med en løsning av forbindelsen i eksempel 16 i DMA (5 nM), slik at sluttkonsentrasjuonen av DMA i bufferen er 15%. Tre molare ekvivalenter av 8,8'-[5-(N-4-merkapto-4,4-dimetylbutanoyl)amino-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (forbindelse i eksempel 16) ble tilsatt per bindingsgruppe (9,6 ekv. Per antistoff, 0,202 μmol, 149 μg). Konjugasjonsblandingen røres ved romtemperatur i 20 timer. Reaksjonsblandingen renses ved passering gjennom en G25-kolonne (NAP 5) som på forhånd har blitt likeveltsinnstilt i 0,05 kaliumfosfat (KPi), 0,05 M NaCl, 0,002 M EDTA-buffer ved pH 6,7. Fraksjoner som inneholder huB4-forbindelse i eksempel 16-konjugat sammensatt og dialyseres over i KPi-buffer i 3 utbyttinger (24 timer). Det endelige konjugatet (2,2 mg, 2,3 mg/ml) undersøkes spektrofotometrisk ved anvendelse av ekstinksjonskoeffisientene som

bestemmes for forbindelse i eksempel 16 ($\varepsilon_{318\,nm}$ = 9,137 $M^{-1}cm^{-1}$, $\varepsilon_{280\,nm}$ = 7,743 $M^{-1}cm^{-1}$) og B4-antistoff ($\varepsilon_{280\,nm}$ = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$). Et gjennomsnitt på 2,8 PBD-molekyler (forbindelse i eksempel 16) per molekyl antistoff ble bundet.

huB4-SPDB – Forbindelse i eksempel 17

Eksempel A3:

Anti-B4-antistoff som binder til CD19-antigente foretrukket uttrykt på overflaten til humane lymfomceller velges for konjugering av tomaymycinderivater.

Antistoffet ble først modifisert med 4-(2-pyridylditio)butansyre-N-hydroksysuksinimidester (SPDB) for å introdusere pyridylditiogrupper. Et 4,5-ganger molart overskudd av SPDB (0,124 µmol, 40,6 µg) i DMA (25 µl) ble tilsatt til en løsning av huB4 (4 mg, 0,028 µmol) i vandig buffer som inneholder 50 mM kaliumfosfat, 50 mM natriumklorid og 2 mM EDTA, pH 6,5 (0,475 ml). Sluttproteinkonsentrasjonen var 8 mg/ml med 5% DMA i buffer. Modifikasjon ble gjort ved å rotere ved romtemperatur i 90 minutter og deretter fulgte rensing på en Sephadex G25 gelfiltreringskolonne likvektsinnstilt i en vandig buffer som inneholder 50 mM kaliumfosfat, 50 mM natriumklorid og 2 mM EDTA, pH 7,5. En liten alikvot av det modifiserte antistoffet ble behandlet med DTT for å spalte pyridyldisulfidgruppene. Det modifiserte antistoffet og frigjort pyridintiol ble undersøkt spektrofotometrisk (ε_{343} = 8,080 $M^{-1}cm^{-1}$ for det frigjorte pyridintiolet, ε_{280} = 51200 $M^{-1}cm^{-1}$ for de modifiserte pyridylditiogruppene og ε_{280} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$ for antistoff). Et gjennomsnitt på 3,31 pyridyldisulfidmolekyler per molekyl antistoff er bundet.

Det modifiserte antistoffet (3,06 mg, 0,021 µmol) ble fortynnet i den ovenfor angitte bufferen ved pH 7,5 (0,976 ml) og DMA (122 µl, 10% v/v) og deretter behandlet med en løsning av 8,8'-[5-(N-metyl-N-(2-merkapto-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-benzendiyl(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (forbindelse i eksempel 17) (0,209 µmol, 0,154 mg) i DMA (122 µl, 10% v/v). Sluttproteinkonsentrasjonen var 2,5 mg/ml med 20% DMA i buffer. Konjugasjonen ble rotert ved romtemperatur over natten og deretter klargjort ved sedimentering (13 200 RPM i 4 min). Supernatanten ble deretter renset på en Sephadex G25 gelfiltreringskolonne likevektsinnstilt i en PBS-buffer ved pH 6,5. Det rensede konjugatet ble dialysert over i PBS pH 6,5-buffer (~1:1200 fortynning) med tre bufferutbyttinger. Konjugatet ble klargjort gjennom et 0,22 µm sprøytefilter og

undersøkt spektrofotometrisk (ε_{280} = 10736 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{318} = 12053 $M^{-1}cm^{-1}$ for PBD, og ε_{280} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$ for antistoff). Et gjennomsnitt på 3,05 PBD-molekyler (forbindelse i eksempel 17) per molekyl antistoff ble bundet.

huB4-SMCC – Forbindelse i eksempel 17

Eksempel A4:

Anti-B4-antistoff som binder til CD19-antigenet foretrukket uttrykt på overflaten til humane lymfomceller velges for konjugering av tomaymycinderivater.

I det første trinnet blir antistoffet omsatt med det modifiserte middelet suksinimidyl-4-[N-maleimidometyl]sykloheksan-1-karboksylat (SMCC) for å introdusere maleimidgrupper. En løsning av huB4-antistoff ved en konsentrasjon på 6 mg/ml i en vandig buffer som inneholder 0,05 M kaliumfosfat, 0,05 M natriumklorid og 2 mM etylendiamintetraeddiksyre (EDTA), pH 6,7 (1 ml) ble behandlet med et 7-ganger molart overskudd av en løsning av SMCC i dimetylacetamid (DMA). Reaksjonsblandingen røres ved romtemperatur i 90 min. og tilsettes deretter til en Sephadex G25 gelfiltreringskolonne (NAP10) som på forhånd har blitt likevektsinnstilt i en vandig buffer som inneholder 0,10 M N-(2-hydroksyetyl)-piperazin-N'-2-etansulfonsyre (HEPES), pH 8,0. De modifiserte antistoffinneholdende fraksjonene samles opp og settes sammen for å gi produkt. En liten alikvot av det modifiserte antistoffet behandlet med β-merkaptoetanol i 10 min fulgt av tilsetting av 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzosyre (DTNB) for å undersøke gjenværende tiol (ε_{412nm} = 14,150 $M^{-1}cm^{-1}$ for 5-tio-2-nitrobenzosyre (TNB) og ε_{280nm} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$ for antistoffet). Mengden av tiol kosumert i reaksjonen med maleimid på antistoffet (sammenlignet med en kontroll uten antistoff) er lik med mol maleimid bundet til antistoffet (substraktiv Ellmans undersøkelse). Ca. 3,7 reaktive maleimidgrupper per antistoff ble bundet.

Det modifiserte antistoffet (4,4 mg, 0,03 µmol) fortynnet til 8,7 mg/ml i HEPES-buffer ved pH 8,0 og behandlet deretter med en løsning av forbindelse i eksempel 17 i DMA (5,4 mM) slik at sluttkonsentrasjonen av DMA i buffer er 20%. To molare ekvivalenter av 8,8'-[5-(N-metyl-N-(2-merkapto-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-benzendiyl(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (forbindelse i eksempel 17), ble tilsatt per bindingsgruppe (7,4 ekv. per antistoff, 0,222 µmol, 164 µg). Konjugasjonsblandingen røres ved romtemperatur i 20 timer. Reaksjonsblandingen renses ved passering gjennom en G25-kolonne (NAP 5) som på forhånd har blitt likevektsinnstilt i 0,05

kaliumfosfat (KPi), 0,05 M NaCl, 0,002 M EDTA-buffer ved pH 6,7. Fraksjoner som inneholder huB4-forbindelsen i eksempel 17-konjugat samles opp og dialyseres inn i KPi-buffer i 3 utbyttinger (24 timer). Sluttkonjugatet (2,25 mg, 2,25 mg/ml) undersøkes spektrofotometrisk ved anvendelse av ekstinksjonskoeffisitenter som bestemmes for forbindelse i eksempel 17 (ε_{318nm} = 12,053 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{280nm} = 10,736 $M^{-1}cm^{-1}$) og B4-antistoff (ε_{280nm} = 222,960 $M^{-1}cm^{-1}$). Et gjennomsnitt på 2,8 PBD-molekyler (forbindelse i eksempel 17) per molekyl antistoff ble bundet.

huMy9-6-SPBD – Forbindelse i eksempel 16

Eksempel A5:

Antistoffet ble først modifisert med 4-(2-pyridylditio)butansyre-N-hydroksysuksinimidester (SPDB) for å introdusere pyridylditiogrupper. Et 4,5-ganger molart overskudd SPDB (0,246 µmol,80,1 µg) i DMS (50 µl) ble tilsatt til en løsning av huMy9-6 (8 mg, 0,055 µmol) i vandig buffer som inneholder 50 mM kaliumfosfat, 50 mM natriumklorid og 2 mM EDTA, pH 6,5 (0,950 ml). Sluttproteinkonsentrasjonen var 8 mg/ml med 5% DMA i buffer. Modifikasjonen ble gjort ved å rotere ved romtemperatur i 90 minutter og deretter rense på en Sephadex G25 gelfiltreringskolonne likevektsinnstilt i en vandig buffer som inneholder 50 mM kaliumfosfat, 50 mM natriumklorid og 2 mM EDTA, pH 8,5. En liten alikvot av det modifiserte antistoffet ble behandlet med DTT for å spalte pyridyldisulfidgruppene. Det modifiserte antistoffet og frigjort pyridintiol ble undersøkt spektrofotometrisk (ε_{343} = 8,080 $M^{-1}cm^{-1}$ for frigitt pyridintiol, ε_{280} = 5100 $M^{-1}cm^{-1}$ for de modifiserte pyridylditiogrupper og ε_{280} = 206,460 $M^{-1}cm^{-1}$ for antistoff). Et gjennomsnitt på 3,32 pyridyldisulfidmolekyler per molekyl antistoff ble bundet.

Det modifiserte antsitoffet (3,05 mg, 0,0208 µmol) ble fortynnet i bufferene ovenfor ved pH 8,5 (976 µl) og DMA (122 µl, 10% v/v) og deretter behandlet med en løsning av 8,8'-[5-(N-4-merkapto-4,4-dimetylbutanoyl)amino-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[7-metoksy-2-metylen-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on] (forbindelse i eksempel 16) (0,207 µmol, 0,158 mg) i DMA (122 µl, 10% v/v). Sluttproteinkonsentrasjonen var 2,5 mg/ml med 20% DMA i buffer. Konjugasjonen ble gjort ved rotering ved romtemperatur over natten og deretter klargjøring med sedimentering (13 200 RPM i 4 min). Supernatanten ble deretter renset på en Sephadex G25 gelfiltreringskolonne likevektsinnstilt i en PBS-buffer ved pH 6,5. Det rensede konjugatet ble dialysert over PBS pH 6,5-buffer (~1:600 fortynning) med tre bufferutbyttinger. Konjugatet ble klargjort gjennom et 0,22 µm sprøytefilter og

undersøkt spektrofotometrisk (ε_{280} = 7743 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{318} = 9137 $M^{-1}cm^{-1}$ for PBD og ε_{280} = 206,460 $M^{-1}cm^{-1}$ for antistoff). Et gjennomsnitt på 2,58 PBD-molekyler (forbindelse i eksempel 16) per molekyl antistoff ble bundet.

Eksempel B: Bindingsundersøkelse

De relative bindingsaffinitetene til anti-B4-antistoffet og dets tomaymycinkonjugat på antigenuttrykkende Ramos-celler bestemmes ved anvendelse av en fluorescensbasert undersøkelse. Antistoff-tomaymycinkonjugatet og nakent antistoff ved utgangskonsentrasjoner på 1 x 10^{-7} M tilsettes til 96-brønns rundbunnede plater og titreres ved anvendelse av 3-ganger seriefortynninger slik at det blir duplikater for hver konsentrasjon. Ramos-celler tilsettes ved 50 000 celler per brønn til hver brønn som inneholder forskjellige konsentrasjoner av antistoffet eller konjugatet, så vel som kontrollbrønner. Platene innkuberes på is i 3 timer. Etter innkuberingsperioden blir cellene i platen vasket og et fluorescensmerket sekundært antistoff som binder til humanisert IgG, som anti-B4, blir tilsatt og platene innkuberes i 1 time på is. Platene vaskes igjen etter innkuberingsperioden og cellene fikseres med 1% formaldehyd/PBS-løsning. Fluorescensen i hver brønn til platene avleses ved anvendelse av en Becton Dickinson FACSCalibur fluorescensanalysator. Data plottes som en prosent av maksimum fluorescens oppnådd ved høyeste konsentrasjon av antistoff eller konjugat.

Eksempel C:

In vitro-potensiale og spesifisitet til tomaymycinderivat eller tomaymycinderivatkonjugater. Generell protokoll som anvendes:

Prøver av fritt tomaymycinderivat eller tomaymycinderivatkonjugat tilsettes til 96-brønns flatbunnede vevsdyrkningsplater og titreres ved anvendelse av seriefortynninger varierende fra 1 x 10^{-12} M til 3 x 10^{-7} M. Antigenpositive tumorceller eller antigennegative tumorceller tilsettes til brønnene på en slik måte at det er triplikate prøver for hver legemiddelkonsentrasjon for hver cellelinje. Platene innkuberes ved 37°C i en atmosfære på 5% CO_2 i 4 dager.

Ved slutten av innkuberingsperoiden blir 20 µl av tetrazoliumreagenset WST-8 (2-(2-metoksynitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2-tetrazolium, natriumsalt) tilsattes til hver brønn og platene returneres til inkubator i 2 timer. Absorbansen i hver brønn til platene blir deretter målt ved anvendelse av en Molecular Devices plateavleser ved 450 nm. Overlevende fraksjon av celler ved hver konsentrasjon av tomaymycinderivat eller konjugat plottes.

Forbindelser	A549 (IC_{50})	KB (IC_{50})	MCF7 (IC_{50})
Eksempel 5	$7x10^{-11}$M	$1x10^{-10}$M	$1x10^{-10}$M
Eksempel 1	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M
Eksempel 2	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M	$<10^{-12}$ M

Den spesifikke cytotoksisiteten til forbindelsene vs. konjugatene ifølge oppfinnelsen ovenfor MOLT-4 og BJAB eller HL60/GC og Ramos-cellelinjer ble testet. Resultatene er illustrert i figurene 1a-c, 2a-c og 3a-b.

Figur 1a angir in vitro-potensialet til huB4-SPDB – forbindelse i eksempel 16 ovenfor antigenpositive BJAB-celler og antigennegative MOLT-4-celler.

Figur 1b angir in vitro-potensialet til huB4-SMCC – forbindelse i eksempel 16 ovenfor antigenpositive BJAB-celler og antigennegative MOLT-4-celler.

Figur 1c angir in vitro-potensialet til fri forbindelse i eksempel 16 ovenfor BJAB-celler og MOLT-4-celler.

Figur 2a angir in vitro-potensialet til huB4-SPDB – forbindelse i eksempel 17 ovenfor antigenpositive BJAB-celler og antigennegative MOLT-4-celler.

Figur 2b angir in vitro-potensialet til huB4-SMCC – forbindelse i eksempel 17 ovenfor antigenpositive BJAB-celler og antigennegative MOLT-4-celler.

Figur 2c angir in vitro-potensialet til fri forbindelse i eksempel 18 ovenfor BJAB- og MOLT-4-celler.

Figur 3a angir in vitro-potensialet til huMy9-6-SPDB – forbindelse i eksempel 16 ovenfor antigenpositive HL60/GC-celler og antigennegative Ramos-celler.

Figur 3b angir in vitro-potensialet til fri forbindelse i eksempel 16 ovenfor HL60/GC- og Ramos-celler.

Eksempel D:

In vitro-effektivitet til tomaymycinderivat eller tomaymycinderivatkonjugater.

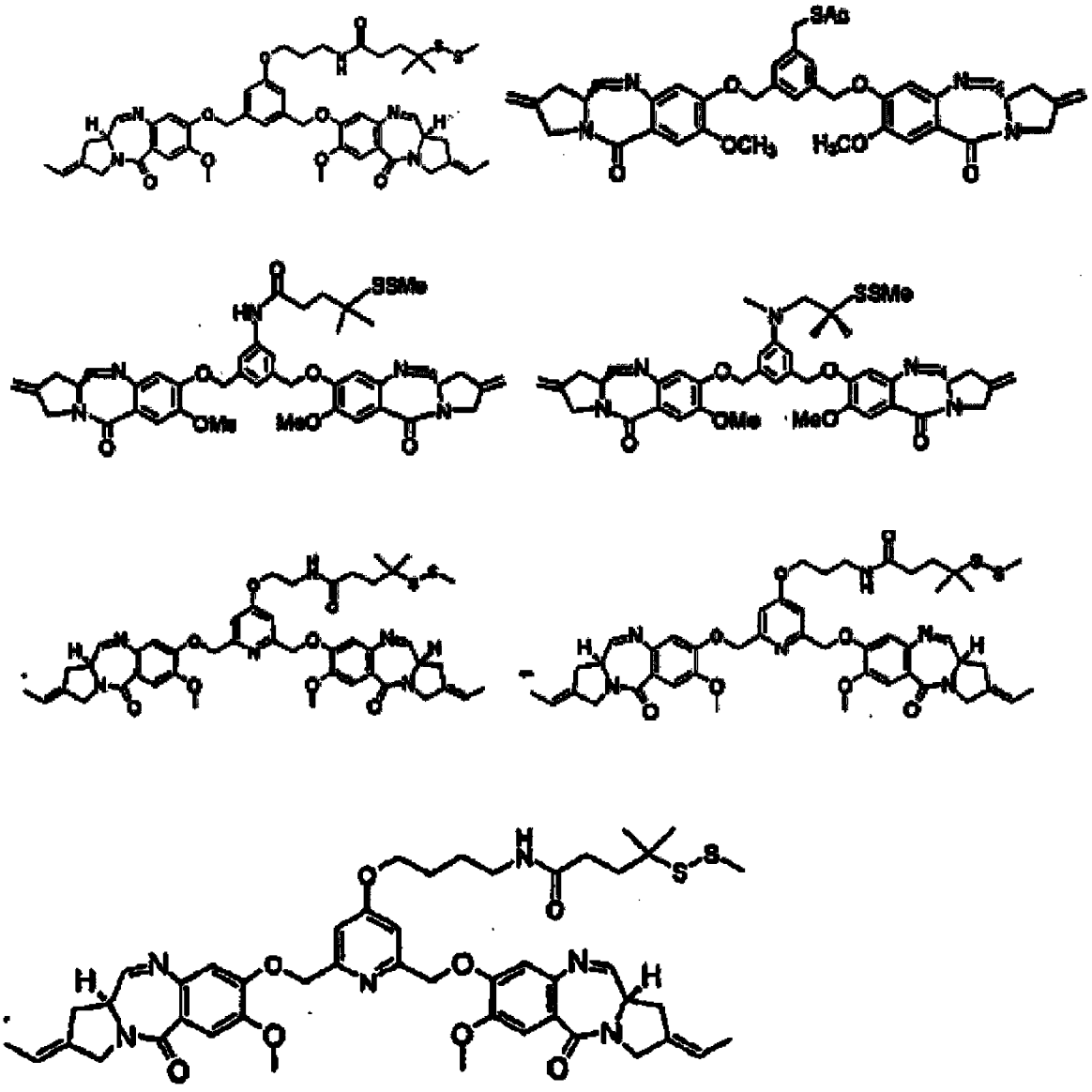
Testene kan utføres ved anvendelse og/eller tilpassing av protokollen beskrevet i WO 2004/103272, med huB4 som antistoffet og passende antigenpositive cellelinjer, slik som Ramos og Rajii Burkitts lymfomcellelinjer.

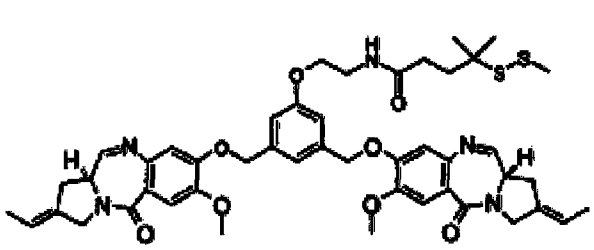
5

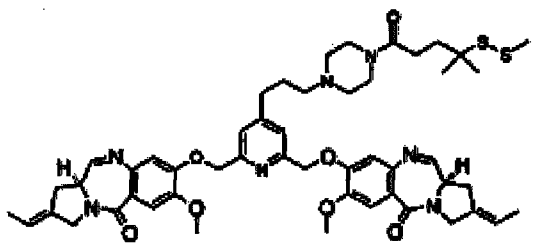
P a t e n t k r a v

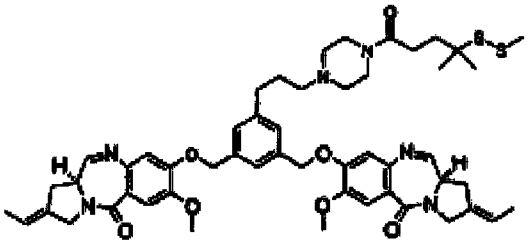
1.

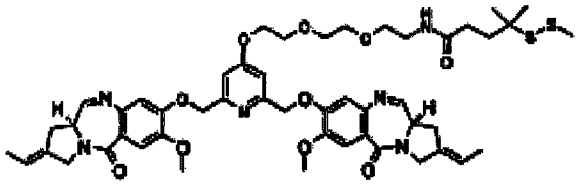
Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er valgt fra følgende liste:

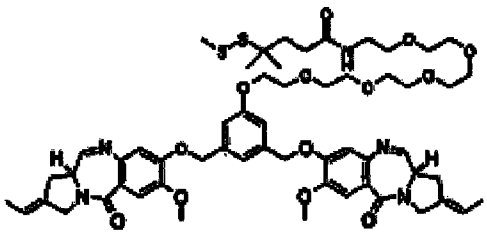


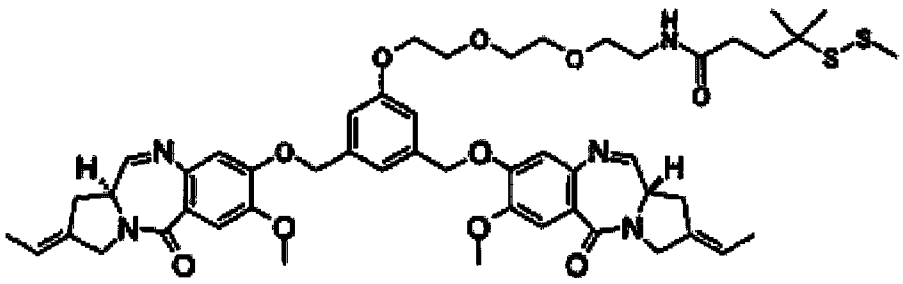


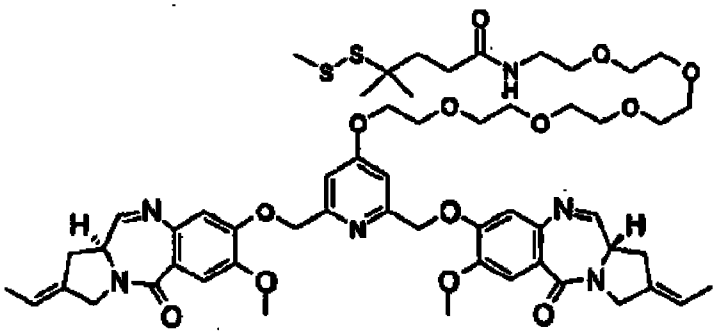


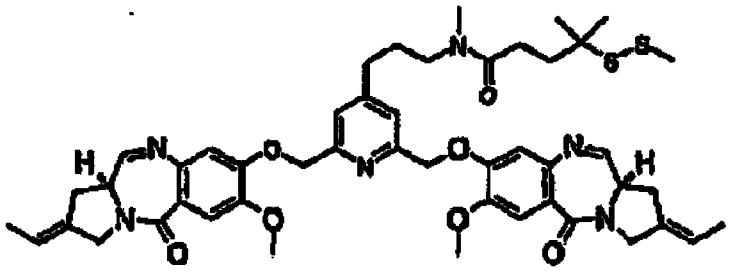


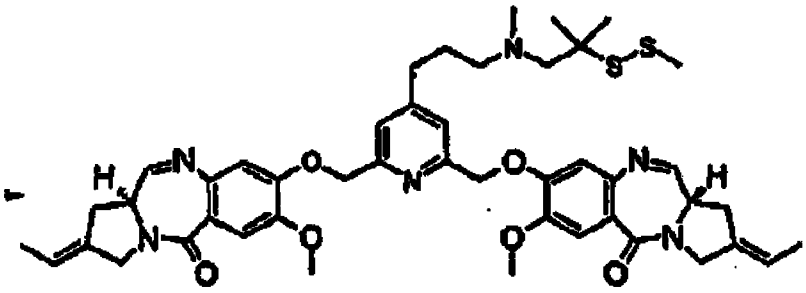


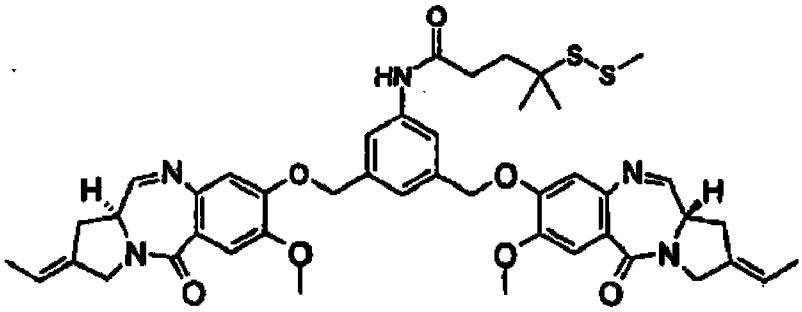












så vel som de korresponderende mercaptoderivatene,
eller deres farmasøytisk akseptable salter, hydrater eller hydratiserte salter, eller de polymorfe, krystallinske strukturene til disse forbindelsene eller deres optiske isomerer, racemater, diastereomerer eller enantiomerer.

2.
Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er valgt fra følgende liste:

8,8'-[4-(3-tert-butoksykarbonylaminopropyloksy)-2,6-pyridindiylbis-(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[5-(3-aminopropyloksy)-1,3-benzendiylbis(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on],

8,8'-[5-(N-metyl-3-tert-butoksykarbonylaminopropyl)-1,3-benzendiylbis-(metylenoksy)]-bis[(S)-2-et-(E)-yliden-7-metoksy-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on].

3.

Konjugat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det innbefatter én eller flere forbindelser ifølge krav 1 eller 2 kovalent bundet til et cellebindende middel gjennom bindingsgruppen til den(de) bindende gruppen(e).

4.

Konjugat ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte bindingsgruppe er en tiol-, sulfid- eller disulfidgruppe.

5.

Konjugat ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte bindingsgruppe er -S- eller -S-S-.

6.

Konjugat ifølge kravene 3 til 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte cellebindende middel er modifisert med et modifiserende middel for å forbedre reaktiviteten til det cellebindende middelet mot bindingsgruppen til den bindende gruppen.

7.

Konjugat ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte modifiserende middel er N-sulfosuksinimidyl-4-(5-nitro-2-pyridylditio)butanoat (SSNPB), suksinimidyl-4-[N-maleimidometyl]sykloheksan-1-karboksylat (SMCC) eller 4-(2-pyridylditio)butansyre-N-hydroksysuksinimidester (SPDB).

8.

Konjugat ifølge kravene 3 til 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte cellebindende middel er valgt fra antistoffer eller et fragment av et antistoff som inneholder minst et bindingssete, lymfokiner, hormoner, vekstfaktorer, næringstransportmolekyler eller et hvilket som helst annet cellebindende molekyl eller substans.

9.

Konjugat ifølge kravene 3 til 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte cellebindende middel er valgt fra monoklonale antistoffer; kimeriske antistoffer; humaniserte antistoffer; fulle humane antistoffer; enkeltkjede antistoffer; fragmenter av antistoffer slik som Fab, Fab', $F(ab')_2$ og F_v, interferoner; peptider; lymfokiner slik som IL-2, IL-3, IL-4, IL-6; hormoner slik som insulin, THR (tyrotropinfrigivende hormoner), MSH (melanocytstimulerende hormon), steroidhormoner slik som androgener og østrogener; vekstfaktorer og kolonistimulerende faktorer slik som EGF, TGFα, insulinlignende vekstfaktor (IGF-I, IGF-II), G-CSF, M-CSF og GM-CSF; vitaminer slik som folat og transferrin.

10.

Fremgangsmåte for fremstilling av et konjugat ifølge et hvilket som helst av kravene 3 til 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at den innbefatter trinnet hvor en forbindelse med formel som definert i krav 1 som innbefatter et et sulfid, disulfid eller tiolgruppe, eller en forløper derav, omsettes med et cellebindende middel som innbefatter en funksjon reaktiv ovenfor disulfid eller tiol slik at forbindelsen og det cellebindende middelet bindes sammen via en sulfid- eller disulfidbinding.

11.

Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den innbefatter et konjugatmolekyl som definert i et hvilket som helst av kravene 3 til 9, eller en forbindelse som definert i et hvilket som helst av krav 1 eller 2, sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer.

12.

Anvendelse av en effektiv mengde av et konjugatmolekyl som definert i et hvilket som helst av kravene 3 til 9, eller en forbindelse som definert i et hvilket som helst av krav 1 eller 2, for fremstilling av et medikament for avlivning eller inhibering av vekst av celler som innbefatter å kontakte målcellene eller vevet som inneholder målcellene.

13.

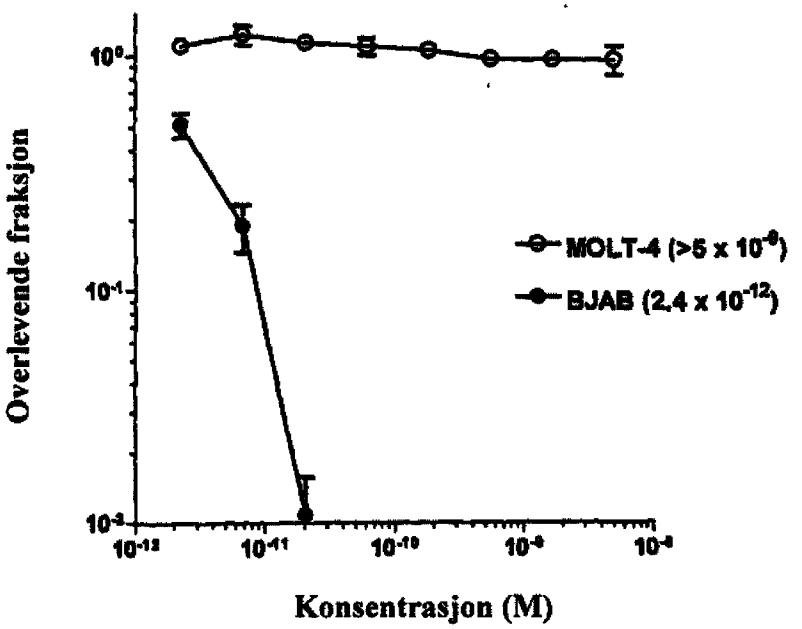
Anvendelse av en effektiv mengde av et konjugatmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 3 til 9, eller en forbindelse som definert i et hvilket som helst av krav 1 eller 2 for fremstilling av et medikament for behandling av kreft.

14.

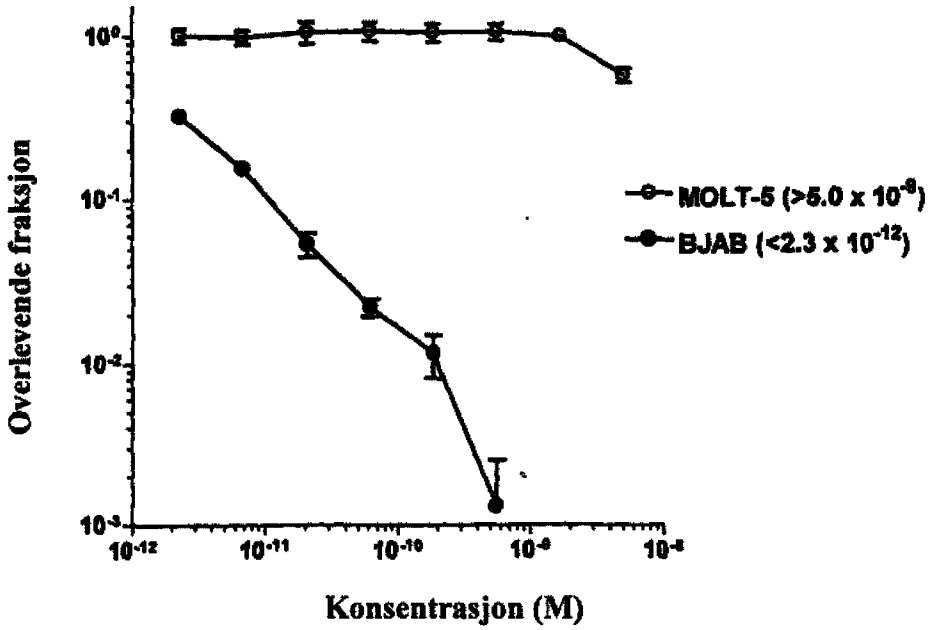
Konjugatmolekyl for anvendelse som definert i et hvilket som helst av kravene 3 til 9 for anvendelse som et middel mot kreft.

15.

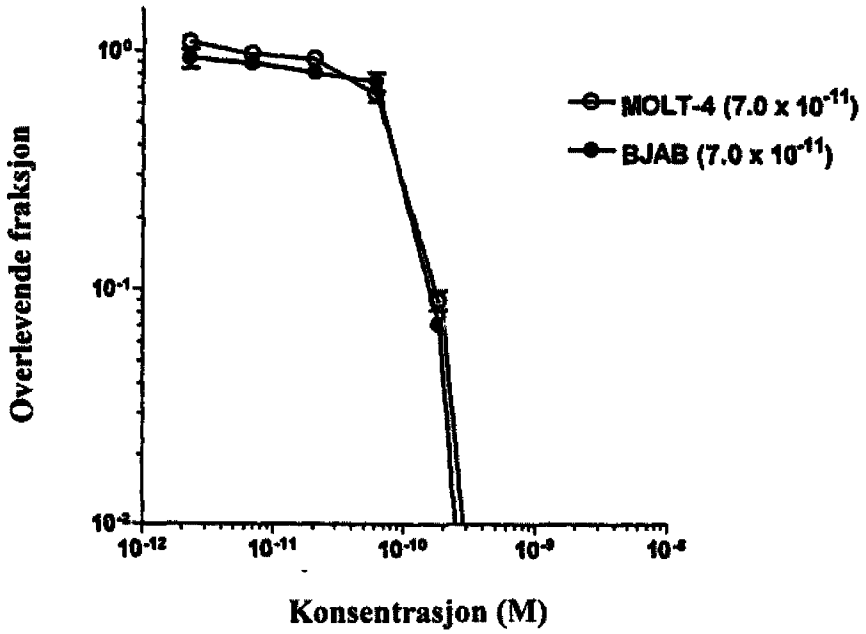
Forbindelse som definert i et hvilket som helst av krav 1 eller 2 for anvendelse som et middel mot kreft.



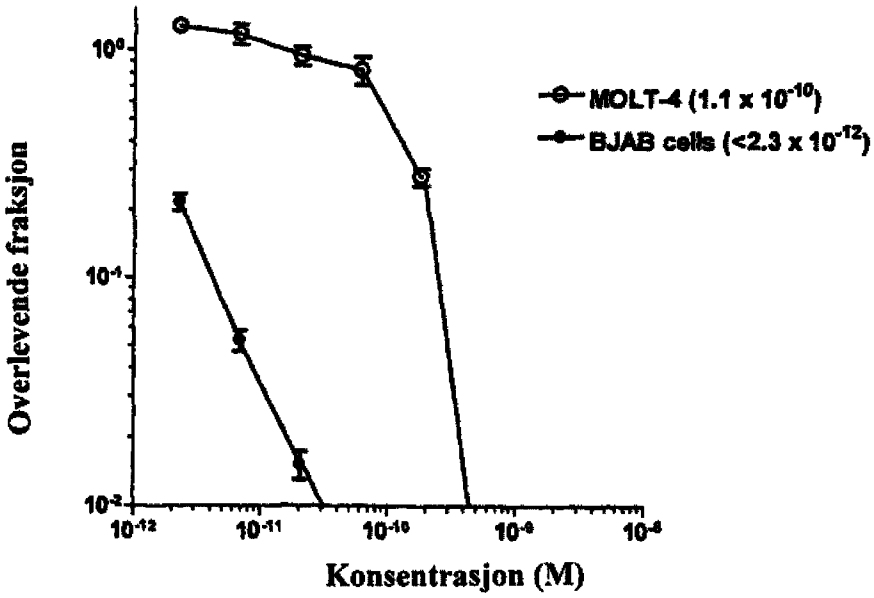
Figur 1a



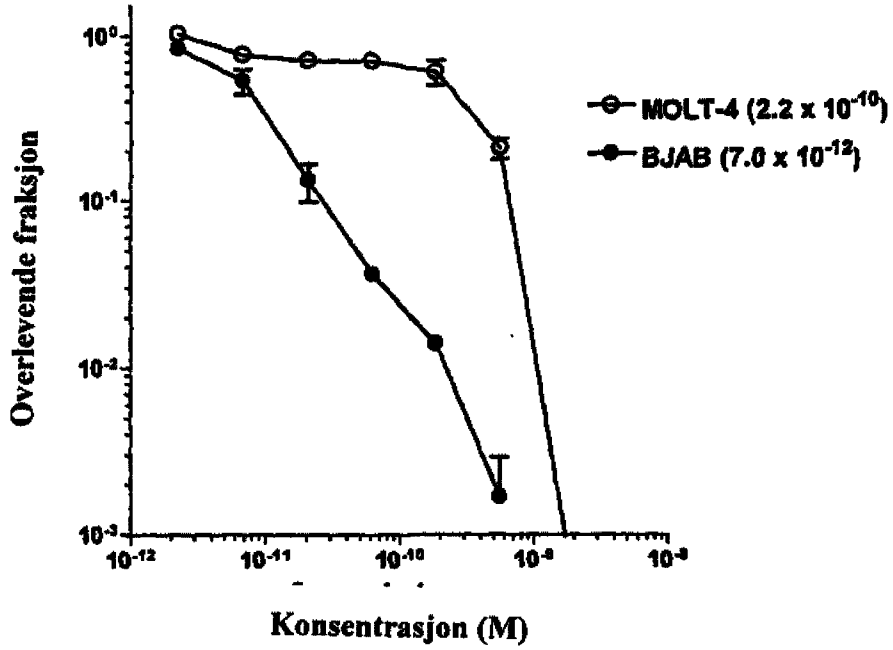
Figur 1b



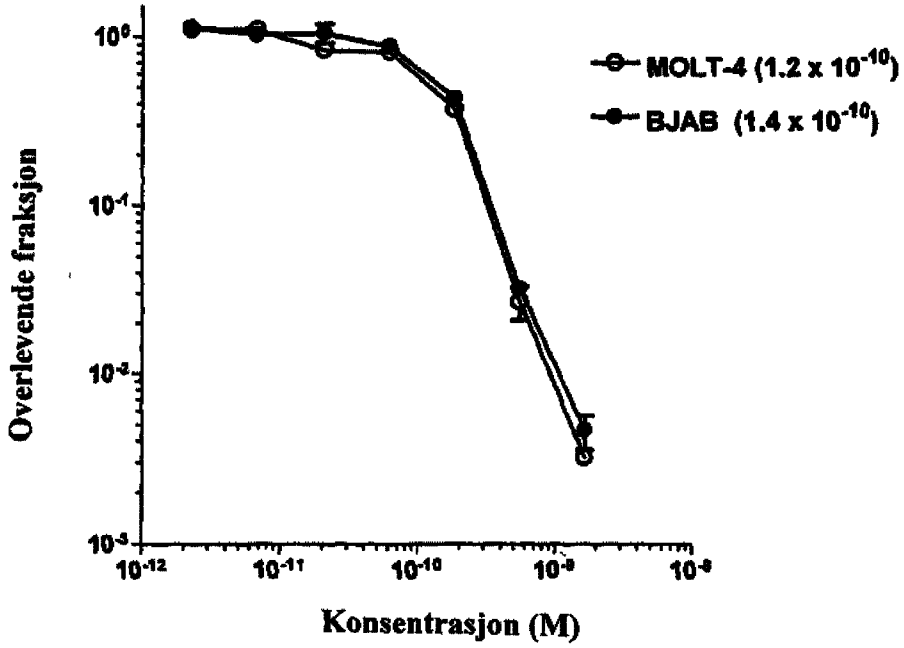
Figur 1c



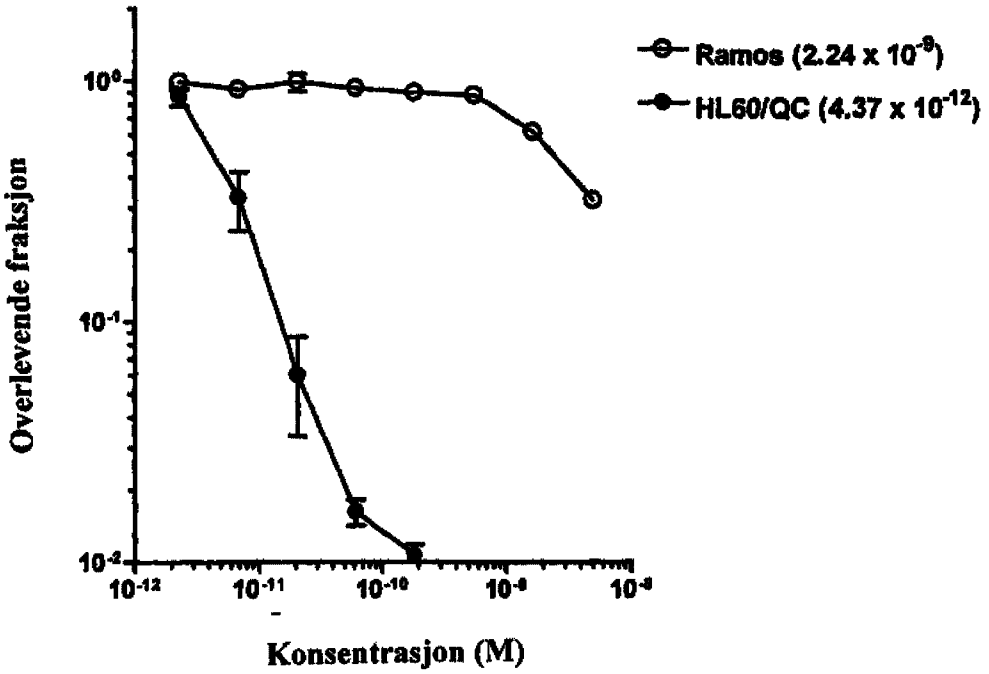
Figur 2a



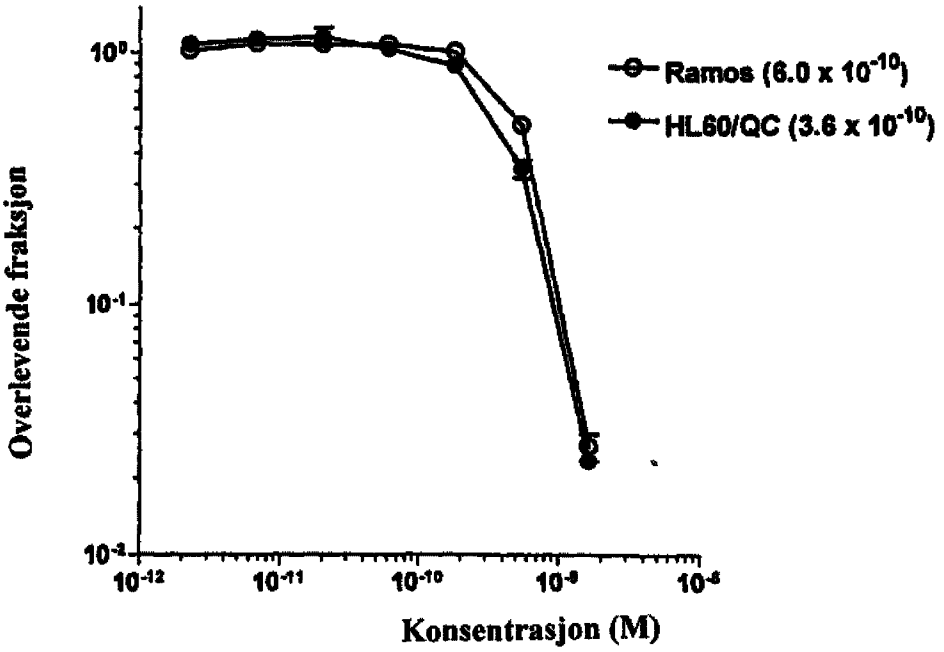
Figur 2b



Figur 2c



Figur 3a



Figur 3b