

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS

Cra. 7a # 74 – 64 Oficina 506
Tel: (571) 3132408 – 3132423 - 3132410 - 3131759
Fax: (571) 3131647 - 3132367
E-mail: mail@rubiolawyers.com
Apartado Aéreo 21848
Bogota, D.C. -Colombia

Doctor

José Luis SALAZAR LOPEZ

Jefe División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-112351- -00017-0000

Fecha: 2012-01-20 13:53:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 100

REF: Expediente No. 05-112.351

Patente de Invención: "AGENTES CITOTOXICOS MEJORADOS
QUE COMPRENDEN NUEVOS
MAITANSINOIDES"

Fase Nacional: PCT/US2004/013314

Clasificación Int.: A 61 K 47/48

Titular: IMMUNOGEN, INC.

RESPUESTA A REQUERIMIENTO

OFICIO NO.17068 Y CONCEPTO TECNICO No.2534, NOTIFICADO POR FIJACION EN LISTA DE 28 DE OCTUBRE DE 2011

HUMBERTO RUBIO CAMACHO, mayor de edad, domiciliado en Bogotá, D.C., identificado con la cédula de ciudadanía número 17'192.062 de Bogotá, abogado graduado portador de la Tarjeta Profesional No. 50.007 expedida por el Consejo Superior de la Judicatura, actuando en carácter de Apoderado de IMMUNOGEN, INC, domiciliado en 830 Winter Street, Waltham, Massachusetts 02451, Estados Unidos de America; encontrándome dentro de la debida oportunidad procesal para dar respuesta al auto proferido por su Despacho, mediante Oficio No.17068 y Concepto Técnico No.2534, notificado por fijación en lista de 28 de octubre de 2011, me permito:

I. Manifestar:

1. Enmiendas al capítulo reivindicatorio y descriptivo De las reivindicaciones

Teniendo en cuenta las objeciones realizadas en el segundo examen de patentabilidad y el que por medio del presente escrito se da respuesta, se presenta un nuevo capítulo de reivindicaciones.

Adicionalmente, nos permitimos indicarle al examinador que conforme lo establece el Artículo 36 de la Decisión 486, mediante Formulario de Solicitud de Divisional, que será radicado ante su Despacho por separado, se esta presentando

una solicitud divisional de la presente solicitud, sin que ella implique una ampliación de la solicitud inicial; por lo tanto solicitamos respetuosamente a ese Despacho tener en cuenta la divisional.

En cuanto a la modificación de las reivindicaciones, nos permitimos señalar que las mismas se refieran a los compuestos ejemplificados en la solicitud, es decir DM3 y DM4, que se citan en las reivindicaciones 33-36.

El examinador ha sugerido eliminar la reivindicación 97 porque se refiere a Métodos de Tratamiento, teniendo en cuenta esta observación se ha eliminado esta reivindicación.

Teniendo en cuenta las modificaciones realizadas y la solicitud divisional, consideramos que se han subsanados todos y cada uno de las objeciones expuestas por el examinador, por tanto creemos que el nuevo capítulo reivindicatorio contiene materia nueva susceptible de considerarse con suficiente nivel inventivo, conforme lo establece la Decisión 486.

2. Del Capítulo Descriptivo

Se presenta un nuevo capítulo descriptivo que contiene algunas modificaciones.

3. Unidad de Invención – Análisis de Patentabilidad

En el Parágrafo 7, el examinador indica que la única diferencia entre los compuestos reivindicados y los de D1-D3 radica en el tipo de significados que se hacen en el sustituyente Y. El examinador indica además que el efecto técnico de la diferencia no se puede determinar, ya que sólo se revela la actividad citotóxica.

El examinador afirma que los compuestos reivindicados son evidentes respecto a los del arte citado. El Examinador añade que no se demuestra un efecto mejorado o sorprendente en comparación con los compuestos en el arte que se da a conocer.

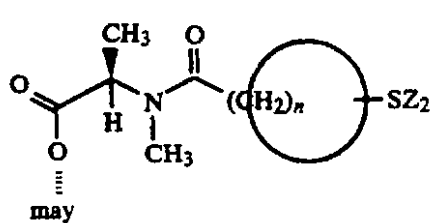
Al respecto nos permitimos comentar: la presente invención se basa en el hallazgo inesperado en que la unión de maitansinoides, *que cuentan con un grupo tiol restringido estéricamente (que posee uno o dos sustituyentes en el α -carbono que cuenta con la funcionalidad tiol)*, con agentes de enlace celular producen conjugados que han *mejorado enormemente* la anti- actividad tumoral in vivo en comparación con los conjugados preparados con los maitansinoides que se han descrito anteriormente, que no poseían un sustituyente en el átomo de α -carbono

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS
Expediente No. 05 112351
Pagina 3 de 6

que contara con el enlace disulfuro. Este es el efecto técnico de la diferencia entre los compuestos descritos y los reivindicados por la presente solicitud. Otro descubrimiento inesperado fue que la actividad biológica mejorada se obtiene cuando la restricción estérica es óptima en el lado maitansinoide del enlace de disulfuro en los conjugados (véase el párrafo 16, y los ejemplos 6-8, 10, 11, 13 y 14).

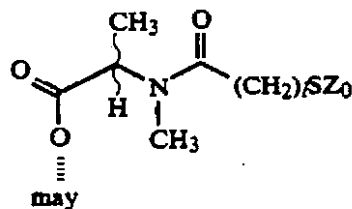
D2 (US 5208020) enseña *entre otras cosas* compuestos maitansinoide y agentes citotóxicos novedosos que comprenden uno o más compuestos maitansinoide unidos a un agente de unión celular. Los maitansinoides enseñados en ella están representados por las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI). Los maitansinoides representados por las fórmulas (I), (III), (IV), (V) y (VI), se muestran a continuación,



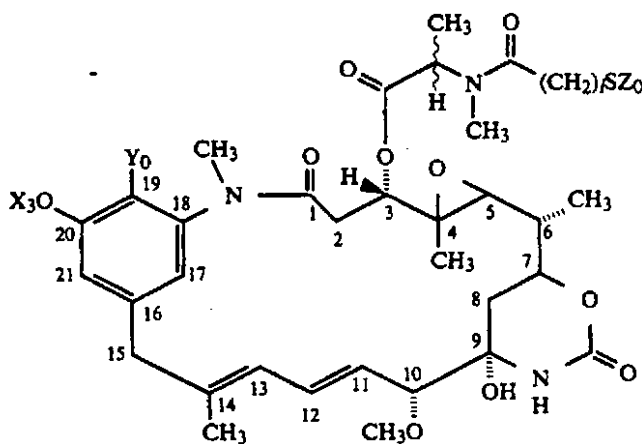
(l es un entero de 1 a 10)

(I);

(n es un entero de 3 a 8)

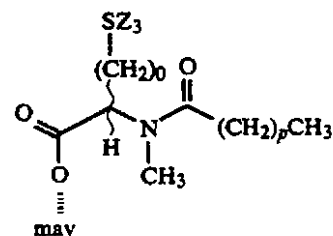


(III);



(l es 1, 2 o 3)

(IV);

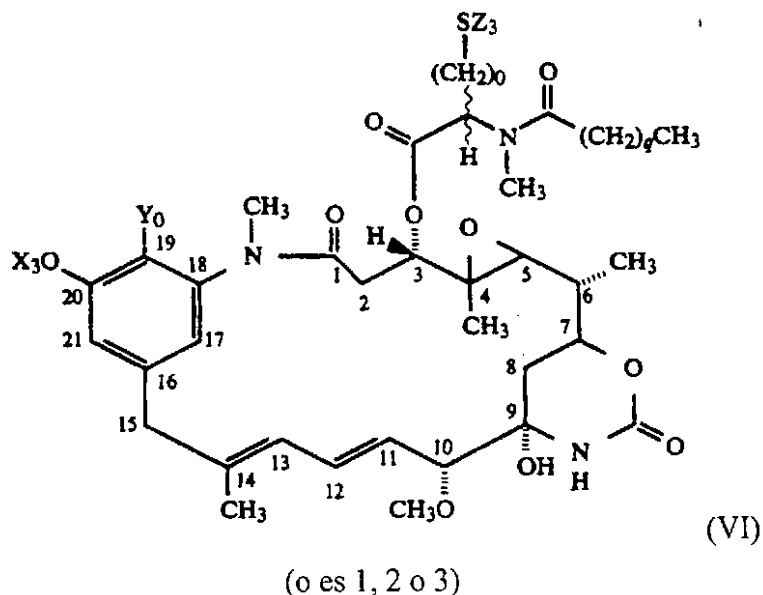


(o es 1, 2 o 3)

(V);

HUMBERTO RUBIO & CIA.

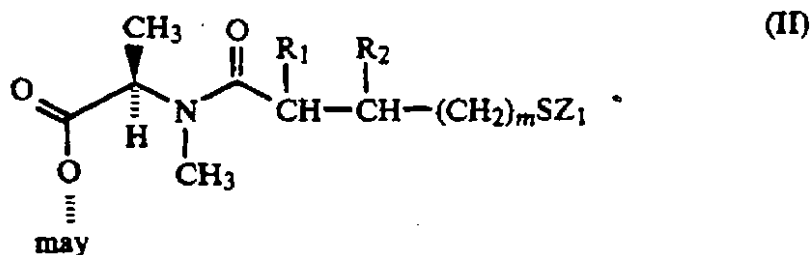
ABOGADOS
Expediente No. 05 112351
Pagina 4 de 6



tienen un grupo de **metileno** ($-\text{CH}_2-$) adyacente al grupo tiol o disulfuro (es decir, $-\text{SZ}_0$ en la fórmula (I), $-\text{SZ}_2$ en la fórmula (III), $-\text{SZ}_0$ en la fórmula (IV), $-\text{SZ}_3$ en la fórmula (V) y $-\text{SZ}$ en la fórmula (VI)). Dicho grupo tiol o disulfuro es considerado como "no restringido."

Por el contrario, como se ha mencionado anteriormente, los maitansinoides de la presente invención, según se establece en la Reivindicación 1 enmendada, son maitansinoides que contienen tiol o disulfuro restringido estéricamente, que tienen un grupo terminal $-\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$, en donde Z es H, o $-\text{SCH}_3$. El grupo $-\text{CR}_1\text{R}_2-$ introduce el impedimento estérica al grupo tiol $-\text{SZ}$, en donde R_1 es metileno y R_2 es H o metileno. Las definiciones de R_1 y R_2 **excluyen un grupo de metileno** ($-\text{CH}_2-$) del posible grupo $-\text{CR}_1\text{R}_2$ porque R_1 no puede ser H. Por lo tanto, los maitansinoides reivindicados por la presente solicitud tienen un abultado grupo alquileo $-\text{CR}_1\text{R}_2-$ (R_1 y R_2 no son H), **no un grupo de metileno**, junto al grupo tiol o disulfuro; mientras que los maitansinoides representados por las fórmulas (I), (III), (IV), (V) y (VI) de D1 (y D3) tienen un grupo de **metileno** adyacente al grupo tiol o disulfuro.

Los maitansinoides representados por la fórmula (II) de D2, se muestran a continuación



En esta fórmula, m es 0, 1, 2 o 3. Cuando m no es 0 o cuando m es 0 y R₂ es H, los maitansinoides tienen un grupo metileno adyacente al grupo -SZ₁, los cuales no son abarcados por los compuestos maitansinoides reivindicados por el solicitante, como se mencionó anteriormente. Cuando m es 0 and R₂ es CH₃ o CH₂CH₃, el maitansinoide cuenta con un sustituyente en el carbono que lleva el grupo tiol o disulfuro. Sin embargo, debido al átomo de azufre está en la posición β en relación con un grupo carbonilo, se determinó que estos maitansinoides y conjugados de dichos maitansinoides con agentes de enlace celular mediante un puente de disulfuro se encontró que eran inestables debido a su propensión a pasar β-eliminación (véase el Parágrafo [014] de la aplicación PCT como se presentó). Además, estos maitansinoides tienen una cadena de alquileo de **2 carbonos** (-CHR₁-CHR₂-) que conecta la mitad del acilo de N-metil-alanina con el grupo -SZ₁. Por el contrario, el maitansinoide reivindicado en la presente solicitud tiene un grupo -CH₂CH₂CR₁R₂ con cadena de alquileo de **tres carbonos** que conecta a la mitad de acilo de N-metil-alanina con el grupo-SZ.

Por otra parte, los compuestos descritos en los Ejemplos y figuras de D2 están comprendidos por las fórmulas (I), (III), (IV), (V) y (VI). Por lo tanto, ninguno de los compuestos descritos en los Ejemplos y las figuras tiene un grupo alquileo abultado (es decir, un grupo que no sea metileno) adyacente al grupo que contiene tiol o disulfuro como los compuestos maitansinoides reivindicados por la presente solicitud. Por lo tanto, los compuestos contenidos en el arte previo de D2 carecen del efecto técnico en la actividad antitumoral in vivo *altamente mejorado* que poseen los conjugados del agente de enlace celular que contiene los compuestos maitansinoide reivindicados actualmente.

D1 (US 6441163) enseña un nuevo método para hacer inmunoconjugados. D3 (WO 0124763) enseña la terapia de combinación de inmunoconjugados y agentes quimioterapéuticos. Los inmunoconjugados enseñados en D1 y D3 comprenden un agente de enlace celular y un agente terapéutico, tal como un maitansinoide. Los maitansinoides enseñados en D1 y D3 son maitansinoides que contienen tiol o disulfuro representados por las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), es decir, los mismos que se describen en D2. En consecuencia, los compuestos de estas referencias también carecen de los efectos técnicos de los compuestos de la presente invención.

Por lo tanto, los compuestos maitansinoides y el proceso para la preparación de compuestos maitansinoides reivindicados por la presente solicitud, son novedosos frente a los compuestos de D1, D2 y D3.

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS

Expediente No. 05 112351

Pagina 6 de 6

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto consideramos que la presente solicitud es novedosa tiene nivel inventivo, las nuevas reivindicaciones definen la materia que se desea proteger siendo claras, concisas y debidamente sustentadas en la descripción y no está comprendida en el estado de la técnica, conforme lo establece el Art. 14, 16 y 30 de la Decisión 486.

De manera atenta solicito a su Despacho, tener en cuenta cada una de las consideraciones expuestas anteriormente, al momento de estudiar el presente caso.

II.- ANEXO:

- (i) Capitulo descriptivo.
- (ii) Capitulo reivindicatorio.

III.- PETICIÓN:

Conforme a lo anterior, una vez atendidos los requerimientos y exigencias del examinador y al tener en cuenta el nuevo capítulo de reivindicaciones que se presenta, así como los argumentos expuesto, solicito muy respetuosamente a su Despacho, continuar el trámite de rigor y de ser el caso se hagan las correspondientes observaciones con al ánimo de hacer lo pertinente dentro del presente trámite, teniendo en cuenta que la presente solicitud cumple con las exigencias establecidas en la D486

Atentamente,



HUMBERTO RUBIO CAMACHO

C.C. 17'192.062 de Bogotá

**T.P. 50.007 Consejo Superior
de la Judicatura**

COD. 4134

AGENTES CITOTÓXICOS MEJORADOS QUE COMPRENDEN
NUEVOS MAITANSINOIDES

Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional No. 60/471,739,
5 presentada el 20 de mayo de 2003 la descripción de la cual está incorporada a la
presente mediante referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a un método para preparar conjugados citotóxicos
mejorados que comprenden maitansinoides y agentes de enlace celular. Esos conjugados
tienen uso terapéutico ya que son suministrados a una población celular específica de
una manera activada. La presente invención se refiere también a un método para la
preparación de maitansinoides que tiene una porción tiol, la cual puede ser utilizada en la
15 preparación de conjugados citotóxicos. La presente invención se refiere además a
maitansinoides novedosos, y a intermediarios novedosos en la síntesis de los
maitansinoides novedosos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Han aparecido muchos reportes sobre el direccionamiento específico intentado de
células tumorales con conjugados anti-fármaco monoclonales (Sela et al. en
Immunoconjugates 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al, en Targeted Drugs 1-22 (E.
Goldberg, ed. 1983); Diener et al, en Anticuerpo Mediated Delivery Systems 1-23 (J.
25 Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al, en Anticuerpo Mediated Delivery Systems 25-53 (J.
Rodwell, ed. 1988); Bumol et al, en Anticuerpo Mediated Delivery Systems 55-79 (J.
Rodwell, ed. 1988). Los fármacos citotóxicos tales como metotrexato, daunorubicina,
doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalan, mitomicina C, y clorambucil han sido
conjugados para una variedad de anticuerpos monoclonales de murina. En algunos

casos, las moléculas de fármacos fueron enlazada a las moléculas de anticuerpo a través de una molécula portadora intermedia tal como albúmina del suero (Garnett et al. *Cancer Res.* 46: 2407-2412 (1986); Ohkawa et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 23: 81-86 (1986); Endo et al. *Cancer Res.* 47: 1076-1080 (1980)), dextrano (Hurwitz et al. *Appl. Biochem.* 2: 25-35 (1980); Manabi et al. *Biochem. Pharmacol.* 34: 289-291 (1985); Dillman et al. *Cancer Res.* 46: 4886-4891 (1986); Shoval et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 8276-8280 (1988)), o ácido poliglutámico (Tsukada et al. *J. Natl. Canc. Inst.* 73: 721-729 (1984); Kato et al. *J. Med. Chem.* 27: 1602-1607 (1984); Tsukada et al. *Br. J. Cancer* 52: 111-116 (1985)).

Una amplia disposición de tecnologías de enlazador se ha empleado para la preparación de dichos inmunoconjugados, y se han investigado tanto enlazadores divisibles como no divisibles. En la mayoría de los casos, el potencial citotóxico completo de los fármacos podría ser observado solamente, si las moléculas del fármaco pudieran ser liberadas desde los conjugados en la forma no modificada en el sitio objetivo.

Uno de los enlazadores divisibles que se han empleado para la preparación de conjugados de anticuerpo es un enlazador lábil al ácido en base a ácido cis-aconítico que tiene la ventaja de que el ambiente ácido de diferentes compartimientos celulares tales como los endosomas encontradas durante la endocitosis mediada por receptor y los lisosomas. Shen y Ryser introdujeron este método para la preparación de conjugados de daunorubicina con portadores macromoleculares (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 1048-1054 (1981)). Yang y Reisfeld utilizaron la misma técnica para conjugar daunorubicina para un anticuerpo anti-melanoma (*J. Natl. Canc. Inst.* 80: 1154-1159 (1988)). Recientemente, Dillman et al. usaron también un enlazador lábil al ácido de una manera similar para preparar conjugados de daunorubicina con un anticuerpo de anti-célula T (*Cancer Res.* 48: 6097-6102 (1988)).

Un enfoque alternativo, explorado por Trouet et al. involucró enlazar la daunorubicina a un anticuerpo por medio de un brazo separador de péptido (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 626-629 (1982)). Esto se hizo bajo la premisa de que el fármaco libre podría ser liberado desde un conjugado por medio de la acción de peptidasas

lisosomales.

Sin embargo, las pruebas de citotoxicidad in vitro han revelado que los conjugados anticuerpo-fármaco rara vez logran la misma potencia citotóxica que los fármacos no conjugados libres. Esto sugiere que los mecanismos a través de los cuales las moléculas de fármaco son liberadas a partir de anticuerpos son muy ineficientes. En el área de las inmunotoxinas, se demostró que los conjugados formados por medio de puentes de disulfuro entre anticuerpos monoclonales y toxinas de proteína catalíticamente activa son más citotóxicos que los conjugados que contienen otros enlazadores, Véase, Lambert et al. J. Biol. Chem. 260: 12035-12041 (1985); Lambert et al. En Immunotoxins 175-209 (A. Frankel, ed. 1988); Ghetie et al. Cancer Res. 48: 2610-2617 (1988). Esto se atribuyó a la elevada concentración intracelular de glutatona que contribuye a la división eficiente del enlace de disulfuro entre una molécula de anticuerpo y una toxina. A pesar de esto, hay solamente unos cuantos ejemplos reportados del uso de puentes de disulfuro para la preparación de conjugados entre fármacos y macromoléculas. Shen et al. describen la conversión de metotrexato en un derivado de mercaptoetilamida seguido por conjugación con poli-D-lisina a través de un enlace de disulfuro (J. Biol. Chem. 260: 10905-10908 (1985)). Además, unos cuantos reportes describieron la preparación de conjugados del fármaco tóxico que contiene trisulfuro caliqueamicina con anticuerpos (Hinman et al, 53 Cancer Res. 3336-3342 (1993), Hamann et al., Bioconjugate Chem, 13, 40-46 (2002)., bioconjugado Chem. 13, 47-48 (2002).

Una razón para la falta de conjugados de anticuerpo-fármaco enlazados con disulfuro es la falta de disponibilidad de fármacos citotóxicos que tienen un átomo de azufre que contiene la porción que puede ser fácilmente utilizada para enlazar el fármaco a un anticuerpo por medio de un puente disulfuro. Además, la modificación química de los fármacos existentes es difícil disminuir su potencial citotóxico.

Los maitansinoides son fármacos altamente citotóxicos. La maitansina fue aislada primero por Kupchan et al, a partir de un arbusto de África del este *Maytenus serrata* y se demuestra que es 100 hasta 1000 veces más citotóxico que los agentes quimioterapéuticos de cáncer convencionales como metotrexato, daunorubicina y

vincristina (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 3,986,111). Subsecuentemente, se descubrió que algunos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,151,042). También se han reportado los ésteres C-3 sintéticos de maitansinol y análogos de maitansinol (Kupchan et al. J Med. Chem. 21:31-37 (1978); Higashide et al. Nature 270:721-722 (1977); Kwai et al. Chem Pharm. Bull. 32:3441-3451 (1984)). Ejemplos de análogos de maitansinol a partir de los cuales se han preparado ésteres C-3 incluyen maitansinol con modificaciones del anillo aromático (por ejemplo de cloro) o en C-9, C-14 (por ejemplo grupo metilo hidroxilatado), C-15, C-18, C-20 y C-4,5.

Los ésteres C-3 de presencia natural y sintéticos de maitansinol pueden ser clasificados en dos grupos:

(a) ésteres C-3 con ácidos carboxílicos simples (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,248,870; 4,265,814; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,317,821; 4,322,348; y 4,331,598), y

(b) ésteres C-3 con derivados de N-metil-L-alanina (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,137,230; 4,260,608; 5,208,020; y Chem. Pharm. Bull. 12:3441 (1984)).

Se encontró que los ésteres del grupo (b) son mucho más citotóxicos de que los ésteres del grupo (a).

La maitansina es un inhibidor mitótico. El tratamiento de células L1210 in vivo con maitansina ha reportado un resultado del 67% de las células que acumulan en mitosis. Se reportó que las células de control no tratadas mostraron un índice mitótico que varía entre 3-2 hasta 5.8% (Sieber et al. 43 Comparative Leucemia Research 1975, bibl. Haemat. 495-500 (1976)). Los experimentos con huevos de erizo de mar y huevos de almeja han sugerido que la maitansina inhibe la mitosis al interferir con la formación de microtúbulos a través de la inhibición de la polimerización de la proteína de microtúbulo, tubulina (Remillard et al. Science 189:1002-1005 (1975)).

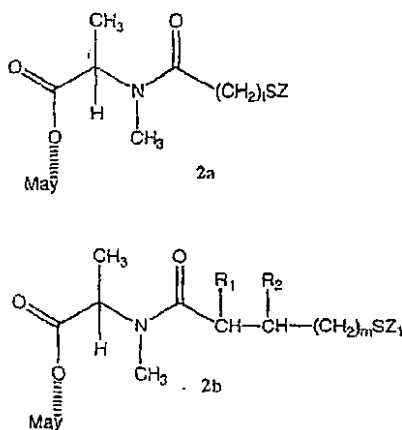
In vitro, se ha encontrado que las suspensiones de célula leucémica de murina

P388, L1210, y LY5178 para ser inhibidas por medio de maitansina en dosis de 10^{-3} hasta $10^{-1} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ con la línea P388 que es la más sensible. La maitansina ha demostrado también ser un inhibidor activo del crecimiento in vitro de células de carcinoma nasofaríngeas humanas, y la línea de leucemia linfoblástica aguda humana CEM fue reportada como inhibida mediante concentraciones tan bajas como de $10^{-7} \mu\text{g}/\text{ml}$ (Wolpert-DeFillippes et al. *Biochem. Pharmacol.* 24: 1735-1738 (1975)).

También se ha demostrado que la maitansina es activa in vivo. El crecimiento tumoral en el sistema de leucemia linfocítica P388 mostró que era inhibido sobre un rango de dosis de 50- hasta 100-veces, lo que sugirió un alto índice terapéutico, también podría demostrarse actividad inhibidora significativa con el sistema de leucemia de ratón L1210, el sistema de carcinoma pulmonar de Lewis humano y el sistema de melanocarcinoma B-16 humano (Kupchan, *Ped. Proc.* 33:2288-2295 (1974)). Los maitansinoides usados en conjugados con agentes de enlace celular se describen en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica 5,208, 020 y 5,416, 064 y en Chari et al., *Cancer Res.*, 52: 127-131 (1992) y Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 8618-8623 (1996). En esos conjugados, el agente de enlace celular es enlazado por medio de enlaces disulfuro al maitansinoide DM1[N²-deacetyl-N^{2'}-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maitansina, 1, Número CAS: 139504-50-0, FIG. 1].

En las patentes anteriores, los fármacos maitansinoides que tienen cadenas

laterales de N-metil-L-alanina acilata son de la fórmula 2a, b:



En la fórmula 2a, 1 representa un entero desde 1 hasta 10. por lo tanto los maitansinoides de la fórmula 2a tiene el átomo de azufre conectado a un grupo metileno no sustituido (-CH₂-S-). Se dice que un grupo sulfhidrilo en dicho compuesto maitansinoide o un grupo disulfuro en un conjugado de agente de enlace celular enlazado por disulfuro-
 5 maitansinoide con dicho maitansinoide que es "no-impedido" ya que no hay sustituyentes voluminosos en el alfa-carbono cercano al grupo sulfhidrilo o disulfuro, que ocasione impedimento estérico. En la fórmula 2b, m representa 0, 1, 2 o 3. por lo tanto, los maitansinoides de la fórmula 2b también tienen el átomo de azufre conectado a un grupo metileno no sustituido, excepto en el caso en donde m = 0, y R₂ = CH₃ o CH₂CH₃. Si m =
 10 0, entonces el maitansinoide tiene un sustituyente el átomo el carbono que tiene la funcionalidad tiol o una funcionalidad disulfuro después de la conjugación para un agente de enlace celular vía un enlace de disulfuro. Sin embargo, ya que en este caso el átomo de disulfuro está en la posición beta con respecto a un grupo carbonilo, se encontró que estos maitansinoides y conjugados de dichos maitansinoides con agentes de enlace
 15 celular vía un enlace de disulfuro son inestables debido a su propensión a experimentar eliminación-beta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el inesperado hallazgo de que el enlace de maitansinoides, que tienen un grupo tiol impedido estéricamente (que poseen uno o dos sustituyentes en el alfa-carbono que tiene la funcionalidad tiol), a los agentes de enlace celular proporciona conjugados que tienen una actividad anti-tumoral muy mejorada in vivo en comparación con los conjugados preparados con los maitansinoides previamente
 20 descritos que no tienen un sustituyente en el átomo alfa-carbono que tiene el enlace disulfuro. Otro hallazgo inesperado fue que se obtiene actividad biológica mejorada cuando el impedimento estérico está de manera óptima en el lado del maitansinoide del enlace de disulfuro en los conjugados. Además, el grupo acilo de la cadena lateral de amino ácido acilado del maitansinoide que tiene el grupo sulfhidrilo posee una longitud
 25

de cadena de por lo menos átomos de carbono entre el grupo carbonilo de la amida y el átomo de azufre.

Esos hallazgos demuestran que los conjugados de agente de enlace celular enlazados con disulfuro- maitansinoide pueden ser contruidos de manera que las sustituciones en los átomos alfa-carbono que tienen el enlace de disulfuro pueden conducir a grados variables de impedimento estérarico en cualquier lado del enlace de disulfuro.

En consecuencia, la presente invención describe la síntesis de nuevos maitansinoides estéricamente impedidos y que contienen disulfuro, que tienen uno o dos sustituyentes alquilo en el átomo alfa-carbono que tiene el átomo de azufre. Además, el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácido acilatado posee una longitud de cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono entre el grupo carbonilo de la amida y el átomo de azufre.

También se describe la preparación y la evaluación biológica de los conjugados de agente de enlace celular de esos nuevos maitansinoides.

En una modalidad de la invención, se describen los nuevos maitansinoides que contienen tiol y disulfuro que tienen una sustitución mono- o di-aquilo en el átomo de carbono que tiene el átomo de azufre.

En una segunda modalidad, la presente invención describe métodos para la síntesis de esos nuevos maitansinoides.

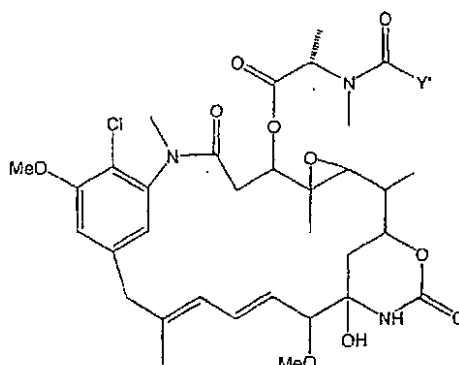
En una tercera modalidad, se describen métodos para el enlace de esos nuevos maitansinoides a agentes de enlace celular. Esos conjugados son útiles como agentes terapéuticos, los cuales son suministrados de manera específica a células objetivo y son citotóxicos. Esos conjugados exhiben una eficacia terapéutica enormemente mejorada en modelos de tumor animal comparados con los agentes previamente descritos.

De manera más específica, la presente invención proporciona:

Un maitansinoide que tiene, en C-3, C-14 hidroximetri, C-15 hidroxi, o C-20 desmetilo, una cadena lateral de aminoácido acilatado con un grupo acilo que tiene un grupo sulfidrilo impedido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que tiene la

funcionalidad tiol tiene uno o dos sustituyentes que son CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquil o alquenilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre;

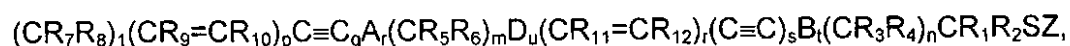
[24] Un compuesto representado por la fórmula 4':



4'

en donde:

Y' representa



en donde:

R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;

A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenil sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en ningún momento.

Z es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

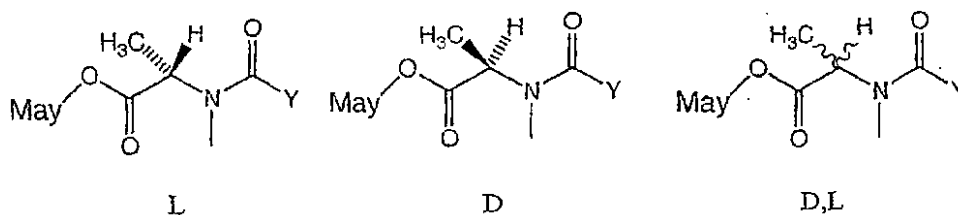
Un compuesto representado por la fórmula 4', en donde R_1 es H, R_2 es metilo y Z es H.

Un compuesto representado por la fórmula 4', en donde R_1 y R_2 son metilo y Z es H.

Un compuesto representado por la fórmula 4', en donde R_1 es H, R_2 es metilo y Z es -SCH₃.

Un compuesto representado por la fórmula 4', en donde R_1 y R_2 son metilo y Z es -SCH₃.

Un compuesto representado por la fórmula (I-L), (I-D), o (I-D, L):



en donde

(I)

Y representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$, en donde:

R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo

sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno de manera independientemente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

Z es H, SR o -COR en donde R es alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y

May representa un maitansinoide que tiene la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo;

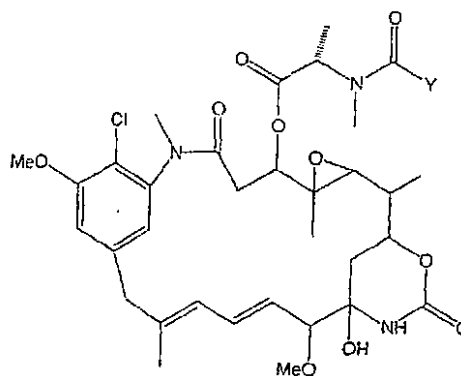
El compuesto antes descrito, en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es H;

El compuesto antes descrito, en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es H;

El compuesto antes descrito, en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃;

El compuesto antes descrito, en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃;

Un compuesto representado por la fórmula 4:



en donde:

Y representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$, en donde:

R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico

que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l , m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

Z es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

El compuesto de la fórmula 4, en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H; l y m son cada una 1; n es 0; y Z es H;

El compuesto de la fórmula 4, en donde R_1 y R_2 son metilo; R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1; n es 0; y Z es H;

El compuesto de la fórmula 4, en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son cada una 1, n es 0, y Z es $-SCH_3$;

El compuesto de la fórmula 4, en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es $-SCH_3$;

Un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente de enlace celular, en donde el maitansinoide es cualquiera de los compuestos antes descritos;

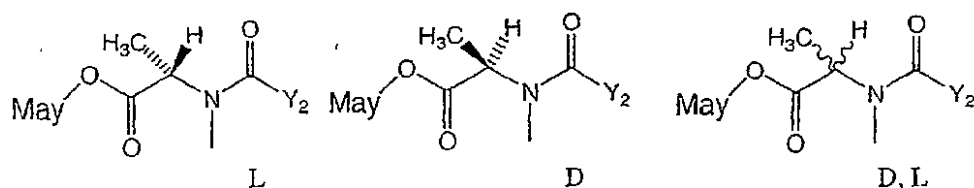
Cualquiera de los conjugados maitansinoide-agente de enlace celular antes mencionados, en donde el agente de enlace celular comprende por lo menos un sitio de enlace de un anticuerpo, preferiblemente MY9 humanizado o de superficie adicional, anti-B4 humanizado o de superficie adicional, o C242 humanizado o de superficie adicional;

Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de cualquiera de los conjugados maitansinoide-agente de enlace celular, una sal

farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable;

Un método de esterificación de un maitansinoide en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo, o C-20 desmetilo, con una cadena lateral de amino ácido acilatado en donde el grupo acilo tiene una funcionalidad sulfhidrilo protegida, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que tiene la funcionalidad tiol protegida tiene uno o dos sustituyentes, dichos sustituyentes que son CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre, dicho método que comprende hacer reaccionar un maitansinoide en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo, o C-20 desmetilo, con el aminoácido acilatado en donde el grupo acilo tiene un grupo sulfhidrilo protegido;

Un método de esterificación de un maitansinoide para producir un éster de maitansinoide representado por la fórmula (IV-L), (IV-D), o (IV-D, L):



en donde:

Y₂ representa (CR₇R₈)₁(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ₂, en donde:

R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;

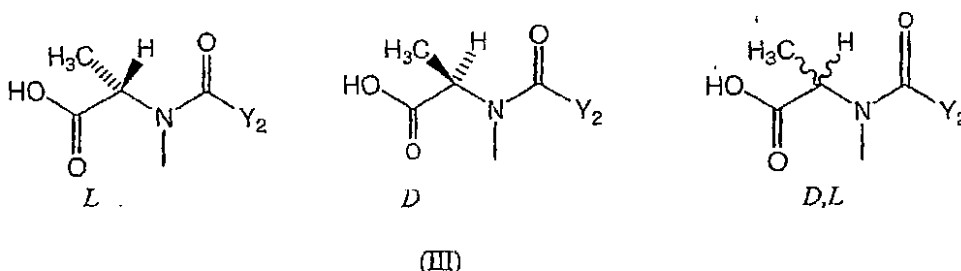
R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo cíclico lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo

sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l , m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

Z_2 es SR o COR, en donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y

May es un maitansinoide; el método que comprende hacer reaccionar dicho May en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo, o C-20 desmetilo, con un compuesto de la fórmula (III-L), (III-D), o (III-D, L):



en donde:

Y_2 representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 alquilo o alqueno lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5 alquilo o alqueno lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l , m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

Z_2 es SR o -COR, en donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10

átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

El método antes descrito, en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H; l y m son cada una 1; y n es 0;

5 El método antes descrito, en donde el compuesto de la fórmula (III) está representado por la fórmula (III-L);

El método antes descrito, en donde el compuesto de la fórmula (III-L) es el compuesto 15a(S, S), 15b(S, R) o una mezcla de 15a(S, S) y 15b(S, R);

10 El método antes descrito, en donde el compuesto de la fórmula (III-D) es el compuesto 15(R, S), 15(R, R), o una mezcla de 15(R, S) y 15 (R, R);

El método antes descrito, en donde el compuesto de la fórmula (III-D, L) es N-metilalanina racémica acilata con un grupo carboxílico que tiene una funcionalidad tiol protegida, en la cual el centro de carbono que tiene el átomo de azufre es racémico o de la quiralidad R o S para dar compuestos de la estructura de 15;

15 El método antes descrito, en donde la mezcla de 15a(S, S) y 15b(S, R) se hace por medio de un proceso que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metil metantiolsulfonato para dar el compuesto 13;

(2) convertir el compuesto 13 en su éster de N-hidroxisuccinimida 14;

20 (3) hacer reaccionar el compuesto 14 con N-metil-L-alanina para dar la mezcla de compuestos 15a(S, S) y 15b(S, R);

El método antes descrito, en donde el compuesto 15a(S, S) es elaborado a través de un método que comprende: (1) convertir (R)-1,3-butandiol en ácido (S)-4-(metiditio)pentanoico 19;

25 (2) convertir el compuesto 19 en su éster de N-hidroxisuccinimida (20); y

(3) hacer reaccionar el compuesto 20 con N-metil-L-alanina para dar el compuesto 15a(S, S).

El método antes descrito, en donde el compuesto 15b (S, R) es elaborado mediante un método que comprende:

- (1) convertir (S)-1, 3-butandiol en ácido (R)-4-(metiditio) pentanoico 24;
- (2) convertir el compuesto 24 en su éster de N-hidroxisuccinimida (25); y
- (3) hacer reaccionar el compuesto 25 con N-metil-L-alanina para el compuesto 15b(S, R).

5 El método antes descrito, en donde la mezcla de compuestos 15(R, S) y 15(R, R) es elaborada mediante un proceso que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metil metantiolsulfonato para dar el compuesto 13;

(2) convertir el compuesto 13 en su éster N-hidroxisuccinimida 14,

10 (3) hacer reaccionar el compuesto 14 con N-metil-D-alanina para dar la mezcla de compuestos 15 (R, S) y 15(R, R).

El método antes descrito, en donde la N-metilalanina racémica acilatada con un grupo carboxílico que tiene un a funcionalidad tiol protegida, en la cual el centro de carbono que tiene el átomo de azufre es racémico o de la quiralidad R o S para dar los compuestos de la estructura de 15 se elabora mediante un proceso que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metil metantiolsulfonato para dar el compuesto 13;

(2) convertir el compuesto 13 en su éster de N-hidroxisuccinimida 14;

(3) hacer reaccionar el compuesto 14 con N-metilalanina racémica para dar la N-metilalanina racémica acilatada con un grupo carboxílico que ostenta una funcionalidad tiol protegida, en la cual el centro de carbono que tiene el átomo de azufre es racémico o de la quiralidad R o S para dar los compuestos de la estructura 15.

El método antes descrito, en donde R_1 y R_2 son metilo; R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H; 1 y m son cada una 1; y n es 0;

25 El método antes descrito, en donde el compuesto de la fórmula (III-L) es el compuesto 10(S) que contiene N-metil-L-alanina;

El método antes descrito, en donde el compuesto de la fórmula (III-D) es el compuesto 10(R) que contiene N-metil-D-alanina;

El método antes descrito, en donde el compuesto de la fórmula (III-D, L) es el

compuesto 10(S, R) que contiene N-metilalanina racémica;

El método antes descrito, en donde el compuesto 10 contiene N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina o N-metilalanina racémica es elaborado a través del proceso que comprende:

5 (1) hacer reaccionar sulfuro de isobutileno (5) con el anion de acetonitrilo para dar el compuesto 6;

(2) hidrolizar el compuesto 6 para dar el ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (7);

(3) convertir el compuesto 7 en el disulfuro 8 mediante la reacción con metil metantiolsulfonato;

10 (4) convertir el compuesto 8 en su éster de N-hidroxisuccinimida 9; y

(5) hacer reaccionar el compuesto 9 con N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, o N-metilalanina racémica para dar dicho compuesto 10 que contiene N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, o N-metilalanina racémica;

15 Un método para elaborar un maitansinoide a través del método de cualquiera de los métodos antes descritos, separando diastéromeros, si están presentes, y purificar el maitansinoide mediante BPLC en sílice enlazado a ciano;

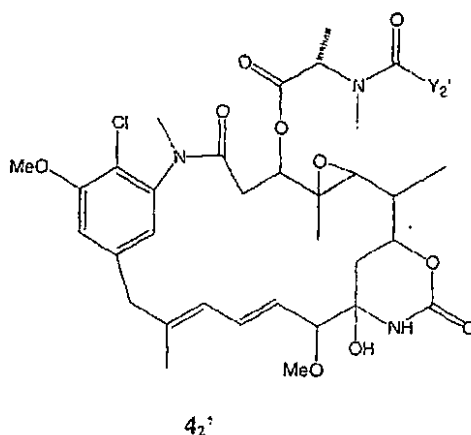
20 Un método para elaborar un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular que comprende elaborar un maitansinoide purificado a través de cualquiera de los métodos antes descritos, y hacer reaccionar el maitansinoide purificado con un agente de enlace celular que comprende un grupo ditio reactivo o un grupo sulfidrido.

El método antes descrito para elaborar un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular, en donde el grupo ditio reactivo es un grupo ditiopiridilo o un grupo ditiopiridilo sustituido;

25 Un método para elaborar un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular que comprende elaborar un maitansinoide purificado a través de cualquiera de los métodos antes descritos, y hacer reaccionar el maitansinoide purificado con un agente de enlace celular que comprende un grupo maleimido o un grupo haloacetilo;

Un método de esterificación de un maitansinol para dar un maitansinoide de la fórmula 4₂'

22



en donde

Y_2' representa

10 $(CR_7R_8)_1(CR_9=CR_{10})p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_t(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$, en
donde:

R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal
que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico
que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical
15 heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

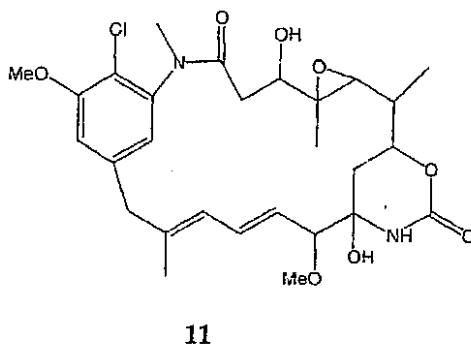
A , B , y D cada uno de manera independiente es cicloalquilo o cicloalquenilo que
tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico
aromático o heterocicloalquilo;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{11} , y R_{12} son cada uno de manera independiente H,
20 CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo
o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo,
fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

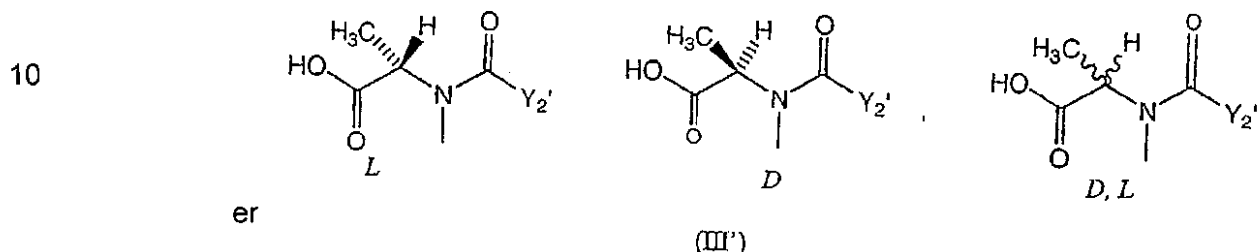
l , m , n , o , p , q , r , s , y t son cada una de manera independiente 0 o un entero desde
1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l , m , n , o , p , q , r , s y t no son cero en
25 ningún momento; y

Z_2 es SR o $-COR$, en donde R es alquilo alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta
10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3-10
átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o
heterocicloalquilo, el método que comprende hacer reaccionar maitansinol de la

estructura 11 en el C-3:



con un compuesto de la fórmula (III'-L), (III'-D), o (III'-D, L):



Y2 representa



donde:

R1 y R2 son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R2 puede ser H;

A, B, y D cada uno, de manera independiente es cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

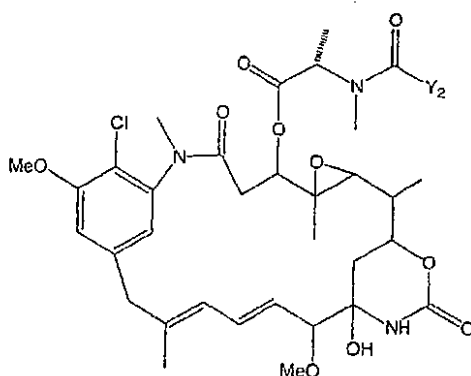
l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en cualquier momento; y

Z_2 es SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

El método de esterificación de maitansinol para dar un maitansinoide de la fórmula 4₂', en donde el compuesto de la fórmula (I) está representado por la fórmula (I-L).

El método de esterificación de maitansinol para dar un maitansinoide de la fórmula 4₂', en donde R₁ es H y R₂ es metilo,

Un método de esterificación de maitansinol para dar un maitansinoide de la fórmula 4₂:

4₂

en donde:

Y_2 representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

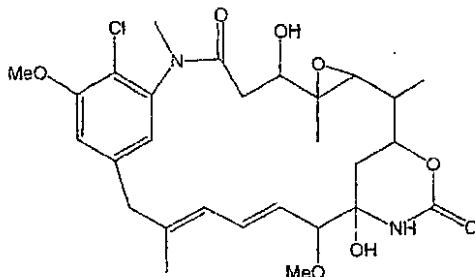
R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

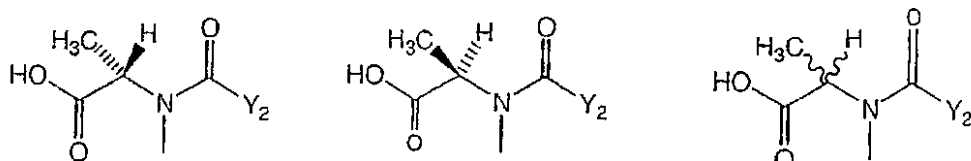
Z_2 es SR o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta

10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, el método que comprende hacer reaccionar maitansinol de la estructura 11:



11

en la posición C-3 con un compuesto de la fórmula (III-L), (III-D), o (III-D, L):



L

D

D, L

(III)

en donde:

Y_2 representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l , m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

Z_2 es SR o COR, en donde R es

alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o

alqueno ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

El método antes descrito de esterificación de maitansinol para dar el maitansinoide de la fórmula 4a, en donde el compuesto de la fórmula (III) está representado por la fórmula (III-L);

El método antes descrito de esterificación de maitansinol para dar maitansinoides de la fórmula 4a, en donde dicho compuesto de la fórmula (III-L) es el compuesto 15a(S, S), 15b(S, R) o una mezcla de 15a(S, S) y 15b(S, R);

El método antes descrito de esterificación de maitansinol para dar maitansinoides de la fórmula 4a, en donde dicho compuesto de la fórmula (III-D) es el compuesto 15(R, S), 15(R, R), o una mezcla de 15(R, S) y 15(R, R);

El método antes descrito de esterificación de maitansinol para dar maitansinoides de la fórmula 4a, en donde dicho compuesto de la fórmula (III-D,L) es N-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que tiene una funcionalidad tiol protegida, en la cual el centro de carbono que tiene el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S para dar compuestos de la estructura de 15;

El método antes descrito de esterificación de maitansinol para dar maitansinoides de la fórmula 4a, en donde la mezcla de 15a(S, S) y 15b(S, R) se hace por medio de un proceso que comprende

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metil metantiolsulfonato para dar el compuesto 13;

(2) convertir el compuesto 13 en su éster de N-hidroxisuccinimida 14;

(3) hacer reaccionar el compuesto 14 con N-metil-L-alanina para dar la mezcla de los compuestos 15a(S, S) y 15b(S, R);

El método antes descrito de esterificación de maitansinol, en donde el compuesto 15a(S, S) se elabora por medio de un método que comprende: (1) convertir (R)-1,3-butandiol en ácido (S)-4-(metiditio)pentanoico 19;

(2) convertir el compuesto 19 en su éster de N-hidroxisuccinimida (20); y

(3) hacer reaccionar el compuesto 20 con N-metil-L-alanina para dar el compuesto

15a(S, S).

El método antes descrito de esterificación de maitansinol, en donde el compuesto 15b(S, R) es elaborado por medio de un método que comprende:

- (1) convertir (S)-1,3-butandiol en ácido (R)-4-(metiditio)pentanoico 24;
- 5 (2) convertir el compuesto 24 en su éster de N-hidroxisuccinimida (25);
- (3) hacer reaccionar el compuesto 25 con N-metil-L-alanina para dar el compuesto 15b(S, R);

El método antes descrito de esterificación de maitansinol para dar maitansinoides de la fórmula 4a, en donde la mezcla de compuestos 15(R, S) y 15(R, R) se puede hacer a través de un proceso que comprende:

- (1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metil metantiolsulfonato para dar el compuesto 13;
- (2) convertir el compuesto 13 en su éster de N-hidroxisuccinimida 14;
- (3) hacer reaccionar el compuesto 14 con N-metil-D-alanina para dar la mezcla de compuestos 15(R, S) y 15(R, R).

El método antes descrito de esterificación de maitansinol para dar los maitansinoides de la fórmula 4a, en donde N-metilalanina racémica acilatada con un grupo carboxílico que tiene una funcionalidad tiol protegida, en la cual el centro de carbono que tiene el átomo de azufre es racémico o de la quiralidad R o S para dar compuestos de la estructura de 15 se elabora por medio de un proceso que comprende:

- (1) hacer reaccionar el ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metil metantiolsulfonato para dar el compuesto 13;
- (2) convertir el compuesto 13 en su éster de N-hidroxisuccinimida 14;
- (3) hacer reaccionar el compuesto 14 con N-metilalanina racémica para dar, la N-metilalanina racémica acilatada con un grupo carboxílico que tiene una funcionalidad tiol protegida, en la cual el centro de carbono que tiene el átomo de azufre es racémico o de la quiralidad R o S para dar el compuesto de la estructura 15.

El método antes descrito de esterificación de maitansinol, en para dar maitansinoides de la fórmula 4b, en donde R_1 y R_2 are son metilo; R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada

uno H; l y m son 1; y n es 0;

El método antes descrito de esterificación de maitansinol, en para dar maitansinoides de la fórmula 4b, en donde el compuesto de la fórmula (III-L) es el compuesto 10 que contiene N-metil-L-alanina;

5 El método antes descrito de esterificación de maitansinol, en para dar maitansinoides de la fórmula 4b, en donde el compuesto de la fórmula (III-D) es el compuesto 10 que contiene N-metil-D- alanina;

10 El método antes descrito de esterificación de maitansinol, en para dar maitansinoides de la fórmula 4b, en donde el compuesto de la fórmula (III-D,L) es el compuesto 10 que contiene N-metilalanina racémica;

El método antes descrito de esterificación de maitansinol, en para dar maitansinoides de la fórmula 4b, en donde el compuesto 10 contiene N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina o N-metilalanina racémica es elaborado a través de un proceso que comprende:

15 (1) hacer reaccionar disulfuro de isobutileno (5) con el anión de acetonitrilo para dar el compuesto 6;

(2) hidrolizar el compuesto 6 para dar el ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (7);

(3) convertir el compuesto 7 en el disulfuro 8 por medio de la reacción con metil metantiolsulfonato;

20 (4) convertir el compuesto 8 en su éster de N-hidroxisuccinimida 9; y

(5) hacer reaccionar el compuetto 9 con N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, o N-metilalanina racémica para dar el compuesto 10 que contiene N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina o N-metilalanina racémica;

25 El método antes descrito de esterificación de maitansinol con 10, seguido por la separación de diasterómeros, si están presentes, y purificar el maitansinoide mediante HPLC sílice enlazada con ciano, que comprende además la reducción del enlace de disulfuro, para dar los maitansinoides de la fórmula 4b;

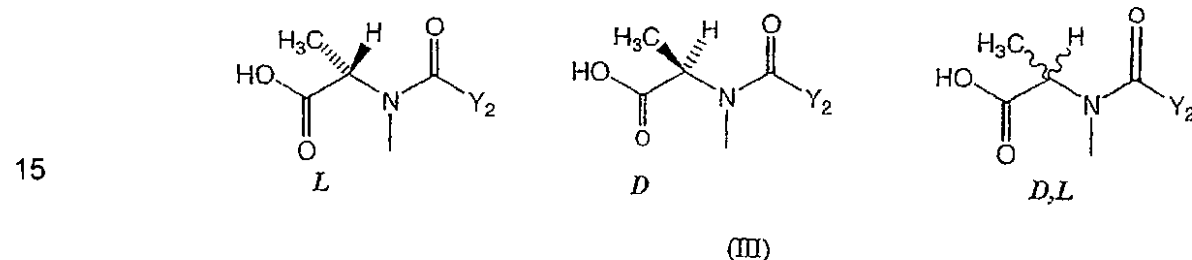
Un método para elaborar un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular que comprende elaborar un maitansinoide purificado a través de cualquiera de los

métodos antes descritos de esterificación de maitansinol para dar maitansinoides de la fórmula 4b, y hacer reaccionar el maitansinoide con un agente de enlace celular que comprende un grupo sulfidrido o un grupo ditio, de manera preferible, un grupo ditiopiridilo o un grupo ditiopiridilo sustituido;

- 5 [83] Un método para elaborar un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular que comprende hacer un maitansinoide purificado a través de cualquiera de los métodos antes descritos de esterificación de maitansinol para dar maitansinoides de la fórmula 4b, y hacer reaccionar el maitansinoide con un agente de enlace celular que comprende un maleimido o un grupo haloacetilo.

10 Métodos de terapia que utilizan los conjugados antes descritos.

Compuestos de la fórmula (III):



en donde:

Y_2 representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

20 R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

25 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l , m y n son cada una de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

Z_2 es SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tienen desde 1

hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquénilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

Compuestos 10 (S), 10 (R) o racémico 10;

5 Un método para elaborar el compuesto 10 que contiene N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, o N-metilalanina racémica que comprende:

(1) hacer reaccionar sulfuro de isobutileno (5) con el anion de acetonitrilo para dar el compuesto 6;

(2) hidrolizar el compuesto 6 para dar el ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (7);

10 (3) convertir el compuesto 7 en el disulfuro 8 por medio de la reacción con metilmetantiolsulfonato;

(4) convertir el compuesto 8 en su éster de N-hidroxisuccinimida 9; y

(5) hacer reaccionar el compuesto 9 con N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, o N-metilalanina racémica para dar el compuesto 10 que contiene N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, o N-metilalanina racémica.

Una mezcla de los compuestos 15a(S, S) y 15b(S, R);

Un método para hacer una mezcla de compuestos 15a(S, S) y 15b(S, R), que comprende:

20 (1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metilmetantiolsulfonato para dar el compuesto 13;

(2) convertir el compuesto 13 en su éster de N-hidroxisuccinimida (14);

(3) hacer reaccionar el compuesto 14 con N-metil-L-alanina para dar la mezcla de compuestos 15a(S, S) y 15b(S, R);

Una mezcla de compuestos 15(R, S) y 15(R, R).

25 Un método para hacer una mezcla de compuestos 15(R, S) y 15 (R, R) que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metil metantiolsulfonato para dar el compuesto 13;

(2) convertir el compuesto 13 en su éster de N-hidroxisuccinimida 14;

(3) hacer reaccionar el compuesto 14 con N-metil-D-alanina para dar la mezcla de compuestos 15(R, S) y 15(R, R).

[92] N-metilalanina racémica acilatada con un grupo carboxílico que tiene una funcionalidad tiol protegida, en la cual el centro de carbono que tiene el átomo de azufre es racémico o de la quiralidad R o S para dar los compuestos de la estructura de 15.

A método para hacer N-metilalanina racémica acilatada con un grupo carboxílico que tiene una funcionalidad tiol protegida, en la cual el centro de carbono que tiene el átomo de azufre es racémico o de la quiralidad R o S para dar los compuestos de la estructura 15, que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metil metantiolsulfonato para dar el compuesto 13;

(2) convertir el compuesto 13 en su éster de N-hidroxisuccinimida 14;

(3) hacer reaccionar el compuesto 14 con N-metilalanina racémica para dar la N-metilalanina racémica acilatada con a grupo carboxílico que tiene una funcionalidad tiol protegida, en el cual centro de carbono que tiene el átomo de azufre es racémico o de la quiralidad R o S para dar el compuesto de la estructura 15.

Compuesto 15a(S, S);

[95] Compuesto 15b (S, R);

[96] A método para hacer el compuesto 15a(S, S) que comprende:

(1) convertir (R)-1,3-butandiol en ácido (S)-4-(metiditio)pentanoico 19;

(2) convertir el compuesto 19 en su éster de N-hidroxisuccinimida (20); y (3) hacer reaccionar el compuesto 20 con N-metil-L-alanina para dar el compuesto 15a (S, S);

A método para hacer el compuesto 15b(S, R) que comprende:

(1) convertir (S)-1,3-butandiol en ácido (R)-4-(metiditio)pentanoico 24;

(2) convertir el compuesto 24 en su éster de N-hidroxisuccinimida (25); y

(3) hacer reaccionar el compuesto 25 con N-metil-L-alanina para dar el compuesto 15b(S, R).

Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de cualquiera de los compuestos de maitansinoide antes descritos, a sal farmacéuticamente

aceptable o solvato de la misma, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable;

La composición farmacéutica antes descrita que comprende un compuesto de maitansinoide, que comprende además un anticuerpo.

5 Un método para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células objetivo o tejido que contiene células objetivo con una cantidad efectiva de cualquiera de los maitansinoide-agente de enlace celular, sales o solvatos de las mismas antes descritos.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG.1 muestra las estructuras los maitansinoides previamente descritos.

La FIG. 2 muestra las estructuras de algunos de los maitansinoides de la presente invención.

15

Las FIGS. 3a-d muestran esquemas de la síntesis de los maitansinoides representativos de la presente invención.

Las FIGS. 4a, b son gráficas que muestran la potencia in vitro de los nuevos maitansinoides de la presente invención.

20

Las FIGS. 4c, d son gráficas que comparan la potencia in vitro de los nuevos maitansinoides de la presente invención con aquellos previamente descritos.

Las FIGS.5a-d muestran esquemas para la preparación de los conjugados de agentes de enlace celular agentes de enlace celular con los maitansinoides de la presente invención.

25

La FIG. 6 es una gráfica que muestra la potencia in vitro de conjugados de agente de enlace celular-maitansinoide de la presente invención.

La FIG. 7 es una gráfica que compara la eficiencia anti-tumoral in vivo de huC242-maitansinoides de la presente invención con conjugados huC42 de los maitansinoides previamente descritos, contra xenógrafos tumorales de colon humano HT-29 xenógrafos tumorales de colon humano.

La FIG. 8 es una gráfica que compara la eficacia anti-tumoral in vivo de huC242-maitansinoides de la presente invención con conjugados huC242 de los maitansinoides previamente descritos, contra xenógrafos tumorales de colon humano COLO 205.

5 La FIG. 9 es una gráfica que compara la eficacia anti-tumoral in vivo de MY9-6-maitansinoides de la presente invención con conjugados MY9-6 de los maitansinoides previamente descritos, contra xenógrafos de leucemia mieloide promielocítica HL60.

La FIG. 10 muestra el resultado de la evaluación de citotoxicidad in vitro del conjugado huMy9-6-DM4 con células HL-60 objetivo y células Namalwa no objetivo.

10 La FIG 11 muestra la evaluación de la eficiencia in vivo del conjugado huMy9-6-DM4 contra tumores de xenógrafo HL-60 humano en ratones SCID y la compara con aquella de un conjugado huMy9-6 de un maitansinoide previamente descrito (huMy9-6-DM1).

La FIG. 12 muestra el resultado de la evaluación de citotoxicidad in vitro del conjugado huB4-DM4 con células Ramos objetivo y células Colo 205 no objetivo.

La FIG. 13a muestra la evaluación de eficacia in vivo del conjugado huB4-DM4 contra tumores de xenógrafo Ramos humano en ratones SCID, y la FIG 13b muestra los cambios en los pesos corporales de los animales durante el período de prueba.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25

La presente invención describe maitansinoides, de tiol estéricamente impedido y que contienen disulfuro novedosos en los cuales el átomo alfa-carbono que tiene el átomo de azufre tiene uno o dos sustituyentes alquilo. La invención describe también un proceso para la síntesis de estos maitansinoides novedosos. Los compuestos novedosos que son útiles como intermediarios en la síntesis de los nuevos maitansinoides se describen de manera adicional. Además, esta invención describe la preparación de conjugados de estos maitansinoides novedosos con agentes de enlace celular.

La técnica revela que es extremadamente difícil modificar los fármacos existentes

sin disminuir su potencial citotóxico. La invención descrita supera este problema al enseñar un método para sintetizar nuevas moléculas de maitansinoide que contienen una porción tiol o disulfuro estéricamente impedida. Los maitansinoides novedosos descritos conservan y en algunos casos inclusive mejoran, la potencia citotóxica de los maitansinoides previamente descritos.

Los conjugados de maitansinoide-agente de enlace celular permiten la medición completa de la acción citotóxica de los maitansinoides que se van a aplicar de una manera activada contra células indeseables solamente. Por lo tanto, la invención proporciona agentes útiles y métodos novedosos para elaborar los mismos, para la eliminación de células enfermas o anormales que serán eliminadas o lisadas, tales como células tumorales (de manera particular células tumorales sólidas), células infectadas por virus, células infectadas por microorganismos, células infectas por parásitos, células autoinmunes (células que producen autoanticuerpos), células activadas (aquellas involucradas en el rechazo de injerto o enfermedad injerto vs. huésped), o cualquier otro tipo de células enfermas o anormales, en tanto que exhiben un mínimo de efectos colaterales.

Por lo tanto, la presente invención enseña un método para la producción de conjugados citotóxicos mejorados que comprenden maitansinoides y agentes de enlace celular novedosos, con actividad biológica enormemente mejorada en comparación con los maitansinoides y agentes de enlace celular previamente descritos. La invención enseña además un método para la síntesis de derivados de maitansinoide que poseen una porción tiol o disulfuro estéricamente impedida que permite el enlace químico a un agente de enlace celular en tanto que exhibe una alta citotoxicidad ya sea en forma enlazada o en forma liberada o en ambos estados. El conjugado citotóxico de acuerdo con la presente invención comprende uno o más maitansinoides vinculados a un agente de enlace celular. A fin de enlazar el maitansinoide a un agente de enlace celular, el maitansinoide debe ser modificado primero.

Los maitansinoides que se pueden utilizar en la presente invención para producir los maitansinoides que son susceptibles a ser vinculados a un agente de enlace celular

son bien conocidos en la técnica y pueden ser aislados a partir de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos o preparados sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos.

5 Ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones.

Ejemplos específicos de análogos adecuados de maitansinol que tienen un anillo aromático modificado incluyen:

10 (1) C-19-decloro (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,256,746) (preparado por la reducción LAH de ansamitocina P2);

(2) C-20-hidroxi (o C-20-demetilo) +/-C-19-decloro (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,361,650 y 4,307,016) (preparado mediante desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces* o declorinación usando LAH); y

15 (3) C-20-demetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-decloro (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,294,757) (preparado mediante acilación utilizando cloruros de acilo).

Ejemplos específicos de análogos adecuados de maitansinol que tienen modificaciones de otras posiciones incluyen:

20 (1) C-9-SH (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,424,219) (preparado por medio de la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅);

(2) C-14-alcoximetilo (demetoxi/CH₂OR) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,331,598);

25 (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,450,254) (preparados a partir de *Nocardia*);

(4) C-15-hidroxi/aciloxi (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,364,866) (preparados mediante la conversión de maitansinol mediante *Streptomyces*);

(5) C-15-metoxi (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,313,946 y 4,315,929)(aislado a partir de *Trewia nudiflora*);

(6) C-18-N-demetilo (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica 4,362,663 y 4,322,348) (preparados mediante la desmetilación de maitansinol mediante *Streptomyces*); y

5 (7) 4,5-deoxi (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,371,533) (preparado mediante la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

Para enlazar el maitansinoide al agente de enlace celular, el maitansinoide comprende una porción de enlace. La porción de enlace contiene un enlace químico que permite la liberación de los maitansinoides completamente activos en un sitio particular. Los enlace químicos son bien conocidos en la técnica e incluyen enlaces de disulfuro,
10 enlace lábiles de ácido, enlaces fotolábiles, enlace lábiles de peptidasa y enlaces lábiles de esterasa. Se prefieren los enlaces de disulfuro.

La descripción de la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,208,020, incorporada a la presente mediante referencia, enseña la producción de los maitansinoides que tienen dichos enlaces.

15 De acuerdo con la presente invención, la porción de enlace comprende una porción tiol o disulfuro estéricamente impedida.

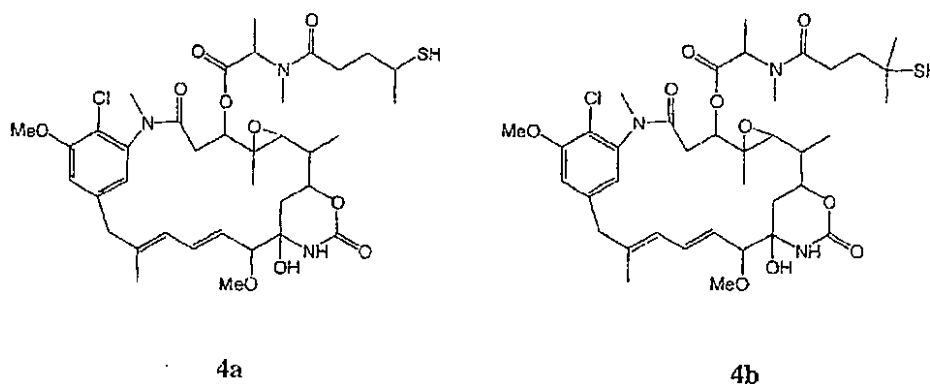
Los maitansinoides particularmente preferidos que comprenden una porción de enlace que contiene un grupo químico reactivo son ésteres C-3 de maitansinol y sus análogos en donde la porción de enlace contiene un enlace de tiol o disulfuro
20 estéricamente impedido.

Muchas posiciones en los maitansinoides pueden servir como la posición para el enlace químico de la porción de enlace. Por ejemplo, se espera que la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo sean útiles. Sin
25 embargo la posición C-3 es preferida y la posición C-3 del maitansinol es especialmente preferida.

Además, en tanto que la síntesis de los ésteres de maitansinol que tiene un a porción de enlace se describen a continuación en términos de un enlace de disulfuro que continúe porciones de enlace en la posición C-3 alguien con experiencia en la técnica

comprenderá que las porciones de enlace con otros enlaces químicos, como se describió antes, también se puede utilizar con la presente invención, al igual que otros maitansinoides y otras posiciones de enlace, como se describió antes.

Las estructuras de varios maitansinoides de la presente invención están representadas en la Fig. 2. La síntesis de los maitansinoides que tiene una porción tiol o disulfuro estéricamente impedida se pueden describir mediante referencia a la Fig. 3. Muchos de los métodos ejemplificados a continuación utilizan los maitansinoides que contienen tiol-, N²-deacetil-N^{2'}(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (denominado DM3) y N²-deacetil-N^{2'}(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (denominada DM4). DM3 (4a) y DM4 (4b) están representados en las siguientes fórmulas estructurales:

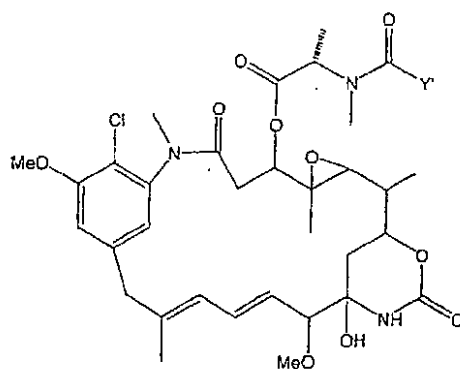


La citotoxicidad in vitro de los nuevos maitansinoides con tiol estéricamente impedido y que contienen disulfuro de la invención puede ser evaluada por su habilidad para suprimir la proliferación de varias líneas celulares indeseables in vitro (Fig. 4). Por ejemplo las líneas celulares tal como la línea de carcinoma de seno humano SK-Br-3, o la línea de célula de carcinoma epidermoide humano KB, pueden ser utilizadas para la determinación de la citotoxicidad de estos nuevos maitansinoides. Las células que se van a evaluar pueden ser expuestas a los compuestos durante 72 horas y las fracciones sobrevivientes de células medidas en pruebas directas a través de métodos conocidos. Los valores IC₅₀ pueden calcularse después a partir de los resultados de las pruebas.

Producción de Maitansinoides que Tienen una Porción Tiol o Disulfuro Estéricamente Impedida

Los maitansinoides novedosos de la invención son aquellos que tienen, en C-3, C-14 hidroximetil, C-15 hidroxil, o C-20 desmetil, una cadena lateral de aminoácido acilado con un grupo acilo que tiene un grupo sulfhidrilo impedido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que tiene la funcionalidad tiol posee uno o dos sustituyentes, dichos sustituyentes que son CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

De manera preferible, los compuestos de maitansinoide están representados por la fórmula 4':



4'

en donde:

Y' representa



en donde:

R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H; A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o

sustituido o radical heterocíclico o heterocicloalquilo;

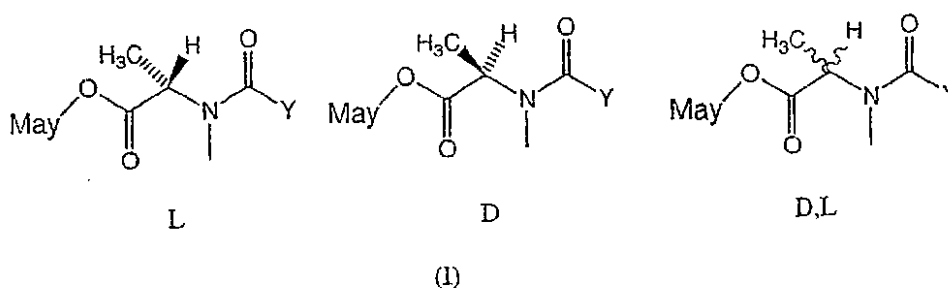
R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l , m , n , o , p , q , r , s y t son cada una de manera independientemente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l , m , n , o , p , q , r , s y t no son cero en ningún momento;

Z es H, SR o -COR en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

En una modalidad preferida del compuesto representado por la fórmula 4', R_1 es H, R_2 es metilo y Z es H; R_1 y R_2 son metilo y Z es H; R_1 es H, R_2 es metilo, y Z es -SCH₃; o R_1 y R_2 son metilo, y Z es -SCH₃

De manera más preferible, los maitansinoides son compuestos representados por la fórmula (I-L), (I-D), o (I-D,L):



en donde:

Y representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$, en donde:

R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5

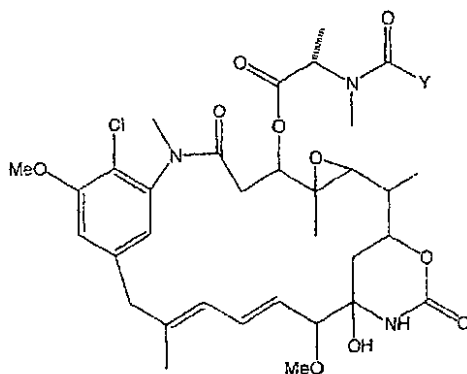
alquilo o alqueno lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m, y n, son cada una de manera independientemente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

Z es H, SR o -COR en donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

May puede representar un maitansinoide que tiene la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo. C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo.

Tiene mayor preferencia el éster C-3, el cual es un compuesto representado por la fórmula 4:



en donde los sustit

4

Son especialmente preferidos cualquiera de los compuestos antes descritos, en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada una 1, n es 0, y Z es H; aquellos compuestos en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es H; aquellos compuestos en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son cada una 1, n es 0, y Z es -SCH₃; y esos compuestos R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃. Además, se prefiere el esteroisómero de L-alanilo ya que es el más útil para los conjugados de invención.

Las modalidades preferidas de la fórmula 4 incluyen DM3 y DM4, es decir, el

maitansinoide de la fórmula 4 en donde Z es H, R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, y l y m son 1, y n es 0 (DM3, compuesto 4a); el maitansinoide de la fórmula 4 en donde Z es H, R₁ y R₂ son ambos metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, l y m son 1, y n es 0 (DM4, compuesto 4b); el maitansinoide de la fórmula 4 en donde R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, y l y m son 1, y n es 0, y Z es -SCH₃; y el maitansinoide de la fórmula 4 en donde R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, y l y m son 1, y n es 0, y Z es -SCH₃.

Ejemplos de alquilos o alqueniilos lineales que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, propenilo, butenilo y hexenilo.

Ejemplos de alquilos o alqueniilos ramificados que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a isopropilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, isopentilo, 1-etil-propilo, isobutenilo e isopentenilo.

Ejemplos de alquilos o alqueniilos cíclicos que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentyl, ciclohexilo, ciclopentenilo, y ciclohexenilo.

Los arilos simples incluyen arilos que tienen de 6 hasta 10 átomos de carbono, y los arilos sustituidos incluyen arilos que tienen desde 6 hasta 10 átomos de carbono que tienen por lo menos un sustituyente alquilo que contiene desde 1 hasta 4 átomos de carbono, o sustituyente alcoxi tal como metoxi, etoxi, o un sustituyente halógeno o un sustituyente nitro.

Ejemplos de arilo simple que contiene de 6 hasta 10 átomos de carbono incluyen fenilo y naftilo.

Ejemplos de arilo sustituido incluyen nitrofenilo, dinitrofenilo.

Radicales heterocíclicos aromáticos incluyen grupos que tienen un anillo de 3a 10 miembros que contienen uno o dos heteroátomos seleccionados a partir de N, O o S.

Radicales heterocicloalquilo incluyen compuestos cíclicos, que comprenden sistemas de anillo desde 3 hasta 10-miembros, que contienen uno o dos heteroátomos, seleccionados a partir de N, O o S.

Ejemplos de radicales aromáticos heterocíclicos incluyen piridilo, nitro-piridilo, pirolilo, oxazolilo, tienilo, tiazolilo, y furilo.

Ejemplos de radicales heteroalquilo incluyen dihidrofurilo, tetrahydrofurilo, tetrahidropirolilo, piperidinilo, piperazinilo, y morfolino.

- 5 Los maitansinoides novedosos que tienen una porción tiol o disulfuro estéricamente impedida pueden ser preparados por medio de los siguientes métodos recientemente descubiertos:

Síntesis de Maitansinoides.

10

- La Fig. 3a muestra las etapas en la síntesis de maitansinoide DM4 (4b). Se hace reaccionar sulfuro de isobutileno (5) con el anión de acetonitrilo para dar el compuesto mercapto 6. La hidrólisis de 6 con la base proporcionó ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (7). La conversión de 7 en el disulfuro 8 se logra por medio de la reacción con metil metantiolsulfonato (MeSSO₂Me). La conversión de 8 en el éster de N-hidroxisuccinimida 9 seguido por la reacción con N-metil-L-alanina proporcionó el ácido carboxílico 10, que fue purificado mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice. La reacción de 10 con maitansinol (11) en presencia de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y cloruro de zinc dio una mezcla del N-acil-N-metil-L-alanil maitansinoide L-DM4SMe, (4e) y el N-acil-N-metil-D-alanil maitansinoide D-DM4SMe(4f). La mezcla de los diastereómeros fue separada mediante HPLC, utilizando una columna enlazada con ciano. El isómero que contiene el L-amino ácido 4e fue recolectado y reducido con ditiotreitól para dar el L-aminoacil maitansinoide que contiene tiol DM4 (4b), el cual fue purificado de nuevo mediante HPLC, utilizando una columna enlazada con ciano.

- 25 La Fig. 3b muestra las etapas en la síntesis del maitansinoide DM3 (4a). El ácido 4-mercaptopentanoico (12) fue convertido en el metildisulfuro mediante reacción con metil metantiolsulfonato para dar 13. Conversión de 13 en éster de N-hidroxisuccinimida 14 seguida por reacción con N-metil-L-alanina proporcionada por el ácido carboxílico 15, que fue purificado mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice. La reacción de 15

con maitansinol (11) en presencia de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y cloruro de zinc dio una mezcla del N-acil-N-metil-L-alanil maitansinoide L-DM3SSMe, (4c) y el N-acil-N-metil-D-alanil maitansinoide D-DM3SSMe (4d). La mezcla de diasterómeros fue separada mediante HPLC, utilizando una columna enlazada por ciano. El isómero que
 5 contiene el L-amino ácido deseado fue recolectado y reducido con ditioneitol para dar el maitansinoide que contiene mercapto-L-amino ácido DM3 (4a), que de nuevo fue purificado mediante HPLC, utilizando la columna enlazada por ciano.

Las Figs. 3c y d muestran la síntesis de DM3 que tiene la porción (S)-4-metilditio-1-oxopentil o la porción (R)-4-metilditio-1-oxo-pentilo.

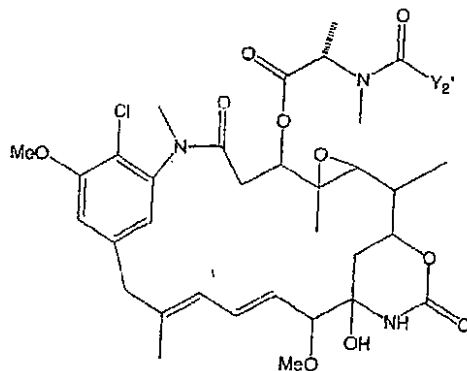
La conversión o (R)-1, 3-butandiol (16) en su ditosilato 17, seguido por reacción
 10 secuencial con cianida de sodio y etil xantato de potasio dio nitrilo 18 (Fig.3c). La hidrólisis de base, seguida por intercambio de disulfuro dio ácido (S)-4-metilditio-pentanoico 19. La conversión de 19 en el éster de succinimidilo 20, seguida por la reacción con N-metil-L-alanina dio N-metil-N-[4-(S)-metilditio-1-oxo-pentil]-S-alanina
 15 (15a). La reacción con maitansinol, como se describió antes para el compuesto 15, dio dos diasterómeros de L-DM3SSMe 4g y 4h. De manera similar, (S)-1,3-butandiol (21) fue convertido en ácido (R)-4-metilditio-pentanoico 24 y después en 15b.

La reacción con maitansinol, como se describió antes, dio los dos diasterómeros de DM3SSMe, 4k y 4l.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para la esterificación de
 20 un maitansinoide en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxil, o C-20 desmetilo, con una cadena lateral de aminoácido acilado en donde el grupo acilo tiene un grupo sulfhidrilo protegido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que tiene la funcionalidad tiol protegida tiene uno dos sustituyentes, dichos sustituyentes que son CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenoilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenoilo
 25 ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de

azufre, el método que comprende hacer reaccionar un maitansinoide en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo, o C-20 desmetilo, dicho método que comprende hacer reaccionar un maitansinoide en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo, o C-20 desmetilo, con el aminoácido acilado en donde el grupo acilo tiene un grupo sulfhidrilo protegido.

- 5 En una modalidad preferida, la presente invención proporciona un método de esterificación de maitansinol para dar un maitansinoide de la formula 4₂':



en donde:

- 15 Y₂' representa

$(CR_7R_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_t(C\equiv C)_sB_l(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

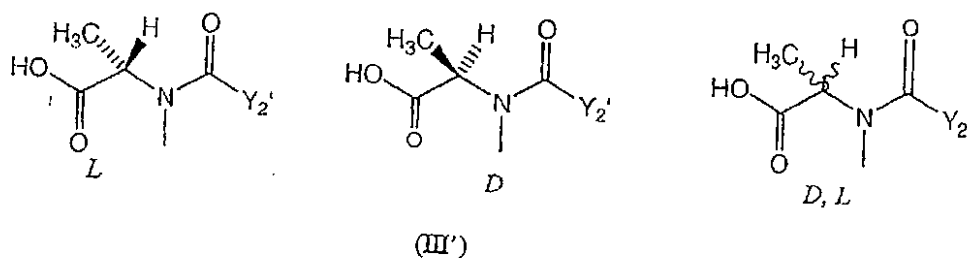
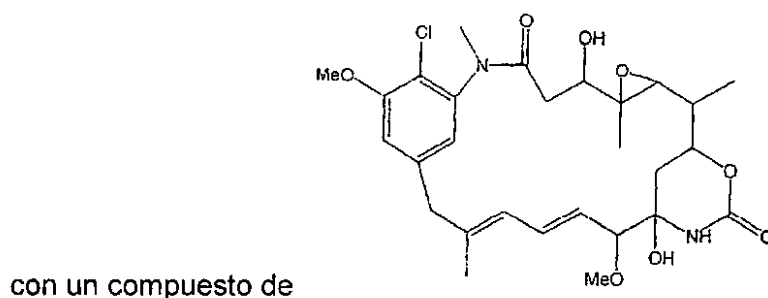
- 20 R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico o ramificado que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H; A, B, y D cada uno de manera independiente es cicloalquilo o cicloalquenilo que tiende de 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

- 25 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenil sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde

1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en ningún momento.

Z es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, el método que comprende hacer reaccionar maitansinol de la estructura 11 en la C-3:



en donde:

Y2, representa



donde:

R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;

A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno de manera independiente H,

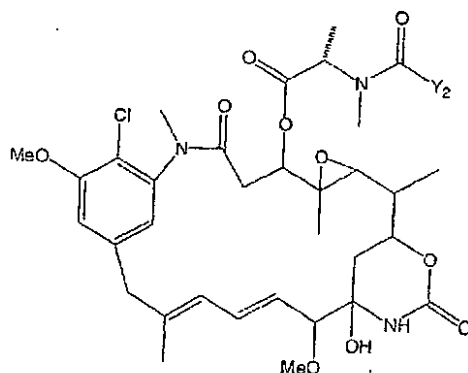
CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenil sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en ningún momento; y

Z es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

De manera preferible, el compuesto de la fórmula (1) está representado por la fórmula (I-L) y también, de preferencia, R₁ es H y R₂ es metilo.

En una modalidad más preferida, la presente invención proporciona, un método de esterificación de un maitansinol para dar un maitansinoide de la fórmula 4₂:

4₂

en donde:

Y₂ representa (CR₇R₈)₁(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ₂, en donde:

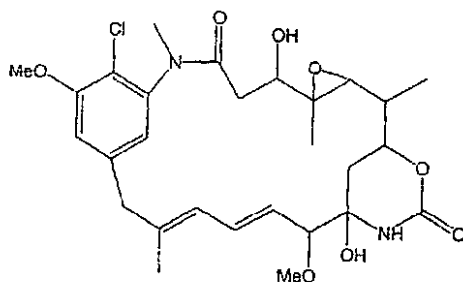
R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo

sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

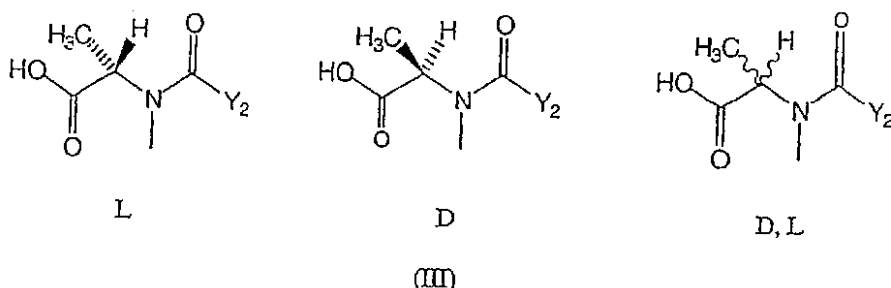
l, m y n son cada uno de manera independientemente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

Z es H, SR o -COR en donde R es alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; el método que comprende hacer reaccionar maitansinol de la estructura 11 en la posición C-3:



11

con un compuesto representado por la fórmula (III-L), (III-D), o (III-D,L):



en donde:

Y_2 representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo

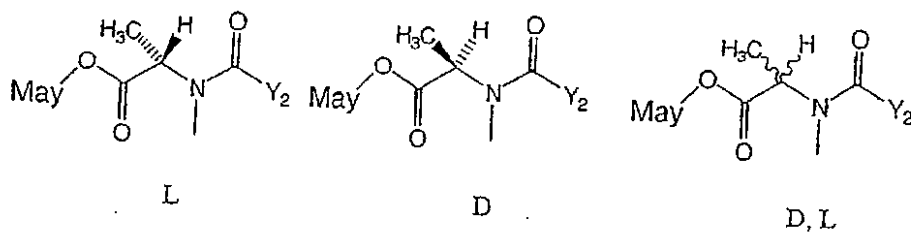
sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

Z es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

Los diastereómeros pueden ser separados mediante HPLC en columna enlazada con ciano.

En una modalidad más preferida, la presente invención proporciona un método de esterificación de un maitansinoide para producir un éster de maitansinoide representado por la fórmula (IV-L), (IV-D), o (IV-D,L):



en (IV)

Y_2 representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 alquilo o alqueno lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

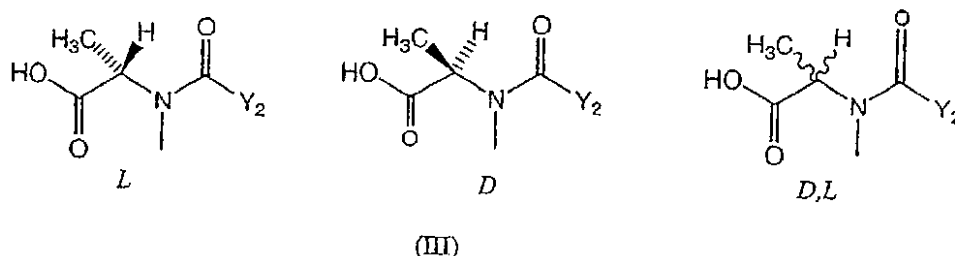
R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5 alquilo o alqueno cíclico lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

Z_2 es SR o COR, en donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene desde 1 hasta

10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y

May es un maitansinoide; el método que comprende hacer reaccionar dicho May en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo, o C-20 desmetilo, con un compuesto de la fórmula (III-L), (III-D), o (III-D, L):



en donde:

Y_2 representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

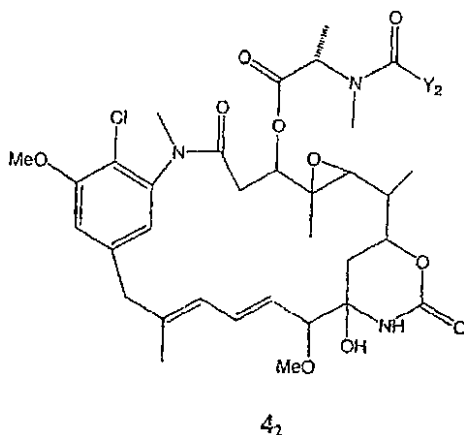
R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo cíclico lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l , m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

Z_2 es SR o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

En una modalidad aun más preferida la presente invención proporciona un método de esterificación de maitansinol para dar el maitansinoide de la fórmula 4₂:



en donde:

Y_2 representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

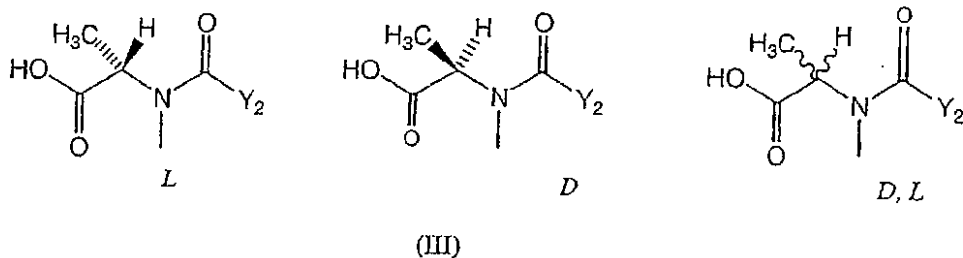
R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo cíclico lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l , m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

Z_2 es SR o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, el método que comprende hacer reaccionar maitansinol en C-3 con un compuesto de la fórmula (III-L), (III-D), o (III-D,L):

25



en donde:

Y_2 representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo cíclico lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l , m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

Z_2 es SR o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

De manera preferible, el compuesto representado por la fórmula (I) es el L esteroisómero.

Para los métodos anteriores, se prefiere que R_1 sea H, R_2 sea metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 sean cada uno H, l y m sean cada una 1, y n sea 0; o que R_1 y R_2 sean metilo, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 sean cada uno H, l y m sean 1, y n sea 0.

Cuando se elabora DM3, el compuesto de la fórmula (III-L) es 15a(S,S), 15b(S,R) o una mezcla de 15a(S,S) y 15b(S,R); el compuesto de la fórmula (III-D) es N-metil-D-alanina acilatada con el grupo acilo racémico o con el grupo acilo que tiene una quiralidad R o S para dar el compuesto 15; y el compuesto de la fórmula (III-D,L) es N-metilalanina racémica acilatada con grupo carboxílico que tiene una funcionalidad tiol protegida, en el cual el centro de carbono que tiene el átomo de azufre es racémico o de la quiralidad R o S para dar el compuesto de la estructura de 15.

La mezcla de 15a(S,S) y 15b(S,R) se puede hacer por medio de un proceso que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metil metantiolsulfonato para dar el compuesto 13;

(2) convertir el compuesto 13 en su éster de N-hidroxisuccinimida 14;

(3) hacer reaccionar el compuesto 14 con N-metil-L-alanina para dar la mezcla de compuestos 15a(S,S) y 15b (S,R).

De manera similar, la mezcla de compuestos 15(R,S) y 15(R,R) puede hacerse por medio de un proceso que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metil metantiolsulfonato para dar el compuesto 13;

(2) convertir el compuesto 13 en su éster de N-hidroxisuccinimida 14; (3) hacer reaccionar el compuesto 14 con N-metil-D-alanina para dar la mezcla de compuestos 15(R,S) y 15(R,R).

N-metilalanina racémica acilata con un grupo carboxílico que tiene una funcionalidad tiol protegida, en la cual el centro de carbono que tiene el átomo de azufre es racémico o de la quiralidad R o S para dar el compuesto de la estructura 15 se puede hacer mediante un proceso que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metil metantiolsulfonato para dar el compuesto 13;

(2) convertir el compuesto 13 en su éster de N-hidroxisuccinimida 14;

(3) hacer reaccionar el compuesto 14 con N-metilalanina racémica para dar la N-metilalanina acilata racémica con un grupo carboxílico que tiene una funcionalidad tiol protegida, en el cual el centro de carbono que tiene el átomo de azufre es racémico o de la quiralidad R o S para dar el compuesto de la estructura 15.

El compuesto 15a(S,S) se puede hacer por medio de un proceso que comprende:

(1) convertir (R)-1,3-butandiol en ácido (S)-4-(metilditio)pentanoico 19;

(2) convertir el compuesto 19 en su éster de N-hidroxisuccinimida (20); y

(3) hacer reaccionar el compuesto 20 con N-metil-L-alanina para dar el compuesto 15a(S,S).

El compuesto 15b(S,R) se puede hacer por medio de un proceso que comprende:

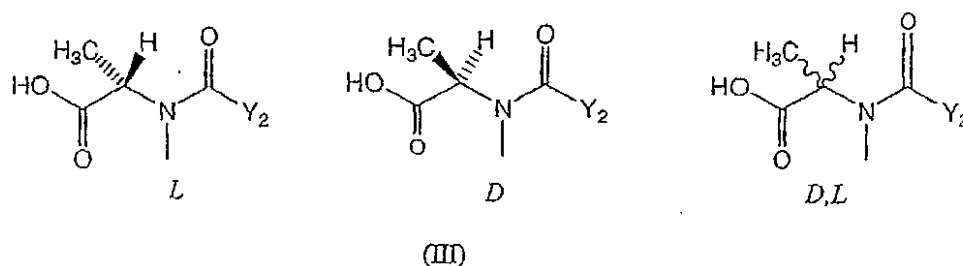
- (1) convertir (S)-1, 3-butandiol en ácido (R)-4-(metiditio) pentanoico 24;
- (2) convertir el compuesto 24 en su éster de N-hidroxisuccinimida (25); y
- (3) hacer reaccionar el compuesto 25 con N-metil-L-alanina para dar el compuesto 15b (S, R).

5 Cuando se elabora DM4, el compuesto de la fórmula (III-L) es un compuesto 10 que contiene N-metil-L-alanina; el compuesto de la fórmula (III-D) es el compuesto 10 que contiene N-metil-D-alanina, y el compuesto de la fórmula (III-D,L) es el compuesto 10 que contiene N-metilalanina racémica.

10 El compuesto 10 que contiene N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, o N-metilalanina racémica se elabora por medio de un proceso que comprende:

- (1) hacer reaccionar sulfuro de sulfuro de isobutileno (5) con el anión de acetonitrilo para dar el compuesto 6;
- (2) hidrolizar el compuesto 6 para dar el ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (7);
- (3) convertir el compuesto 7 en el disulfuro 8 mediante reacción con metilmetantiolsulfonato;
- (4) convertir el compuesto 8 en su éster de N-hidroxisuccinimida 9; y
- (5) hacer reaccionar el compuesto 9 con N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, o N-metilalanina racémica para dar el compuesto 10 que contiene N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina, o N-metilalanina racémica.

20 De acuerdo con la presente invención, los compuestos de la fórmula III también son novedosos:



en donde:

Y_2 representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico

que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo cíclico lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l , m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

Z_2 es SR o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

Los compuestos de la fórmula III pueden ser elaborados fácilmente por alguien con experiencia en la técnica a través de métodos análogos a aquellos descritos en la presente para elaborar los compuestos 10 y 15.

Citotoxicidad In Vitro de Maitansinoides

La citotoxicidad in vitro de los maitansinoides de la presente invención se muestra en la FIG. 4. los nuevos maitansinoides (4c, 4e) que tienen un enlace de disulfuro impedido son altamente potentes hacia las líneas celulares probadas. Por lo tanto, 4c elimina células A-375 y células SK-Br-3 con valores IC_{50} de 1.5×10^{-11} M y 7.0×10^{-12} M respectivamente. De manera similar, el maitansinoide 4e también es altamente potente con valores IC_{50} de 3.2×10^{-11} M y 9.0×10^{-12} M hacia las células A-375 y SK-Br-3 respectivamente. La comparación de la potencia in vitro del maitansinoide 4a que contiene tiol impedido de la presente invención con aquella del maitansinoide 1 previamente descrito (Fig. 4c, d), indica que los nuevos maitansinoides son de 20 hasta 50 veces más potentes que los descritos con anterioridad.

Preparación de Agentes de enlace celular

La efectividad de los compuestos de la invención como agentes terapéuticos depende de la selección cuidadosa de un agente de enlace celular apropiado. Los agentes de enlace celular pueden ser de cualquier clase actualmente conocida, o que se lleguen a conocer e incluyen péptidos y no-péptidos. De manera general, estos pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales), linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas de transporte de nutriente (tales como transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia de enlace celular.

Ejemplos más específicos de agentes de enlace celular que se pueden utilizar incluyen:

- anticuerpos policlonales;
- anticuerpos monoclonales;
- fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', y F(ab')₂, Fv (Parham, J. Immunol. 131: 2895-2902 (1983); Spring et al. J. Immunol. 113:470-478 (1974); Nisondef et al. Arch. Biochem. Biophys. 89: 230-244 (1960));
- interferones (e.g. alfa, beta, gama);
- linfocinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;
- hormonas tales como insulina, TRH (hormona que libera), MSH (hormona de estimulación de melanocito), hormonas esteroides, tales como andrógenos y estrógenos;
- factores de crecimiento y factores de estimulación de colonia tales como EGF, TGF-alfa, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF y GM-CSF (Burgess, Immunology Today 5: 155-158 (1984));
- transferrina (O'Keefe et al. J. Biol. Chem. 260: 932-937 (1985)); y
- vitaminas, tales como folato.

Las técnicas de anticuerpo monoclonal permiten la producción de agentes de enlace celular extremadamente específicos en la forma de anticuerpos monoclonales específicos. Particularmente bien conocidas en la técnica son las técnicas para crear

anticuerpos monoclonales producidos mediante inmunización de ratones, ratas, hámsteres o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés tal como la célula objetivo intacta, antígenos aislados a partir de la célula objetivo, cuyo virus, virus completo atenuado, y proteínas virales tales como proteínas de recubrimiento virales. También se pueden utilizar células humanas sensibilizadas. Otro método para crear anticuerpos monoclonales es el uso de bibliotecas de fago de scFv (región variable de cadena sencilla), específicamente scFv humanas (ver por ejemplo, Griffiths et al, Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,885,793 y 5,969,108; McCafferty et al., WO 92/01047; Liming et al., WO 99/06587). Además, anticuerpos de superficie adicional descritos en Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,639,641 también pueden ser utilizados, como lo pueden ser los anticuerpos humanizados.

La selección del agente de enlace celular apropiado es un asunto de elección que depende de la población celular particular a la que se va a dirigir, aunque en general se prefieren los anticuerpos monoclonales humanos si está disponible uno adecuado.

Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo de murina IgG1 que se enlaza de manera específica al Antígeno CD33 {J. D. Griffen et al 8 Leukemia Res., 521 (1984)} y puede ser utilizado si las células objetivo expresan CD33 como en la enfermedad de leucemia mielogénica aguda (AML). De manera similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 es un murina IgG1, que se enlaza al antígeno CD19 en células B {Nadler et al, 131 J. Immunol. 244-250(1983)} y puede ser utilizado si las células objetivo son células B o células enfermas que expresan este antígeno tal como en la leucemia linfoblástica no de linfoma de Hodgke no crónica. En forma similar, el anticuerpo monoclonal, C242, que enlaza al antígeno CanAg, (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,552,293) puede ser utilizada para tratar tumores que expresan CanAg, tales como cánceres colorectal, pancreático y gástrico.

Adicionalmente, GM-CSF, el cual se enlaza a células mieloides se puede utilizar como agente de enlace celular para células enfermas a partir de leucemia mielogénica aguda. IL-2 que se enlaza a células T activadas puede ser utilizado para la prevención del rechazo de injerto de trasplante, para terapia y prevención de enfermedad de injerto-

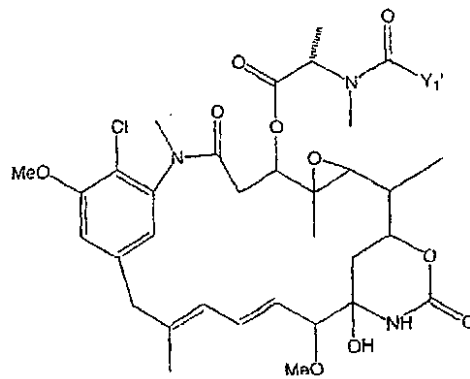
contra-huésped, y para el tratamiento de leucemia de células T aguda. MSH, el cual se enlaza a melanocitos, puede ser utilizado para el tratamiento de melanoma. El ácido fólico puede ser utilizado para activar el folato receptor expresado sobre tumores de ovarios y otros. El factor de crecimiento epidérmico puede ser utilizado para cánceres escamosos objetivo tales como cáncer de pulmón, de cabeza y de cuello. La somatostatina puede ser utilizada para neuroblastomas objetivo y otros tipos de tumor.

Los cánceres del seno y de los testículos pueden ser activados de manera exitosa con estrógeno (o análogos de estrógeno) o andrógeno (o análogos de andrógeno) respectivamente como agentes de enlace celular.

Producción de Conjugados Citotóxicos

La presente invención proporciona también un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente de enlace celular, en donde el agente de enlace celular esta enlazado al maitansinoide utilizando la funcionalidad tiol o disulfuro que está presente en el grupo acilo de una cadena lateral de aminoácido acilatado encontrada en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxilo o C-20 desmetilo del maitansinoide, y en donde el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácido acilatado tiene su funcionalidad tiol o disulfuro ubicada en el átomo de carbono que tiene uno o dos sustituyentes, dichos sustituyentes que son CH₃, C₂H₅ alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de por lo menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

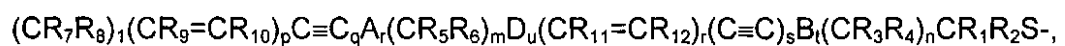
Un conjugado de agente de enlace celular preferido comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente de enlace celular, en donde el maitansinoide está representado por la fórmula 4₁:



41'

en donde:

Y_1' representa



en donde:

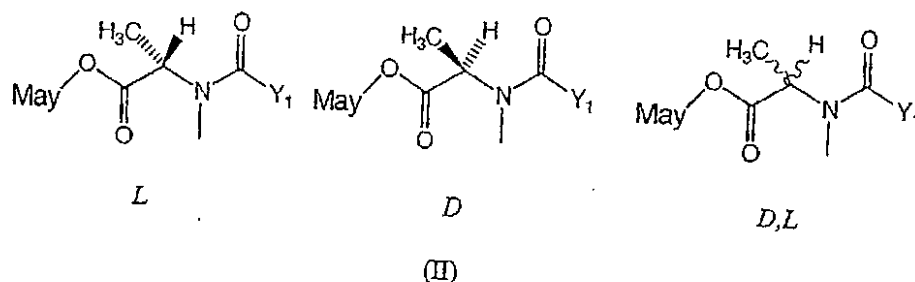
A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

$R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{11},$ y R_{12} son cada uno de manera independiente H, CH_3, C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenil sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y

$l, m, n, o, p, q, r, s,$ y t son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en ningún momento.

De manera preferible, R_1 es H y R_2 es metilo, o R_1 y R_2 son metilo.

Un conjugado de agente de enlace celular más preferido comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente de enlace celular, en donde el maitansinoide está representado por la fórmula (II-L), (II-D), o (II-D,L):



en donde:

Y_1 Y representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$, en donde:

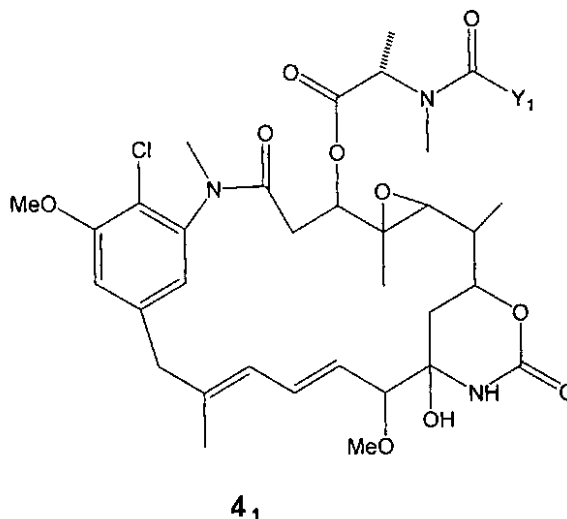
R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5 alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

l , m y n son cada uno de manera independientemente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

May representa un maitansinoide que tiene la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxí o C-20 desmetilo.

Incluso tiene mayor preferencia un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular, en donde el maitansinoide es representado por la fórmula 4₁:



en donde los sustituyentes son como se definieron para la fórmula (II) anterior.

Especialmente preferidos son cualquiera de los compuestos antes descritos, en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H, l y m son cada una 1, y n es 0; y aquellos en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n

es 0.

Además, se prefiere el esteroisómero de L-aminoácido.

Los conjugados citotóxicos representativos de la invención son anticuerpo/maitansinoide, fragmento de anticuerpo/maitansinoide, factor de crecimiento epidérmico (EGF)/maitansinoide, hormona de estimulación de melanocito (MSH)/maitansinoide, hormona de estimulación de tiroide (TSH)/maitansinoide, somatostatina/maitansinoide, folato/maitansinoide, estrógeno/maitansinoide, análogo de estrógeno/maitansinoide, andrógeno/maitansinoide, y análogo de andrógeno/maitansinoide.

El maitansinoide que contiene tiol se hace reaccionar con un agente de enlace celular adecuadamente modificado para producir conjugados citotóxicos. Esos conjugados pueden ser purificados mediante filtración de gel, cromatografía de intercambio de ión, o por medio de HPLC.

Los esquemas para la preparación de conjugados a partir de maitansinoides que contienen grupo sulfhidrilo se muestran en la Figura 5. De manera más específica (Fig. 5a, b), una solución de un anticuerpo en regulador de pH acuoso se puede incubarse con un exceso molar de un agente de modificación de anticuerpo tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP, 3a) para introducir grupos ditiopiridilo (Fig 5a) o con N-succinimidil-4-(2-piridilditio) butanoato (SPDB, 3b) para introducir grupos ditiopiridilo (Fig 5b). El anticuerpo modificado se hace reaccionar después con los maitansinoides que contienen tiol (tales como 4a o 4b) para producir un conjugado de anticuerpo enlazado por disulfuro-maitansinoide. El conjugado maitansinoide-anticuerpo puede ser purificado mediante filtración de gel.

De manera alternativa, el anticuerpo puede ser incubado con un exceso molar de un agente de modificación de anticuerpo tal como 2-iminotiolano para introducir grupos sulfhidrilo. El anticuerpo modificado se hace reaccionar después con los maitansinoides que contienen disulfuro apropiados para producir un conjugado de anticuerpo enlazado por disulfuro-maitansinoide. El conjugado maitansinoide-anticuerpo puede ser purificado después mediante filtración de gel.

El número de moléculas de maitansinoide (denotadas con w en las Figuras 5a hasta 5d) enlazadas por molécula de anticuerpo se puede determinar a través de la medición espectrofotométrica la relación de absorbancia a 252 nm y 280 nm. Un promedio de 1-10 moléculas de maitansinoide/molécula de anticuerpo se puede enlazar a través de este método. El número promedio preferido de moléculas de maitansinoide enlazadas por molécula de anticuerpo es 2-5, y el más preferido es 3-4.5.

De manera alternativa, una solución de un anticuerpo en regulador de pH acuoso puede ser incubada con un exceso molar de un agente de modificación de anticuerpo tal como N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxilato (SMCC, 26) para introducir grupos maleimido (Fig. 5c), o con N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB, 27) para introducir grupos de yodoacetilo (Fig.5d). El anticuerpo modificado se hace reaccionar después con los maitansinoides que contienen tiol (tales como 4a o 4b) para producir un conjugado de anticuerpo enlazado por tioéter-maitansinoide. El conjugado de maitansinoide-anticuerpo puede ser purificado después mediante filtración de gel.

El número de moléculas de maitansinoide enlazadas por molécula de anticuerpo se puede determinar mediante análisis espectrofotométrico como se describió antes.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para hacer un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular que comprende hacer un maitansinoide purificado por medio de uno de los métodos antes descritos, y hacer reaccionar el maitansinoide purificado con un agente de enlace celular que comprende un grupo ditio o sulfhidrilo reactivo. De preferencia, el grupo ditio reactivo es un grupo ditiopiridilo o un grupo ditiopiridilo sustituido. De manera especialmente preferible, el grupo ditio reactivo comprende un grupo nitropiridilditio o dinitropiridilditio.

En otro método, el maitansinoide purificado se hace reaccionar con un agente de enlace celular que comprende un grupo maleimido o un grupo haloacetilo.

Los conjugados de agentes de enlace celular con fármacos de maitansinoide de la invención se pueden evaluar por medio de su habilidad para suprimir la proliferación de varias líneas celulares indeseables in vitro (Fig. 6). Por ejemplo, líneas celulares tales

como la línea de carcinoma de colon humano COLO 205, la línea celular de melanoma humano A-375, la línea celular de leucemia mieloide humana HL60 se pueden utilizar para la determinación de la citotoxicidad de esos conjugados. Las células que se van a evaluar pueden ser expuestas a los compuestos durante 24 horas y las fracciones sobrevivientes de células medidas en pruebas directas a través de métodos conocidos. Los valores IC_{50} pueden ser calculados después a partir de los resultados de las pruebas.

La potencia in vitro y la especificidad objetivo de los conjugados anticuerpo-maitansinoide de la presente invención se muestran en las Figs. 6, 10 y 12. Por lo tanto, la Fig 6 muestra que ambos huC242-DM3 y huC242-DM4 son altamente potentes en la eliminación de células COLO 205 positivas a antígeno, con valores IC_{50} de 1.3×10^{-11} M y 1.1×10^{-11} M respectivamente. En contraste, Las células A-375 negativas a antígeno son aproximadamente 500-veces menos sensibles en demostrar que los conjugados de maitansinoide de la presente invención son altamente potentes y específicos. De manera similar, las Figs 10 y 12 demuestran la alta potencia y especificidad objetivo de los conjugados de los maitansinoides de la presente invención, con los anticuerpos MY9-6 y anti-B4 respectivamente.

La eficacia anti-tumoral in vivo de los conjugados de anticuerpos con los maitansinoides que contienen tiol impedido de la presente invención fue comparada con la de aquellos conjugados de maitansinoide previamente descritos en diferentes modelos de tumor humano en ratones. En el primer modelo (Fig. 7), ratones SCID que tienen xenógrafos HT-29 de tumor de colon humano subcutáneo establecido fueron tratados con el conjugado de anticuerpo (huC242-DMI) del maitansinoide DM1 previamente descrito, o con los dos nuevos conjugados de maitansinoide (huC242-DM3, huC242-DM4). El tratamiento con huC242-DMI resultó en un retraso del crecimiento de tumor de 18 días. En contraste, los nuevos agentes fueron significativamente más eficaces, con retrasos de crecimiento de tumor de 28 días para huC242-DM3 y 36 días para huC242-DM4.

En el segundo modelo (Fig. 8), ratones que tienen xenógrafos COLO 205 de tumor de colon subcutáneo establecido fueron tratados con el conjugado de anticuerpo (huC242-DMI) del maitansinoide DM1 previamente descrito, o con los dos nuevos

conjugados de maitansinoide (huC242-DM3, huC242-DM4). El tratamiento con huC242-DM1 no resultó en regresión del tumor y dio un retraso de crecimiento del tumor de 20 días. En contraste, los nuevos agentes fueron significativamente más eficaces. La regresión de tumor completa que duró 45 días se logró en el grupo tratado con huC242-DM3. huC242-DM4 fue incluso más eficaz resultando en curaciones de todos los ratones tratados.

En el tercer modelo (Fig. 9), los ratones que tienen xenógrafos HL60 de leucemia mieloide humana subcutáneos establecidos fueron tratados con el conjugado de anticuerpo (MY-9-6-DM1) del maitansinoide DM1 previamente descrito, o con los dos nuevos conjugados de maitansinoide (MY9-6-DM3, MY9-6-DM4). El tratamiento con MY9-6-DM1 no resultó en regresión del tumor y dio un retaso de crecimiento del tumor de 5 días. En contraste, los nuevos agentes fueron significativamente más eficaces. Dieron como resultado regresión del tumor. Ambos MY9-6-DM3 y MY-9-6-DM4 dieron retrasos de crecimiento del tumor de más de 20 días.

En el cuarto modelo (Fig. 11), un maitansinoide de la presente invención (huMY9-6-DM4) fue comparado directamente con aquel de un conjugado del maitansinoide previamente descrito (huMY9-6-DM1) en un modelo de xenógrafo subcutáneo, establecido con células HL-60. En una dosis equivalente, el tratamiento con el conjugado de la actual invención, MY9-6-DM4, resulta en la regresión completa del tumor que dura 85 días. En contraste, el conjugado del maitansinoide previamente descrito es mucho menos activo con un retraso de crecimiento de tumor tan solo aproximadamente 48 días.

En la quinta modalidad (Fig. 13a), un conjugado de un maitansinoide de la presente invención con anticuerpo huB4 muestra alta actividad anti-tumoral de una manera dependiente de la dosis en un modelo de tumor Ramos subcutáneo. Las regresiones de tumor completas y curaciones se lograron en dosis que no son tóxicas. (Fig. 13a, b).

Los resultados a partir de los cinco experimentos de eficacia demuestran que los maitansinoides estéricamente impedidos que contienen tiol de la presente invención dan los conjugados de agente de enlace celular con actividad anti-tumoral bastante

mejorada en comparación con los conjugados de maitansinoide-agente de enlace celular previamente descritos.

Composiciones y métodos de uso

5

La presente invención proporciona las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad efectiva de cualquiera de los maitansinoide-agentes de enlace celular de la presente invención, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

La presente invención proporciona también métodos de tratamiento que comprenden administrar a un sujeto que necesita de tratamiento una cantidad efectiva de cualquiera de los conjugados antes descritos.

15

De manera similar, la presente invención proporciona un método para inducir la muerte celular en poblaciones de células seleccionadas que comprende por en contacto las células o tejidos objetivo en contacto con una cantidad efectiva de una gente citotóxico que comprende cualquiera de los maitansinoide-agentes de enlace celular de la presente invención, una sal o solvato de la misma. Las células objetivo son células a las cuales puede unirse el agente de enlace celular.

20

Si se desea, otros agentes activos, tales como otros agentes anti-tumorales, pueden ser administrados junto con el conjugado.

Los portadores, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados con bien conocidos y pueden ser determinados por aquellos con experiencia en la técnica según lo garantice la situación clínica.

25

Ejemplos de portadores, diluyentes y/o excipientes incluyen: (1) solución salina regulada en su pH con fosfato de Dulbecco, pH aproximadamente 7.4, que contiene o no contiene aproximadamente 1 mg/ml hasta 25mg/ml de albúmina de suero humano, (2) 0.9% de solución salina (0.9% p/v NaCl), y (3) 5% (p/v) dextrosa; y puede contener también un antioxidante tal como astriptamina y un agente estabilizante tal como Tween 20.

El método para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionada se puede practicar in vitro, in vivo, o ex vivo.

Ejemplos de usos in vitro incluyen tratamientos de médula ósea análogos antes de su trasplante en el mismo paciente a fin de eliminar células enfermas o malignas: tratamientos de médula ósea antes de su trasplante antes de eliminar las células T competentes y evitar la enfermedad injerto-contra-huésped (GVHD); tratamientos de cultivos celulares a fin de eliminar todas las células excepto para variantes deseadas que no expresan el antígeno objetivo; o para eliminar variantes que expresan el antígeno indeseable.

Las condiciones de uso in vitro no-clínico son determinadas con facilidad por alguien con experiencia ordinaria en la técnica.

Ejemplos de uso ex vivo clínico son para remover células tumorales o células linfóides a partir de la médula ósea antes del trasplante análogo en tratamiento del cáncer o en tratamiento de enfermedad autoinmune, o para remover células T y otras células linfoides a partir de médula ósea o tejido autólogo o alogénico antes del trasplante para evitar GVHD. El tratamiento se puede llevar a cabo como sigue.

La médula ósea es cultivada a partir de un paciente u otros individuos y después incubada en un medio que contiene suero al cual se agrega el agente citotóxico de la invención, las concentraciones varían desde aproximadamente 10 μ M hasta 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis, se determinan fácilmente por parte de alguien con experiencia en la técnica. Después de la incubación las células de médula ósea son lavadas con un medio que contiene suero y devueltas al paciente en forma intravenosa de acuerdo con métodos conocidos. En circunstancias en donde el paciente recibe otro tratamiento tal como un curso de quimioterapia de ablación o irradiación corporal total entre el momento del cultivo de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de médula tratadas son almacenadas congeladas en nitrógeno líquido utilizando equipo médico estándar.

Para el uso in vivo clínico, el agente citotóxico de la invención será suministrado como una solución o un polvo liofilizado que son probados para esterilidad y para niveles de endotoxina. Los ejemplos de protocolos adecuados de administración de conjugado son como sigue. Los conjugados son administrados en forma semanal durante 4 semanas como un bolo intravenoso cada semana. La dosis de bolo es suministrada en 50 hasta 1000 ml de solución salina normal a la cual pueden agregarse 5 hasta 10 ml de albúmina de suero humano. Las dosis serán de 10 μ g hasta 2000 mg por administración, vía intravenosa (varían desde 100 ng hasta 20 mg/kg por día). Después de cuatro semanas de tratamiento, el paciente puede continuar recibiendo tratamiento en una base

10 semanal. Los protocolos clínicos específicos con respecto a la ruta de administración, excipientes, diluyentes, dosis, tiempos, etc. pueden ser determinados por alguien con experiencia ordinaria en la técnica según lo garantice la situación clínica.

Ejemplos de condiciones médicas que pueden ser tratadas de acuerdo con los métodos in vivo o ex vivo de inducción de muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas incluyen la malignidad de cualquier tipo incluyendo, por ejemplo, cáncer del pulmón, seno, colon, próstata, riñón, páncreas, ovarios, y órganos linfáticos; enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide, y esclerosis múltiples; rechazos de injerto, tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante pulmonar, rechazo de trasplante cardíaco,

20 y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad injerto contra huésped; infecciones virales, tales como infección por CMV, infección por VIH, SIDA, etc.; e infecciones parasitarias, tales como giardiasis, amibiasis, esquistosomiasis, y otras como sean determinadas por alguien con experiencia en la técnica.

25 EJEMPLOS

Se ilustrará ahora la invención mediante referencia los siguientes ejemplos no limitantes. A menos que se establezca de otra manera, todos los porcentajes, relaciones, partes, etc., son en peso. Los ejemplos descritos a continuación son para los compuestos

en donde R_1 es H o CH_3 , R_2 es CH_3 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, I y m son cada una 1, y n es 0. Se pueden llevar a cabo síntesis similares para otros compuestos de la invención en donde R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5 , o alquilo superior, alquenilo, que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, o fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo; y en donde l, m y n son cada una enteros desde 1 hasta 5, y además, n también puede ser 0.

Todos los reactivos fueron adquiridos de Aldrich Chemical Co., New Jersey, u otras Fuentes comerciales. Maitansinol (11) fue preparado como se describió de manera previa (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica 6,333,410). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (^1H NMR) se adquirieron en un instrumento Bruker 400 MHz y los espectros de masa se obtuvieron en un instrumento Bruker Daltonics Esquire 3000 utilizando ionización de electroaspersión.

EJEMPLO 1

Síntesis de Maitansinoide 4b

Ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (7): Un matraz de 500 mL fu equipado con una barra de agitación y un embudo de adición de 150 mL. El sistema fue colocado bajo atmósfera de argón. 150 mL de tetrahidrofurano anhidro (THE) y 75 mL de 2.5 M n-BuLi en hexanos (18.7 mmol) se agregaron por medio de una cánula y la solución fue enfriada en un baño de hielo seco/acetona a $-78^\circ C$. Se agregó acetonitrilo (7.3 g, 9.4 mL, 18 mmol) por goteo a través de una jeringa durante aproximadamente 5 minutos. La reacción fue agitada durante 30 minutos, en tanto que se formó un precipitado de litio-acetonitrilo.

Se disolvió sulfuro de isobutileno (15 g, 17 mmol) en 100 mL de THF anhidro y se agregó por goteo durante aproximadamente 30 minutos a través del embudo de adición. El baño de enfriamiento fue retirado y se agitó la reacción durante 3 horas. El matraz fue enfriado en un baño de hielo/agua a medida que se agregaron 38 mL de 0.5 M HCl por medio de goteo. La capa de THF fue retenida y la capa acuosa fue lavada dos veces con 75 mL de acetato de etilo. Las capas de THF y acetato de etilo fueron combinadas,

secadas sobre aproximadamente 20 g de sulfato de sodio anhidro y transferidas a un matraz de 250 mL. El solvente fue removido por medio de evaporación giratoria bajo vacío para dar el crudo 6. Se agregaron etanol (30mL) y una barra de agitación. Los contenidos fueron agitados a medida que se agregó lentamente una solución 8.0 g NaOH en 30 mL agua desionizada. El matraz fue equipado con un condensador de reflujo y colocado bajo atmósfera de argón. La reacción fue sometida a reflujo durante la noche y después enfriada a temperatura ambiente. Se agregó agua desionizada (60mL) y la mezcla fue extraída dos veces con porciones de 25 mL de una mezcla 2:1 de acetato de etilo y hexano. La capa acuosa fue acidificada hasta pH 2 con HCl concentrado y después extraída tres veces con porciones de 75 mL de acetato de etilo. Las capas orgánicas fueron secadas sobre Na₂SO₄ anhidro y el solvente fue removido mediante evaporación giratoria bajo vacío para dar 10 g de producto 7 (39% de rendimiento). El material fue utilizado senpurificación adicional. ¹H NMR (CDCl₃): δ81. 38 (6H, s), 1.87-1.93 (2H, m), 2.08(1H, s), 2.51-2.57 (2H, m).

Ácido 4-metil-4-(metilditio)pentanoico (8): Una solución de ácido mercaptopentanoico 7 (6.0 mL, 40 mmol) se disolvió en 50 mL de agua desionizada en un matraz de 250 mL. La solución fue agitada magnéticamente a medida que se agregó carbonato de sodio (6.4 g, 60 mmol) al ácido a una velocidad que no ocasionaría espumación excesiva. El matraz fue equipado con un embudo de adición de 100mL, el cual fue cargado con una solución de metil metantiolsulfonato (7.5 g, 60 mmol) disuelta en 30 mL de etanol al 100% destilado en alambique de vidrio. El matraz fue enfriado en un baño de hielo/agua y el sistema fue mantenido bajo una atmósfera de de argón. La solución de metil metantiolsulfonato fue agregada al matraz tan rápido como fue posible pero sin causar espumación excesiva. El baño de enfriamiento fue removido y la mezcla de reacción fue agiotada durante 3 horas adicionales. El solvente fue retirado mediante evaporación giratoria bajo vacío, hasta que quedaron aproximadamente 20 mL. Después de esto se agregaron 10 mL de bicarbonato de sodio saturado y 30 mL de agua desionizada. La mezcla fue lavada tres veces con porciones de 25 mL de acetato de etilo en un embudo de separación. La capa acuosa fue ajustada hasta aproximadamente pH 2

con 5 M HCl y después fue extraída dos veces con porciones de 120 mL de acetato de etilo. las capas orgánicas fueron combinadas y lavadas con 20 mL de una solución compuesta de NaCl saturado y 1M HCl en una relación de 4:1. la capa orgánica fue secada después sobre 14 g de sulfato de sodio anhidro y el solvente fue retirado por medio de evaporación giratoria bajo vacío para dar 5.4 g de producto 8 (70% de rendimiento). El material puede ser tomado para la siguiente etapa sin purificación adicional. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.54 (6H, s), 2.15-2.21 (2H, m), 2.64 (3H, s), 2.69-2.72 (2H, m). MS ($\text{M}+\text{Na}^+$) calc.: 217.0, encontrado: 217.1

N-Hidroxisuccinimidil-4-metil-4-(metilditio)pentanoato (9):

Ácido metilditiopentanoico 8 (3.0 g, 15 mmol) fue disuelto en 20 mL de cloruro de metileno y agitado magnéticamente a mitad que se agregó N-hidroxisuccinimida (2.65 g, 23 mmol) seguida por clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC, 4.4 g, 23 mmol). La mezcla fue agitada bajo una atmósfera de argón durante 2 horas. La mezcla de reacción fue vertida en un embudo de separación de 125 mL, se agregaron 40 mL de acetato de etilo y la solución fue lavada dos veces con porciones de 20 mL de 50 mM regulador de pH de fosfato de potasio, pH 6.0, y una vez con 12 mL cloruro de sodio saturado. La capa orgánica fue secada sobre 14 g de Na_2SO_4 anhidro y el solvente fue removido por medio de evaporación giratoria bajo vacío para dar 4.0 g de producto 9 (90 % de rendimiento), el cual fue utilizado sin purificación adicional. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.30 (6H, s), 2.00-2.05 (2H,m), 2.39 (3H, s), 2.68-2.72 (2H,m), 2.73-2.83 (4H,m). MS($\text{M} + \text{Na}^+$) calc.: 314.0, encontrado: 314.1

N-metil-N-(4-metil-4-metilditio-1-oxopentil)-L-alanina (10): N-Metil-L-alanina (2.85 g, 18.0 mmol) fue disuelta en 50 mL de una solución 1:1 de dimetoxietano y agua desionizada en un matraz de 125 mL equipado con una barra de agitación magnética. Se agregó trietilamina (6.9 g, 36 mmol) y la solución fue agitada de manera vigorosa a medida que 9 (5.44 g, 18 mmol) se disolvió en 40mL de la misma mezcla de solvente mediante goteo durante aproximadamente 5 minutos. Después de 2 horas la mezcla de reacción fue concentrada hasta aproximadamente 40 mL mediante evaporación giratoria bajo vacío, después se agregaron 10 mL de agua desionizada y 1 M HCl para dar a pH

de aproximadamente 2. La mezcla fue vertida en un embudo de separación y extraída dos veces con porciones de 50 mL de acetato de etilo. Las capas orgánicas fueron combinadas y después lavadas con 7 mL solución de cloruro de sodio saturada. La capa orgánica fue secada sobre 8.0 g de Na₂SO₄ anhidro y el solvente fue removido mediante evaporación giratoria bajo vacío. El residuo fue recolectado en un volumen mínimo de acetato de etilo y purificado por medio de cromatografía sobre sílice (sílice: grado de intermitencia de 40 micras, lecho de sílice: 24 x 3.0 cm, fase móvil: hexanos:acetato de etilo:ácido acético 50:48:2). Las fracciones que contienen el producto deseado fueron combinadas y el solvente fue removido bajo vacío. El ácido acético residual fue removido mediante disolución del residuo en un volumen mínimo de acetato de etilo y precipitando el producto por medio de la adición rápida aunque por goteo de hexano con agitación. El hexano fue agregado hasta que el producto ya no fue detectado en el sobrenadante por medio de análisis TLC. El precipitado fue secado al vacío durante 4 horas para dar 2.2 g de producto 10 (51% de rendimiento). ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.32 (6H, s), 1.42 (3H, d, J = 7 Hz), 1.90-97 (2H,m), 2.40 (3H, s), 2.42-2.49 (2H,m), 2.9 (3H, s), 5.15(1H, q, J= 7 Hz). MS (M +Na⁺) calc.: 302.1, encontrado: 302.0.

N"-deacetil-N"-(4-metil-4-metilditio-1-oxopentil)maitansina (L-DM4-SMe, 4e).

Una solución de maitansinol (11,25 mg, 0.44 mmol) y N-metil-N-(4-metil-4-metilditio-1-oxopentil)-L-alanina (10,42.0 mg, 0.177 mmol) en 3 mL de diclorometano fue agitada magnéticamente bajo una atmósfera de argón a medida que se agregó una solución de dicianhidrido de N,N'-dimetil-4-metil-4-metilditio-1-oxopentil (DCC, 57.1 mg, 0.277 mmol) en 0.67 mL de diclorometano. Después de 1 minuto se agregó una solución de 1 M ZnCl₂ éter de dietilo (0.03 mL, 0.03 mmol). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas y después se agregaron 5 mL de acetato de etilo y la mezcla fue filtrada al vacío a través de papel filtro de curso. El filtrado fue lavado con 2 mL de solución de bicarbonato de sodio saturada seguida por 1 mL de solución de cloruro de sodio saturada. La capa orgánica fue secada sobre 2 g de sulfato de sodio anhidro. Y el solvente fue removido bajo vacío y el residuo fue purificado mediante cromatografía de sílice utilizando una mezcla de diclorometano y metanol para remover el maitansinol sin reaccionar. Las fracciones que contienen el

producto deseado fueron combinadas y el solvente fue removido bajo vacío para dar una mezcla de diastereómeros 4e y 4f. El residuo fue recolectado en un volumen mínimo de acetato de etilo y purificado en una columna de 50 cm por 250 cm, 10 micron Diazem CN utilizando como fase móvil una mezcla de hexano, 2-propanol y acetato de etilo en una relación de 68:8:24. La velocidad de flujo fue de 118 mL/min. Bajo esas condiciones el producto deseado 4e eluido con un tiempo de retención de 11 minutos y el diastereómero indeseable 4f tuvo un tiempo de retención de 19 minutos. Las fracciones que contiene el producto deseado fueron combinadas y el solvente fue removido bajo vacío para dar 12.0 mg de producto 4e (36% de rendimiento). ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.80 (3H, s), 1.28-1.36 (13H, m), 1.42-1.46 (2H, m), 1.53-1.63 (2H, m), 1.64 (3H, s), 1.75-1.85 (1H, m), 1.90-2.10 (1H, m), 2.18 (1H, dd, J=3 Hz y 14 Hz), 2.31 (3H, s), 2.40-2.49 (1H, m), 2.50-2.65 (1H, m), 2.85 (3H, s), 3.04 (1H, d, J=9 Hz), 3.11 (1H, d, J=11 Hz), 3.23 (3H, s), 3.35 (3H, s), 3.49 (1H, d, J=9 Hz), 3.63 (1H, d, J=12 Hz), 3.98 (3H, s), 4.27 (1H, t, J=10 Hz), 4.79 (1H, dd, J=3 Hz y 12 Hz), 5.41 (1H, q, J=7 Hz), 5.66 (1H, dd J=9 Hz y 15 Hz), 6.21 (1H, s), 6.42 (1H, dd, J=11 Hz y 15 Hz), 6.65 (1H, d, J=1.5 Hz), 6.73 (1H, d, J=11 Hz), 6.81 (1H, d, J=1.5 Hz). Alta resolución MS (M +1) calc.: 826.3174, encontrado: 826.3150.

N3-deacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)maitansina (L-DM4,4b). El disulfuro 4e anterior (12 mg, 0.015 mmol) fue disuelto en 1.0 mL de 1:1 acetato de etilo:metanol. Se agregó después una solución de ditiotreitolo (18 mg, 0.117 mmol) en 0.50 mL de 50 mM regulador de pH de fosfato, pH 7.5. La solución fue agitada magnéticamente bajo una atmósfera de argón durante 3 horas, después se agregó 1 mL de 200 mM regulador de pH de fosfato, pH 6.0, y la mezcla fue extraída tres veces con porciones de 2 mL de acetato de etilo. Las capas orgánicas fueron combinadas y lavadas con 1 mL de solución de cloruro de sodio saturada, secadas después sobre 1 g de sulfato de sodio anhidro. El solvente fue removido bajo vacío y el residuo fue recolectado en un volumen mínimo de acetato de etilo y purificado sobre una columna de 50 cm x 250 cm, 10 micron DiazemTM CN utilizando como fase móvil una mezcla de hexano, 2-propanol y acetato de etilo a una relación de 70:8:22. La velocidad de flujo fue de 22 mL/min. El producto deseado 4b eluido con un tiempo de retención de 10 minutos. Las fracciones

que contienen 4b puro fueron combinadas y el solvente fue removido bajo vacío para dar 11 mg de 4b (97% de rendimiento). ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.80 (3H, s), 1.19-1.23 (1H, m), 1.28-1.36 (12H, m), 1.42-1.46 (2H, m), 1.53-1.63 (2H, m), 1.64 (3H, s), 1.75-1.85 (1H, m), 1.90-2.10 (1H, m), 2.18 (1H, dd, J=3 Hz y 14 Hz), 2.40-2.49 (1H, m), 2.50-2.65 (2H, m), 2.88 (3H, s), 3.04 (1H, d, J=9 Hz), 3.11 (1H, d, J=11 Hz), 3.23 (3H, s), 3.35 (3H, s), 3.49 (1H, d, J=9 Hz), 3.63 (1H, d, J=12 Hz), 3.98 (3H, s), 4.27 (1H, t, J=10 Hz), 4.79 (1H, dd, J=3 Hz y 12 Hz), 5.41 (1H, q, J=7 Hz), 5.66 (1H, dd, J=9 Hz y 15 Hz), 6.21 (1H, s), 6.42 (1H, dd, J=11 Hz y 15 Hz), 6.65 (1H, d, J=1.5 Hz), 6.73 (1H, d, J=11 Hz), 6.81 (1H, d, J=1.5 Hz). Alta resolución MS ($\text{M} + \text{Na}^+$) calc.: 802.3101, encontrado: 802.3116.

EJEMPLO 2

Síntesis de Maitansinoide 4a

Ácido 4-Metilditio-pentanoico (13): Una solución de ácido 4-mercaptopentanoico (12, 16.6 g, 124 mmol) fue disuelta en 350 mL de agua desionizada en un matraz de 500 mL. La solución fue agitada magnéticamente a medida que se agregó carbonato de sodio (19.7 g, 186 mmol) al ácido a una velocidad que no ocasionaría espumación excesiva. El matraz fue equipado con a embudo de adición de 250 mL, el cual fue cargado con a solución de metil metantiolsulfonato (23.4 g, 186 mmol) disuelta en 220 mL de etanol al 100% destilado en alambique de vidrio. El matraz fue enfriado en un baño de hielo/agua y el sistema fue mantenido bajo una atmósfera de argón. La solución de metil metantiolsulfonato fue agregada por goteo al matraz tan rápido como fue posible aunque a una velocidad para evitar la espumación excesiva. El baño de enfriamiento fue retirado y se agitó la reacción durante 2 horas adicionales. El solvente fue removido mediante evaporación giratoria bajo vacío, hasta que quedaron aproximadamente 250 mL. Después de lo cual se agregaron 30 mL de bicarbonato de sodio saturado solución y 50 mL de agua desionizada. La mezcla fue lavada tres veces con porciones de 200 mL de acetato de etilo en un embudo de separación. La capa acuosa fue ajustada a aproximadamente pH 2 con 5 M HCl y fue extraída dos veces con porciones de 400 mL de acetato de etilo.

23

Las capas orgánicas fueron combinadas, después lavadas 60 mL de una mezcla 4:1 de solución de NaCl saturada y 1M HCl, después secadas sobre 50 g de sulfato de sodio anhidro, y finalmente, el solvente fue removido mediante evaporación giratoria bajo vacío para dar 10.2 g de producto 13 (45% de rendimiento). El material fue utilizado en la siguiente reacción sin purificación adicional. ^1H NMR δ 1.36 (3H, d, $J = 7$ Hz), 1.84-1.95 (H,m), 1.85-2.56 (1H,m), 2.42 (3H, s), 2.53 (2H, t, $J = 7$ Hz), 2.85-2.95 (1H,m), MS (M +Na+) calc.: 203.3, encontrado: 203.2.

N-Hidroxisuccinimidil-4-metilditio-pentanoato (14): Ácido 4-metilditio-pentanoico (13, 0.75 g, 4.16 mmol) fue disuelto en 7.0 mL de cloruro de metileno y agitado magnéticamente en tanto que se agregó N-hidroxisuccinimida (0.526 g, 4.57 mmol) seguida por clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (0.877 g, 4.57 mmol). La mezcla fue agitada bajo una atmósfera de argón durante 2.5 horas, vertida después en un embudo de separación 60 mL que contiene 20 mL de acetato de etilo. La solución resultante fue lavada dos veces con porciones de 15 mL de 50 mM regulador de pH de fosfato de potasio, pH 6.0, y una vez con 5 mL de cloruro de sodio saturado. La capa orgánica fue secada sobre 8 g de Na_2SO_4 anhidro y el solvente fue removido mediante evaporación giratoria bajo vacío para dar 1.15 g de producto 14 (87% de rendimiento), el cual fue utilizado para la siguiente reacción sin purificación adicional. ^1H NMR δ 1.48 (3H, d, $J = 7$), 2.06 (1H,m), 2.17 (1H,m), 2.55 (3H, s), 2.93 (2H, t, $J = 7$), 2.98 (4H, s), 3.15 (1H,m). MS (M +Na+) calc.: 304.1, encontrado: 304.0.

N-metil-N-(4-metilditio-1-oxopentil)-L-alanina (15): N-metil-L-alanina (0.64 g, 6.2 mmol) fue disuelta en 8 mL de una mezcla 1:1 de dimetoxietano y agua desionizada en un matraz de 125 mL equipado con una barra de agitación magnética. Se agregó trietilamina (0.841 g, 8.3 mmol) y el matraz fue sometido a agitación vigorosa a medida que se agregó por goteo una solución de 14 (1.0 g, 3.6 mmol) en 8 mL de la misma mezcla de solvente durante aproximadamente 5 minutos. Después de 2 horas, la mezcla de reacción fue concentrada hasta aproximadamente 3 mL mediante evaporación giratoria bajo vacío, después se agregaron 15 mL de agua desionizada y 1 M HCl para dar a pH de aproximadamente 2. La mezcla fue vertida en un embudo de separación de 60 mL y

extraída dos veces con porciones de 15 mL de acetato de etilo. Las capas orgánicas fueron combinadas, lavadas con 3 mL de solución de cloruro de sodio saturada, después secadas sobre 8.0 g de Na₂SO₄ anhidro, y finalmente, el solvente fue removido mediante evaporación giratoria bajo vacío. El residuo fue recolectado en un volumen mínimo de acetato de etilo y purificado mediante cromatografía de sílice (sílice: grado de intermitencia de 40 micras, lecho de sílice 24 x 3.0 cm, fase móvil hexanos:acetato de etilo:ácido acético 50:48:2). Las fracciones que contienen el producto deseado 15 fueron combinadas y el solvente fue removido bajo vacío. El ácido acético residual fue removido mediante disolución del residuo en un volumen mínimo de acetato de etilo y precipitando el producto mediante adición rápida aunque por goteo de hexano con agitación. El hexano fue agregado hasta que ya no se detectó producto en el sobrenadante mediante análisis TLC. El precipitado fue secado al vacío para dar 0.60 g de producto 15 (62% de rendimiento). ¹H NMR δ 1.35 (3H, d, J = 7), 1.41 (3H, d, J = 7), 1.94-2.03 (2H, m), 2.43 (3H, s), 2.50-2.55 (2H, m), 2.83-2.93 (1H, m), 2.98 (3H, s), 5.14 (1H, q, J= 7). MS (M +Na⁺) calc.: 288.1, encontrado: 288.1. RAUL

N²-deacetil-N^{2'}-(4-metilditio-1-oxopentil)maitansina (L-DM3-SMe, 4c): Una solución de Maitansinol (25 mg, 0.44 mmol) y 15 (42.0, 0.177 mmol) en 3 mL de diclorometano fue agitada magnéticamente bajo una atmósfera de argón as a medida que se agregó una solución de dicitclohexilcarbodiimida (DCC, 57.1 mg, 0.277 mmol) en 0.67 mL de diclorometano. Después de 1 minuto, a se agregó una solución de 1 M ZnCl₂ en éter de dietilo (0.03 mL, 0.03 mmol). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas, después se agregaron 5 mL de acetato de etilo y la mezcla fue filtrada al vacío a través de papel filtro de curso. El filtrado fue lavado con 2mL de solución de bicarbonato de sodio saturada seguida por 1 mL de solución de cloruro de sodio saturada. La capa orgánica fue secada sobre 2 g de sulfato de sodio anhidro, después el solvente fue removido bajo vacío. El residuo fue purificado mediante cromatografía de sílice utilizando una mezcla de diclorometano y metanol para remover el maitansinol que no reaccionó. Las fracciones que contienen el producto deseado fueron combinadas y el solvente fue removido bajo vacío para dar una mezcla de los diasterómeros 4c y 4d. El

residuo fue recolectado en un volumen mínimo de acetato de etilo y purificado en una columna de 50 cm por 250 cm, 10 micron Diazem™ CN utilizando como fase móvil una mezcla 68:8:24 de hexano, 2-propanol y acetato de etilo. La velocidad de flujo fue de 118mL/min. El producto deseado 4c eluido con un tiempo de retención de 11 minutos, el diasterómero indeseable 4d tuvo un tiempo de retención de 19 minutos. Las fracciones que contienen el producto deseado fueron combinadas y separadas del solvente bajo vacío para dar 12.0 mg de producto 4c (36% de rendimiento). ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.80 (3H, s), 1.19-1.23(1H, m), 1.28-1.36 (9H, m), 1.42-1.46(1H, m), 1.53-1.63 (2H, m), 1.64 (3H, s), 1.80-1.89 (1H, m), 1.90-2.09 (1H, m), 2.18 (1H, dd, J=3 Hz y 14 Hz), 2.32 (3H, s), 2.33-2.42 (1H, m), 2.49-2.62 (2H, m), 2.88 (3H, s), 3.04 (1H, d, J=9 Hz), 3.11 (1H, d, J=11 Hz), 3.23 (3H, s), 3.35 (3H, s), 3.49 (1H, d, J=9 Hz), 3.63 (1H, d, J=12 Hz), 3.98 (3H, s), 4.27 (1H, t, J=10 Hz), 4.79 (1H, dd, J=3 Hz y 12 Hz), 5.41(1H, q, J=7 Hz), 5.66 (1H, dd J=9 Hz y 15Hz), 6.21 (1H, s), 6.42 (1H, dd, J=11 Hz y 15 Hz), 6.65 (1H, d, J=1.5 Hz), 6.73 (1H, d, J=11 Hz), 6.81 (1H, d, J=1.5 Hz). MS (M + Na⁺) calc.: 834.3, encontrado: 834.3.

N²-deacetil-N²-(4-mercapto-1-oxopentil)maitansina (L-DM3, 4a): L-DM3-SMe (4c, 12 mg, 0.015 mmol) se disolvió 1.0 mL de una mezcla 1:1 de acetato de etilo y metanol. Se agregó después una solución de ditiotretitol (18 mg, 0.117 mmol) en 0.50 mL de 50 mM regulador de pH de fosfato, pH 7.5. La solución de reacción fue agitada magnéticamente bajo una atmósfera de argón durante 3 horas, después se agregó 1mL de 200 mM regulador de pH de fosfato, pH 6.0 y la mezcla fue extraída tres veces con porciones de 2 mL de acetato de etilo. Las capas orgánicas fueron combinadas y lavadas con 1 mL de solución de cloruro de sodio saturada, secadas después sobre 1 g de sulfato de sodio anhidro. El solvente fue removido bajo vacío y el residuo fue recolectado en un volumen mínimo de acetato de etilo y purificado en una columna de 50 cm x 250 cm, 10 micronDiazem™ CN utilizando como fase móvil una mezcla 70:8:22 de hexano, 2-propanol y acetato de etilo. La velocidad de flujo fue de 22 mL/min. El producto deseado eluido con un tiempo de retención de 10 min. Las fracciones que contienen el producto puro fueron combinadas y el solvente fue removido bajo vacío para dar 11 mg de producto 4a (97% de rendimiento). ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.80 (3H, s), 1.19-1.23 (1H, m),

76

1.28-1.36 (9H, m), 1.42-1.46 (1H, m), 1.53-1.63 (2H, m), 1.64 (3H, s), 1.80-1.89 (1H, m), 1.90-2.09 (1H, m), 2.18 (1H, dd, J=3 Hz y 14 Hz), 2.33-2.42 (1H, m), 2.49-2.62 (2H, m), 2.88 (3H, s), 3.04 (1H, d, J=9 Hz), 3.11 (1H, d, J=11 Hz), 3.23 (3H, s), 3.35 (3H, s), 3.49 (1H, d, J=9 Hz), 3.63 (1H, d, J=12 Hz), 3.98 (3H, s), 4.27 (1H, t, J=10 Hz), 4.79 (1H, dd, J=3 Hz y 12 Hz), 5.41 (1H, q, J=7 Hz), 5.66 (1H, dd J=9 Hz y 15 Hz), 6.21 (1H, s), 6.42 (1H, dd, J=11 Hz y 15 Hz), 6.65 (1H, d, J=1.5 Hz), 6.73 (1H, d, J=11 Hz), 6.81 (1H, d, J=1.5 Hz). MS: (M + Na⁺) calc.: 788.3, encontrado: 788.3.

EJEMPLO 3

Síntesis de Maitansinoide 4g, h (FIG. 3c).

R-1,3-Di-O-p-toluensulfonil-butano (17): A solución de R-(-)-1, 3-butandiol (16, 2.00 g, 22.22 mmol) en una mezcla de piridina seca (40 mL) y tolueno seco (60 mL), fue tratada con cloruro de p-toluenesulfonilo (12.70 g, 66.84 mmol) bajo argón a 0°C. Después de la agitación a 0°C durante 5 minutos seguida por agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, la mezcla fue evaporada bajo vacío, redisolta en acetato de etilo, y lavada con 0.1 M NaHCO₃ acuoso, seguido por NaCl saturado. Las capas orgánicas fueron secadas sobre MgSO₄, filtrada y el solvente fue evaporado.

La purificación mediante cromatografía sobre gel de sílice, fluyendo 1:2 (v/v) acetato de etilo/hexano dio 6.51 g (74%) del producto de título 17. R_f = 0.40 (1:1 EtOAc/hexano); ¹H NMR(CDCl₃) 7.76 (dd, 4H, J = 1.0, 8.0 Hz), 7.35 (dt, 4H, J = 0.4, 8.0 + 8.0 Hz), 4.70 (m, 1H), 4.03 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 2.46 (s, 6H), 1.92 (m, 2H), 1.26 (d, 3H, J = 6.3 Hz); ¹³C NMR 145.17, 133.00, 130.11, 128.12, 127.91, 76.28, 66.21, 36.08, 21.86, 21.06; MS: 420.99 (M + Na)⁺, 421.93 (M+1+Na)⁺.

S-4-O-Etilxantic-pentannitrilo (18): A solución de R-1,3-di-O-p-toluensulfonil-butano (17, 4.80 g, 12.06 mmol) en DMSO seco (50 mL) fue tratada con NaCN (0.65). Después de la agitación a temperatura ambiente bajo argón durante 18 horas, la mezcla de reacción fue diluida con acetato de etilo, lavada de manera sucesiva con 1.0 M de NaH₂PO₄ frío pH 7.5, agua y 1.0 M de NaH₂PO₄ pH 4.0. La capa orgánica fue separada y

27

secada sobre MgSO_4 , filtrada, y después evaporada para dar 2.63 g de crudo de R-3-O-p-toluensulfonil-pentannitrilo. MS 275.80 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺, 276.75 ($\text{M} + 1 + \text{Na}$)⁺. El producto fue utilizado directamente sin purificación adicional.

A la solución de crudo de R-3-O-p-toluensulfonil-pentannitrilo (2.63 g) en etanol (15mL) se agregó O-etilxantato de potasio (4.55 g) en etanol (50 mL). Después de agitación durante la noche bajo argón, la mezcla fue concentrada, diluida con acetato de etilo, y filtrada a través de una columna de sílice corta. El eluyente fue concentrado y purificado por medio de cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con 1:4 (v/v) EtOAc/hexano, para dar 1.54 g (63%, 2 etapas) del producto de título 18. $R_f = 0.40$ (1:4 EtAc/hexano). ^1H NMR (CDCl_3) 4.67 (dd, 2H, $J = 7.1, 14.2$ Hz), 3.86 (ddd, 1H, $J = 7.0, 14.0, 21.9$ Hz), 2.50 (t, 2H $J = 7.3 + 7.6$ Hz), 2.06 (m, 2H), 1.44 (m, 6H); ^{13}C NMR 213.04, 119.16, 70.28, 44.57, 32.10, 20.20, 15.21, 13.93; MS: 226.51 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺, 242.51 ($\text{M} + \text{K}$)⁺.

Ácido S-(+)-4-Metilditio-pentanoico (19): A una solución de S-4-O-Etilxantic-pentannitrilo (18, 1.95 g (9.61 mmol) en una mezcla de etanol (10 mL) y agua (150 mL) se agregaron 5.0 g de NaOH. La mezcla de reacción fue sometida a reflujo durante la noche bajo argón. La mezcla fue enfriada a temperatura ambiente y diluida con agua (150 ml) y extraída con 1:1 EtOAc/hexano (2 x 100ml). La capa acuosa fue acidificada con H_3PO_4 para un pH de 2.5-3.0 y extraída con EtOAc (6 x 75 ml). Las capas orgánicas fueron combinadas, secadas sobre MgSO_4 , filtradas y evaporadas hasta sequedad para dar el ácido S-4-mercaptopentanoico crudo. Este producto crudo fue utilizado directamente para la siguiente etapa sin purificación adicional.

A una solución de ácido S-4-mercaptopentanoico crudo (1.2 g) en una mezcla de etanol (50mL) y 0.5 M NaH_2PO_3 , pH 7.0 (75mL), se agregó mediante goteo metil metantiolsulfonato (1.47 g, 11.65 mmol) en 0.5 THF seco (5 mL) durante 45 minutos a 0°C. Después de la agitación bajo argón a 0°C durante 30 minutos, seguida por agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, la mezcla fue concentrada y extraída con diclorometano (2 x 50 ml). La capa acuosa fue acidificada con H_3PO_4 hasta pH 2.5-3.0 y extraída con EtOAc (4 x 100 ml). Las capas orgánicas fueron combinadas, secadas sobre MgSO_4 , filtradas y evaporadas. El residuo fue purificado mediante cromatografía sobre gel

de sílice, eluyendo con (1:100:400 HOAc/EtOAc/hexano) para dar 1.43 g (83%) del producto de título 19. R_f = 0.32 (1:100:400 HOAc/EtAc/hexano); ¹H NMR (CDCl₃) 2.91 (ddd, 1H, J = 6.8, 13.7, 20.5 Hz), 2.53 (t, 2H, J = 7.7 + 7.4 Hz), 2.42 (s, 3H), 1.94 (m, 2H), 1.36 (d, 3H, J = 6.8 Hz); ¹³C NMR 179.18, 45.35, 31.58, 30.73, 24.70, 21.05; MS: 202.92(M+Na)⁺, 203.91 (M+H+Na)⁺; [α] = 41.35 (c = 2, CH₃OH).

N-metil-N-[4-(S)-metilditio-1-oxopentyl]-S-alanina (15a): Ácido S-(+)-4-(Metilditio)-pentanoico (19) fue convertido en el ester de N-hidroxisuccinimidilo 20, a través del método descrito anteriormente para el compuesto. La reacción con N-metil-L-alanina a través del procedimiento antes descrito para el compuesto 15 dio 15a, (62 % de rendimiento). H¹ NMR δ 1.36 (3H, d, J = 7), 1.42 (3H, d, J = 7), 1.93-1.98 (2H, m), 2.40 (3H, s), 2.50-2.53 (2H, m), 2.90-2.95 (1H, m), 2.99 (3H, s), 5.14 (1H, q, J = 7), MS: (M + Na) calc. : 288.1, encontrado: 288.1

N2-deacetil-N2-(4-(S)-metilditio-1-oxopentil)maitansina (DM3-SMe, 4g, h): Maitansinol (11) fue acoplado con 15a, utilizando DCC y cloruro de zinc en diclorometano, como se describió antes para la síntesis de 4c. Se obtuvo una mezcla de 2 diastereómeros que tienen la porción N-metil-S-alanil (4g, S, S) y la porción N-metil-R-alanil (4h, R, S). Los diastereómeros fueron separados mediante HPLC en una columna de ciano Kromasil (4.6 mm x 250mm), utilizando una elución isocrática a una velocidad de flujo de 1 mL/min, con hexano:acetato de etilo:2-propanol (68:24:8, v/v/v). Bajo esas condiciones, el isómero 4g (S,S) eluido en 24.5 minutos. Espectro de masa: m/z 834.2 (M + Na)⁺. El pico para el otro isómero 4h (R, S) fue separado y eluido a 34.6 minutos. MS: m/z 834.2 (M + Na)⁺.

EJEMPLO 4

Síntesis de Maitansinoide 4k, 1 (FIG. 3d)

S-1,3-Di-O-p-toluensulfonil-butano 22: Una solución de S-(-)-1, 3-butandiol (21, 2.00 g (22.22 mmol) en una mezcla de piridina seca (40 mL) y tolueno seco (60mL) fue tratado con cloruro de p-toluensulfonilo (12.70 g, 66.84 mmol) bajo argón a 0°C. Después de la agitación a 0°C durante 5 minutos seguida por agitación a temperatura ambiente

durante 2 horas, la mezcla fue evaporada bajo vacío. El residuo fue redisolto en acetato de etilo, lavado con 0.1 M NaHCO_3 acuoso, y NaCl saturado. La capa orgánica fue separada, secada sobre MgSO_4 , filtrada y evaporada. El residuo fue purificado mediante cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con 1:2 acetato de etilo/hexano para dar 6.25 g (71%) del producto de título 22 $R_f = 0.40$ (1:1 EtOAc/hexano); ^1H NMR (CDCl_3) 7.76 (dd, 4H, $J = 1.0, 8.0\text{Hz}$), 7.35 (dt, 4H, $J = 0.4, 8.0 + 8.0\text{ Hz}$), 4.70 (m, 1H), 4.03 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 2.46 (s, 6H), 1.92 (m, 2H), 1.26 (d, 3H, $J = 6.3\text{ Hz}$); ^{13}C NMR 145.17, 133.00, 130.11, 128.12, 127.91, 76.28, 66.21, 36.08, 21.86, 21.06; MS: 420.99 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.

R-4-O-Etilxantic-pentannitrilo (23): Una solución de S-1,3-di-O-p-toluensulfonil-butano (22, 6.25 g (15.70 mmol) en 60 DMSO seco (50 mL) fue tratada con NaCN (0.85 g). La mezcla de reacción fue agitada bajo argón durante 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue diluida después con acetato de etilo, lavada de manera secuencial con 1.0 M de NaH_2PO_4 frío, pH 7.5, agua y 1.0 M de NaH_2PO_4 pH 4.0. La capa orgánica fue secada sobre MgSO_4 , filtrada, evaporada para dar 3.62 g crudo de S-3-O-p-toluensulfonil-pentannitrilo. El producto fue utilizado directamente sin purificación adicional.

A una solución de S-3-O-p-toluensulfonil-pentannitrilo crudo (3.62 g) en etanol (50 mL), se agregó O-etilxantato de potasio (5.72 g) en etanol (100 mL). Después de la agitación bajo argón durante la noche, la mezcla fue concentrada, diluida con acetato de etilo y filtrada a través de una columna corta de gel de sílice. El eluyente fue concentrado, y el residuo fue purificado mediante cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con 1:4 EtOAc/hexano para dar 2.0 g (62%, 2 etapas) del producto de título 23. $R_f = 0.40$ (1:4 EtAc/hexano). ^1H NMR (CDCl_3) 4.67 (dd, 2H, $J = 7.1, 14.2\text{ Hz}$), 3.86 (ddd, 1H, $J = 7.0, 14.0, 21.9\text{ Hz}$), 2.50 (t, 2H $J = 7.3 + 7.6\text{Hz}$), 2.06 (m, 2H), 1.44 (m, 6H); ^{13}C NMR 213.04, 119.16, 70.28, 44.57, 32.10, 20.20, 15.21, 13.93; MS: 226.51 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$, 242.51 ($\text{M} + \text{K}$) $^+$.

Ácido R-(-)-4-Metilditio-pentanoico (24): Una solución de R-4-O-Etilxantic-pentannitrilo (23, 2.0 g, 9.85 mmol) en una mezcla de etanol (10 mL) y 200 ml de agua fue tratada con NaOH (6.0 g). La mezcla de reacción fue sometida a reflujo durante la noche bajo argón. La mezcla fue diluida con agua (150 ml) y extraída con 1:1 EtOAc/hexano (2 x

100 ml). La capa acuosa fue acidificada con H_3PO_4 a pH 2.5-3.0 y extraída con EtAc (6 x 75 ml). Las capas orgánicas fueron combinadas, secadas sobre MgSO_4 , filtradas y evaporadas hasta sequedad para dar el ácido R-4-mercaptopentanoico crudo. Este producto crudo fue utilizado directamente para la siguiente etapa sin purificación adicional.

A una solución de 1.60 g del ácido R-4-mercaptopentanoico crudo en una mezcla de etanol (50 mL) y 0.5 M NaH_2PO_4 , pH 7.0 (75 mL) se agregó mediante goteo metil metantiolsulfonato (1.96 g, 15.53 mmol) en THF seco (7mL) sobre 45 minutos a 0°C . La mezcla de reacción fue agitada bajo argón a 0°C durante 30 minutos y después a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla fue concentrada y extraída con diclorometano (2 x 50 ml). La capa acuosa fue acidificada con H_3PO_4 a un pH 2.5-3.0 y extraída con EtOAc (4 x 100 ml). Las capas orgánicas fueron combinadas, secadas sobre MgSO_4 , filtradas y evaporadas. El residuo fue purificado mediante cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con 1:100:400 HOAc/EtOAc/hexano para dar 1.65 g (93%) del producto de título 24. $R_f = 0.32$ (1:100:400 HOAc/EtOAc/hexano); ^1H NMR (CDCl_3) 2.91 (ddd, 1H, $J = 6.8, 13.7, 20.4$ Hz), 2.53 (t, 2H, $J = 7.7 + 7.4$ Hz), 2.42 (s, 3H), 1.96 (m, 2H), 1.36 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz); ^{13}C NMR 179.46, 45.67, 31.91, 31.07, 25.02, 21.36; MS: 202.9 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 203.9 ($\text{M}+1+\text{Na}$) $^+$; $[\alpha] = -39.16$ ($c = 2$, CH_3OH).

N-metil-N-[4-(R)-metilditio-1-oxopentil]-S-alanina (15b): Ácido R-(+)-4-Metilditio-pentanoico (24) fue convertido en el éster N-hidroxisuccinimido 25, a través del método antes descrito para el compuesto 14. La reacción con N-metil-L-alanina a través del procedimiento antes descrito para el compuesto 15 dio 15b. MS: m/z ($\text{M} + \text{Na}$): calc.: 288.1, encontrado: 288.1

N^2 -deacetil- $\text{N}^{2'}$ -(4-(R)-metilditio-1-oxopentil)maitansina (DM3-SMe, 4k, 1): Maitansinol (11) fue acoplado con 15b, utilizando DCC y cloruro de zinc en diclorometano, como se describió antes para la síntesis de 4c. Se obtuvo una mezcla de 2 diasterómeros que tiene la porción de N-metil-S-alanilo (4k, S, R) y la porción de N-metil-R-alanilo (41, R, R). Los diasterómeros fueron separados mediante HPLC en una columna de ciano Kromasil (4.6 mm x 250 mm), utilizando una elución isocrática a una velocidad de flujo de

1 mL/min, con hexano:acetato de etilo:2-propanol (68:24:8, v/v/v). Bajo estas condiciones, el isómero 4k (S,R) eluido en 23.9 minutos. Espectro de masa: m/z 834.2 ($M + Na$)⁺. El pico para el otro isómero 4l (R, R) fue separado y eluido a 33.7 minutos. MS: m/z 834.2 ($M + Na$)⁺. +.

5

EJEMPLO 5a

Citotoxicidad In vitro de Maitansinoides y Conjugados Anticuerpo-Maitansinoide

La línea celular KB (ATCC CCL-17) es de origen epitelial humano. La línea celular SK-BR-3 (ATCC HTB-30) fue establecida a partir de un adenocarcinoma de seno humano. Las líneas celulares de tumor de colon humano COLO 205 (ATCC CCL-222) y HT-29 (ATCC HTB 38), la línea celular de melanoma humano A-375 (ATCC CRL 1619), la línea celular de linfoma de Burkitts humano Ramos (ATCC CRL-1596) y la línea celular de leucemia mieloide humana HL-60 (ATCC CCL-240) se obtuvieron a partir de ATCC, Maryland. Las líneas celulares fueron cultivadas Medio Eagles modificado de Dulbecco (DMEM, Biowhittaker, Walkersville, MD) con L-glutamina complementada con suero bovino fetal al 10% (Hyclone, Logan, Utah) y 50 µg/mL de sulfato de gentamicina (Life Technologies, Rockville, MD). Las células fueron mantenidas a 36-37.5°C en una atmósfera humidificada que contuvo 6% CO₂.

El estudio de citotoxicidad ejecutado utilizó una prueba clonogénica. Las líneas celulares de prueba fueron colocadas en placas en cápsulas de cultivo de 6-pozos en un número constante de 1000 células por pozo. Las células fueron incubadas con concentraciones variables (0 hasta 3 nM) de los diferentes maitansinoides (libres o conjugados para anticuerpos) durante 72 horas. El medio fue aspirado después desde las placas y reemplazado con medio fresco. Se permitió el crecimiento de los cultivos y la formación de colonias, durante un total de 7-10 días después de la colocación en placas. Los cultivos fueron fijados y teñidos después con 0.2% de violeta cristal en 10% formalina/PBS y se contaron las colonias. La eficiencia de la colocación en placas de células no tratadas (solo medio) se determinó al dividir el número de colonias contadas

entre el número de de células colocadas en placas. La fracción sobreviviente de las células expuestas de los fármacos se determinó al dividir el número de colonias en pozos que fueron expuestas al fármaco entre el número de colonias en los pozos de control.

Los resultados de las mediciones de citotoxicidad in vitro de los nuevos maitansinoides de la presente invención se muestran en la Figura 4. Los nuevos maitansinoides 4c, que tienen enlaces de disulfuro impedido son altamente citotóxicos hacia las dos líneas celulares probadas, SK-BR-3 y A-375, con valores IC_{50} que varían desde 7×10^{-12} M hasta 2.5×10^{-11} M. Por lo tanto, la incorporación de sustituyentes de alquilo en el carbono que tiene la porción disulfuro ha preservado la potencia citotóxica elevada. El maitansinoide que contiene el tiol estéricamente impedido 4a de la presente invención es 30 hasta 50 veces más potente que el maitansinoide no impedido correspondiente previamente descrito 1. Por lo tanto, la incorporación de sustituyentes de alquilo en el átomo de carbono que tiene la porción tiol mejora enormemente la potencia.

Los resultados de la prueba in vitro de conjugados de anticuerpo de los maitansinoides de la presente invención se muestran en las Figuras 4c y 4d. El enlace de los dos nuevos maitansinoides, 4a o 4b, al anticuerpo huC242 activado contra tumores de colon humano, resultó en eliminación específica de antígeno de células T objetivo. Por lo tanto, los conjugados son altamente potentes hacia células COLO 205 positivas a antígeno, con valores IC_{50} que varían desde 1.1 hasta 1.3×10^{-11} M. En contraste, los conjugados son 100 hasta 200 veces menos citotóxicos hacia las células A-375 negativas a antígeno, demostrando que los nuevos maitansinoides de la presente invención produce conjugados que poseen enlaces disulfuro estéricamente impedidos, y exhiben alta citotoxicidad específica objetivo.

EJEMPLO 5b

Preparación de conjugados citotóxicos de anticuerpo huC242 utilizando Maitansinoides 4a o 4b (MÉTODO A, FIG. 5 a, b)

Una solución de anticuerpo huC242 (8 mg/mL) en regulador de pH acuoso (50 mM

fosfato de potasio, 50 mM cloruro de sodio, 2 mM sal disódica de ácido etilendiamintetraacético), pH 6.5, fue incubada durante 2 horas con un exceso molar 7 a 10 veces de SPDP [succinimidil3-(2-piridilditio)propionato, 3a), o con N-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB, 3b). La mezcla de reacción fue purificada mediante el paso a través de columna de filtración de gel Sephadex G25. La concentración del anticuerpo fue determinada de manera espectrofotométrica utilizando los coeficientes de extinción para el anticuerpo $\epsilon_{280\text{nm}} = 217,560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

[246] El anticuerpo modificado fue diluido hasta 2.5 mg/mL en regulador de pH acuoso (50 mM fosfato de potasio, 50 mM cloruro de sodio, 2 mM sal disódica de ácido etilendiaminetetraacético), pH 6.5, y después tratada con un exceso molar de 1.5 a 2.5 de DM3 o DM4 en dimetilacetamida (concentración final de DMA fue 3% v/v). La mezcla de reacción fue incubada durante 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue purificada mediante paso a través de una columna de filtración de gel SephadexG25. La concentración del conjugado fue determinada de manera espectrofotométrica utilizando los coeficientes de extinción conocidos para el anticuerpo $\epsilon_{280\text{nm}} = 217,560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{252\text{nm}} = 80,062 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; para DM3 o DM4, $\epsilon_{280\text{nm}} = 5,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{252\text{nm}} = 26,790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El conjugado resultante fue monomérico y contenía, en promedio, 3.2-3.5 moléculas de DM3 o DM4 enlazadas por molécula de anticuerpo.

EJEMPLO 5c

Preparación de conjugados citotóxicos de anticuerpo huC242 utilizando Maitansinoides 4a o 4b (MÉTODO B, FIG. 5c)

Una solución de anticuerpo huC242 (8 mg/mL) en regulador de pH acuoso (50 mM fosfato de potasio, 50 mM cloruro de sodio, 2 mM sal disódica de ácido etilendiaminetetraacético), pH 6.5, fue incubada durante 2 horas con un exceso molar de 7 hasta 10 veces de SMCC[succinimidil4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxilato, 26). La mezcla de reacción fue purificada mediante paso a través de una columna de

filtración de gel Sephadex G25. La concentración del anticuerpo fue determinada espectrofotométricamente utilizando los coeficientes de extinción conocidos para el anticuerpo $\epsilon_{280} = 217,560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

El anticuerpo modificado fue diluido hasta 2.5 mg/mL en regulador de pH acuoso (50 mM fosfato de potasio, 50 mM cloruro de sodio, 2 mM sal disódica de ácido etilendiamintetraacético), pH 6.5, y después tratado con un exceso molar de 1.5 hasta 2.5 de DM3 o DM4 en dimetilacetamida (concentración final de DMA fue 3% v/v). La mezcla de reacción fue incubada durante 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue purificada mediante paso a través de una columna de filtración de gel Sephadex G25. La concentración del conjugado se determine de manera espectrofotométrica utilizando los coeficientes de extinción conocidos (para el anticuerpo $\epsilon_{280\text{nm}} = 217,560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{252\text{nm}} = 80,062 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; para DM3 o DM4, $\epsilon_{280\text{nm}} = 5,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{252\text{nm}} = 26,790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El conjugado resultante fue monomérico y contuvo, en promedio, 3.2-3.5 DM3 o DM4 moléculas vinculadas por molécula de anticuerpo.

EJEMPLO 5d

Preparación de conjugados citotóxicos de anticuerpo huC242 utilizando Maitansinoides 4a o 4b (MÉTODO C, FIG. 5d)

Una solución de anticuerpo huC242 (8 mg/mL) en regulador de pH acuoso (50 mM fosfato de potasio, 50 mM cloruro de sodio, 2 mM sal disódica de ácido etilendiamintetraacético), pH 6.5, fue incubada durante 2 horas con un exceso molar de 7 a 10 veces de SIAB [N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato, 27]. La mezcla de reacción fue purificada mediante paso a través de una columna de filtración de gel Sephadex G25. La concentración del anticuerpo fue determinada de manera espectrofotométrica utilizando los coeficientes de extinción conocidos para el anticuerpo $\epsilon_{280\text{nm}} = 217,560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

EJEMPLO 6**Eficacia in vivo de conjugados de huC242-Maitansinoide contra xenógrafos HT-29.**

5 Ratones SCID hembra de cinco semanas de edad (20 animales) fueron inoculados en forma subcutánea en el flanco derecho con células de carcinoma de colon humano HT-29 (1.5×10^6 células/ratón) en 0.1 mL de medio libre de suero. Los tumores fueron cultivados durante 11 días hasta un tamaño promedio de 100 mm^3 . Los animales fueron divididos de manera aleatoria en cuatro grupos (5 animales por grupo). El primer grupo
10 recibió el conjugado huC242-DM1 (dosis DM1 de $75 \mu\text{g/kg}$, qd x 5) administrado en forma intravenosa. El segundo grupo recibió el conjugado huC242-DM3 (dosis DM3 de $75 \mu\text{g/kg}$, qd x 5) administrado en forma intravenosa. El tercer grupo recibió el conjugado huC242-DM4 (dosis DM4 de $75 \mu\text{g/kg}$, qd x 5), en tanto que un cuarto grupo de animales sirvió como controles y recibieron PBS utilizando el mismo programa de tratamiento que
15 en los grupos 1-3.

 Los tamaños de los tumores fueron medidos dos veces por semana y los volúmenes de tumor fueron calculados con la fórmula: volumen de tumor = $1/2$ (longitud x anchura x altura). El peso de los animales también se midió dos veces por semana. Los resultados se muestran en la Figura 7. Los tumores en el grupo de control de ratones
20 crecieron hasta un tamaño de casi 1000 mm^3 en 35 días. El tratamiento con huC242-DM1 resultó en un retraso del crecimiento de tumor de 18 días, en tanto que los conjugados hechos con los maitansinoides 4a y 4b de la presente invención fueron significativamente más eficaces y prolongaron el retraso del crecimiento del tumor hasta 28 días y 36 días, respectivamente.

EJEMPLO 7**Eficacia in vivo de Conjugados huC242-Maitansinoide contra xenógrafos COLO 205**

 Ratones SCID hembras de cinco semanas (20 animales) fueron inoculadas en

forma subcutánea en el flanco derecho con células de carcinoma de colon humano COLO 205 (1.5×10^6 células/ratón) en 0.1 mL de medio libre de suero. Los tumores crecieron durante 11 días hasta un tamaño promedio de 100 mm^3 . Los animales fueron divididos de manera aleatoria en cuatro grupos (5 animales por grupo). El primer grupo recibió el conjugado huC242-DM1 (dosis DM1 de $75 \text{ } \mu\text{g/kg}$, qd x 5) administrado en forma intravenosa. El segundo grupo recibió el conjugado huC242-DM3 (dosis DM3 de $75 \text{ } \mu\text{g/kg}$, qd x 5) administrado en forma intravenosa. El tercer grupo recibió el conjugado huC242-DM4 (dosis DM4 de $75 \text{ } \mu\text{g/kg}$, qd x 5), en tanto que un cuarto grupo de animales sirvieron como controles y recibieron PBS utilizando el mismo programa de tratamiento que en los grupos 1-3.

Los tamaños de los tumores fueron medidos dos veces por semana y los volúmenes de tumor fueron calculados con la fórmula: volumen de tumor = $1/2$ (longitud x anchura x altura). El peso de los animales también se midió dos veces por semana. Los resultados se muestran en la Figura 8. Los tumores en el grupo de control de ratones crecieron hasta un tamaño de casi 900 mm^3 en 24 días. El tratamiento con huC242-DM1 resultó en un retraso del crecimiento de tumor de 20 días, en tanto que el conjugado hecho con el maitansinoide 4a de la presente invención fue considerablemente más eficaz y ocasionó la regresión completa del tumor que duró 45 días. El tratamiento con el conjugado hecho con el maitansinoide 4b de la presente invención fue incluso más eficaz, dando como resultado la curación de todos los animales tratados.

EJEMPLO 8

Eficacia in vivo de conjugados MY9-6-Maitansinoide contra xenógrafos HL-60

Ratones SCID hembras de cinco semanas (20 animales) fueron inoculadas en forma subcutánea en el flanco derecho con células de leucemia mieloide humana HL-60 (1.5×10^6 células/ratón) en 0.1 mL de medio libre de suero. Los tumores crecieron durante 12 días hasta un tamaño promedio de 100 mm^3 . Los animales fueron divididos de manera aleatoria en cuatro grupos (5 animales por grupo). El primer grupo recibió el

conjugado MY9-6-DM1 (dosis DM1 de 200 $\mu\text{g/kg}$, qd x 5) administrado en forma intravenosa. El segundo grupo recibió el conjugado MY9-6-DM3 (dosis DM3 de 200 $\mu\text{g/kg}$, qd x 5) administrado en forma intravenosa. El tercer grupo recibió el conjugado MY9-6-DM4 (dosis DM4 de 200 $\mu\text{g/kg}$, qd x 5), en tanto que un cuarto grupo de animales sirvieron como controles y recibieron PBS utilizando el mismo programa de tratamiento que en los grupos 1-3.

Los tamaños de los tumores fueron medidos dos veces por semana y los volúmenes de tumor fueron calculados con la fórmula: volumen de tumor = $1/2$ (longitud x anchura x altura). El peso de los animales también se midió dos veces por semana. Los resultados se muestran en la Figura 9. Los tumores en el grupo de control de ratones crecieron rápidamente hasta un tamaño de casi 900 mm^3 en 21 días. El tratamiento con MY9-6-DM1 resultó en un retraso del crecimiento de tumor de aproximadamente 20 días, en tanto que los conjugados hechos con los maitansinoide 4a y 4b de la presente invención fueron significativamente más eficaces prolongando el retraso de crecimiento del tumor hasta más de 20 días.

EJEMPLO 9

Preparación de un conjugado citotóxico de anticuerpo huMy9-6 utilizando Maitansinoide DM4 (4b).

Una solución de anticuerpo huMy9-6 a una concentración de 8 mg/mL fue incubada durante 2 horas con un exceso molar de 6.5 de SSNPB [sulfosuccinimidil4-(5'-nitro-2'-piridilditio)butirato] en 50 mM regulador de pH de fosfato de potasio, pH 6.5, que contiene 2 mM ácido etilendiamintetraacético (regulador de pH A) con 5% de etanol. El anticuerpo modificado fue purificado mediante paso a través de una columna de filtración de gel Sephadex G25 equilibrada en regulador de pH A y la concentración del anticuerpo purificado se determinó de manera espectrofotométrica utilizando el coeficiente de extinción para el anticuerpo a 280 nm. El anticuerpo modificado fue diluido hasta 4.9 mg/mL con regulador de pH A e incubado durante 18 horas a temperatura ambiente con

1.7 veces de exceso molar de DM4, el cual fue agregado a la mezcla de reacción como una solución de abastecimiento en dimetilacetamida (concentración final de dimetilacetamida fue de 3% v/v).

El conjugado anticuerpo-fármaco fue purificado mediante paso a través de una columna Sephadex G25 equilibrada en PBS, pH 6.5. La concentración del conjugado fue determinada de manera espectrofotométrica utilizando los coeficientes de extinción conocidos para el anticuerpo y DM4 (para el anticuerpo, $\epsilon_{280\text{nm}} = 206,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{252\text{nm}} = 72,261 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; para DM4, $\epsilon_{280\text{nm}} = 5,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{252\text{nm}} = 26,790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) El conjugado anticuerpo-fármaco resultante contenía un promedio de 3.6 moléculas de DM4 por molécula de anticuerpo. El análisis bioquímico demostró que el anticuerpo permaneció como más del 94% monomérico después de la conjugación y tuvo una afinidad de enlace comparable a la de un anticuerpo modificado como se determinó mediante la citometría de flujo. La cantidad de fármaco asociada con el anticuerpo que no se enlazó de manera covalente (fármaco libre) fue determinada mediante análisis HPLC y encontrado como menos del 1% del fármaco enlazado total.

EJEMPLO 10

Selectividad y Eficacia in vitro del conjugado huMy9-6-DM4

La citotoxicidad de huMy9-6-DM4 hacia células que expresan CD33 (HL-60) y células Namalwa CD33-negativas fueron probadas utilizando un ensayo clonogénico, en donde la actividad de eliminación celular es determinada mediante la cuantificación del número de colonias que pueden crecer después del tratamiento. huMy9-6-DM4 exhibe potente actividad de eliminación celular hacia células de tumor humano CD33-positivo HL-60 in vitro (Figura 10). No se observó toxicidad significativa hacia células Namalwa CD33-negativo humanas, indicando que la citotoxicidad dependiente de CD33 se debió al direccionamiento específico del anticuerpo anti-CD33, huMy9-6 del conjugado.

EJEMPLO 11

Eficacia in vivo de conjugados huMy9-6-DM4 contra xenógrafos de tumor humano HL60 en ratones SCID

La eficacia de huMy9-6-DM4 in vivo se determinó en ratones SCID que tienen xenógrafos de tumor humano HL-60. Las células HL-60 fueron inyectadas en forma subcutánea y se permitió que los tumores crecieran hasta un tamaño promedio de 100 mm³. El conjugado HuMy9-6-DM4 fue suministrado por vía intravenosa una vez al día durante 5 días en la dosis indicada en la Figura 11. La dosis es expresada como µg DM4 en el conjugado, la cual corresponde a una dosis de anticuerpo de aproximadamente 67 µg de anticuerpo por µg de DM4. El volumen del tumor fue medido como una indicación de la eficacia del tratamiento y el peso corporal del ratón fue monitoreado para indicar la toxicidad debida al tratamiento. huMy9-6-DM4 induce el retraso prolongado del crecimiento del tumor de xenógrafos de célula humana HL-60 en dosis que ocasiona poca toxicidad (Figura 11). La eficacia de huMy9-6-DM4 también fue comparada con aquella de huMy9-6-DM1.

De manera inesperada, se encontró que huMy9-6-DM4 fue más efectivo que huMy9-6-DM1. HuMy9-6-DM4 mantuvo a los animales en completa remisión (CR) durante aproximadamente sesenta días, en tanto que los animales tratados con huMy9-6-DM1 tuvieron una recaída después de aproximadamente 20 días en CR.

EJEMPLO 12

Preparación de un conjugado citotóxico de anticuerpo huB4 utilizando Maitansinoide DM4 (4b).

Una solución de anticuerpo huB4 a una concentración de 20 mg/mL fue incubada durante 1.5 horas con un exceso molar de 8 veces de SSNPB[sulfosuccinimidil 4-(5'-nitro-2'-piridilditio)butirato] en 50 mM regulador de pH de fosfato de potasio, pH 6.5 que contiene 2 mM ácido etilendiaminetetraacético (regulador de pH A) con 5%

dimetilacetamida. El anticuerpo modificado fue purificado mediante paso a través de una columna de filtración de gel Sephadex G25 equilibrado en regulador de pH A y la concentración del anticuerpo purificado fue determinado de manera espectrofotométrica utilizando el coeficiente de extinción para el anticuerpo a 280 nm ($199,560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El anticuerpo modificado fue diluido hasta 8 mg/mL con regulador de pH A e incubado durante 3 horas a temperatura ambiente con un exceso molar de 1.7 veces de DM4, que fue agregado a la mezcla de reacción como una solución de abastecimiento en dimetilacetamida (concentración final de dimetilacetamida fue 3% v/v). El conjugado anticuerpo-fármaco fue purificado mediante paso a través de una columna Sephadex G25 y una columna SephadexS300, ambas equilibradas en regulador de pH PBS, pH 6.5. La concentración de conjugado fue determinada de manera espectrofotométrica utilizando los coeficientes de extinción conocidos para el anticuerpo ($\epsilon_{280\text{nm}} 199,560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{252\text{nm}}$: $67,850 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y DM4 ($\epsilon_{280\text{nm}} = 5,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{252\text{nm}} = 26,790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El conjugado de anticuerpo-fármaco resultante contenía un promedio de 4.0 moléculas de DM4 molécula de anticuerpo. El análisis bioquímico demostró que el anticuerpo permaneció en más del 98% como monomérico después de la conjugación y tuvo una afinidad de enlace comparable con la del anticuerpo modificado como se determinó mediante citometría de flujo. La cantidad de fármaco asociada con el anticuerpo que no fue enlazado de manera covalente (fármaco libre) fue determinada mediante análisis HPLC y fue de aproximadamente 2% del fármaco enlazado total.

EJEMPLO 13

Selectividad y Eficacia In Vitro del conjugado huB4-DM4

La citotoxicidad de huB4-DM4 hacia células que expresan CD19 (Ramos) en comparación con una línea celular CD19-negativa (Colo 205) se probó utilizando un ensayo en base a MTT, en donde la actividad de eliminación celular es determinada mediante la cuantificación del número de células viables que permanecen después del

tratamiento con conjugado. El número de células viables es determinado por medio de cuantificación espectrofotométrica después de la incubación de las células con el tinte vital MTT. HuB4-DM4 exhibe potente actividad de eliminación celular hacia CD19-células de tumor humano Ramos positivas in vitro (Figura 12). No se observó toxicidad significativa hacia las células CD19-negativas, indicando que la citotoxicidad dependiente de CD19 se debió al direccionamiento específico mediante el anticuerpo anti-CD19, huB4.

EJEMPLO 14

Eficacia in vivo del conjugado huB4-DM4 contra xenógrafos de tumor humano Ramos en ratones SCID

La eficacia de huB-DM4 in vivo se determine utilizando ratones SCID que tienen establecidos xenógrafos de tumor Ramos humanos. Las células Ramos fueron inyectadas en forma subcutánea y se permitió que los tumores crecieran hasta un tamaño promedio de 100 mm³. El conjugado HuB4-DM4 fue suministrado por vía intravenosa como una sola inyección en las dosis indicadas en la Figura 13a. La dosis es expresada como µg DM4 en el conjugado, la cual corresponde a una dosis de anticuerpo de aproximadamente 44 µg de anticuerpo por µg de DM4. El volumen de tumor fue medido como una indicación de la eficacia del tratamiento y el peso corporal del ratón fue monitoreado para indicar la toxicidad debida al tratamiento. En dosis de más de 50 µg/kg, HuB4-DM4 ocasiona la regresión completa de los tumores en todos los animales. Los animales permanecieron sin enfermedad medible durante aproximadamente 35 días en el grupo de tratamiento de 100 mg/kg, y durante más de 55 días en los dos grupos de dosis más elevada. Estos tratamientos ocasionaron muy poca toxicidad, si es que la hubo (Figura 13b) como se determinó por medio los cambios en el peso corporal de los animales tratados.

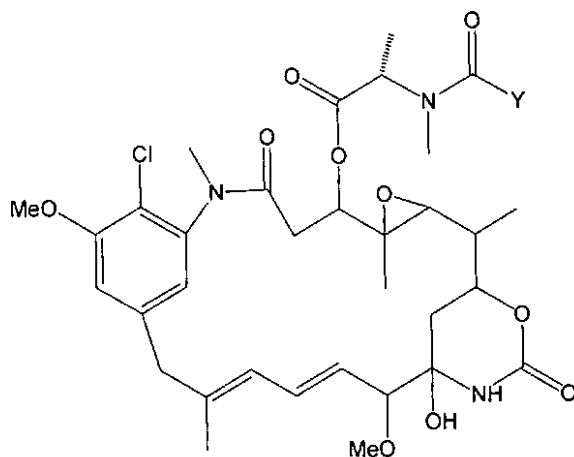
RESUMEN

Se describen nuevos maitansinoides que contienen tiol y disulfuro que tienen una

sustitución mono o di-alquilo en el átomo alfa-carbono que tiene el átomo de azufre. Se describen también métodos para la síntesis de estos nuevos maitansinoides y métodos para el enlace de esos nuevos maitansinoides a agentes de enlace celular. Los conjugados de maitansinoide-agente de enlace celular son útiles como agentes terapéuticos, que son suministrados de manera específica a células objetivo y son citotóxicos. Estos conjugados exhiben eficacia terapéutica ampliamente mejorada en modelos de tumor con animales en comparación con los agentes previamente descritos.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la fórmula 4:



4

en donde:

- 10 Y representa $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_mCR_1R_2SZ$, en donde:

R_1 es metilo;

R_2 es metilo o H;

R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H;

l y m son cada uno 1; y

- 15 Z es H o $-SCH_3$.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R_1 es metilo, R_2 es H y

Z es H.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R_1 y R_2 son metilo y Z

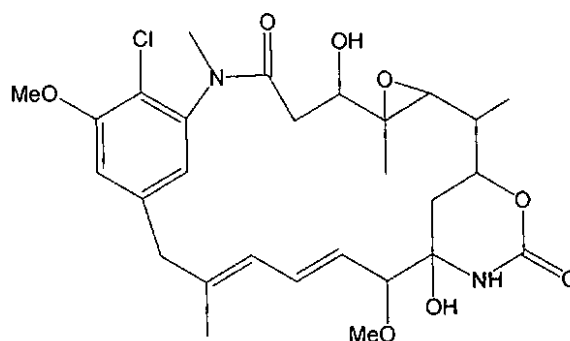
es H.

- 20 4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R_1 es metilo, R_2 es H y

Z es $-SCH_3$.

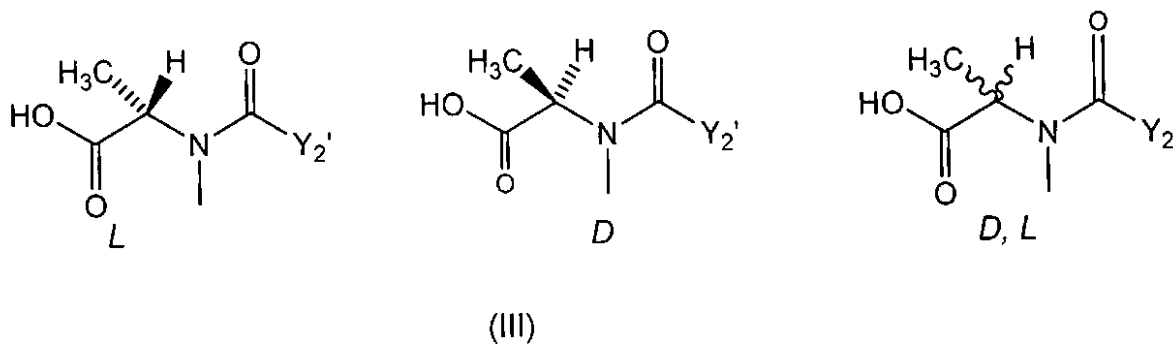
5. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R_1 y R_2 son metilo y Z es $-\text{SCH}_3$.

6. Un método de preparación del compuesto de conformidad con la reivindicación 1, en donde Z representa SCH_3 , dicho método comprende reaccionar maitansinol de la estructura 11 en C-3:



11

10 con un compuesto de fórmula (III-L), (III-D), o (III-D, L):



15

en donde:

Y_2' representa $(\text{CR}_7\text{R}_8)_1(\text{CR}_5\text{R}_6)_m \text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}_2$,

20 en donde:

R_1 es CH_3 ;

R_2 es H o CH_3

R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H;

L y m son cada uno 1; y

Z₂ es –SCH₃.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el compuesto de formula
5 (III) está representado por la fórmula (III-L).

8. El método de la reivindicación 6, en donde R₁ es metilo y R₂ es H.

9. El método de reivindicación 7, en donde dicho compuesto de formula
10 (III-L) es *N*-metil-*N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxopentil]-*S*-alanina, *N*-metil-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxopentil]-*S*-alanina o una mezcla de *N*-metilo-*N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxopentil]-*S*-alanina y *N*-metilo-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxopentil]-*S*-alanina.

10. El método de la reivindicación 7, en donde dicho compuesto de
15 formula (III-D) es *N*-metilo-*N*-(4-(*S*)-metilditio-1-oxopentil)-*R*-alanina, *N*-metilo-*N*-(4-(*R*)-metilditio-1-oxopentil)-*R*-alanina, o una mezcla de *N*-metilo-*N*-(4-(*S*)-metilditio-1-oxopentil)-*R*-alanina y *N*-metilo-*N*-(4-(*R*)-metilditio-1-oxopentil)-*R*-alanina.

11. El método de la reivindicación 7, en donde dicho compuesto de
20 formula (III-D,L) es *N*-metilalanina racémica acilatada con un grupo carboxílico que tiene una funcionalidad tiol protegida, en el cual el centro de carbono que tiene el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S para dar *N*-metil-*N*-(4-metilditio-1-oxopentil)-alanina.

12. El método de la reivindicación 7, en donde dicha mezcla de *N*-metil-
25 *N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxopentil]-*S*-alanina y *N*-metil-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxopentil]-*S*-alanina se hace mediante un proceso que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metilmetantiolsulfonato para dar ácido 4-metilditio-pentanoico (13);

- (2) convertir (13) en *N*-hidroxisuccimidil 4-metilditio-pentanoaete (14);
- (3) hacer reaccionar (14) con *N*-metilo-L-alanina para dar dicha mezcla de *N*-metilo-*N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxopentil]-*S*-alanina y *N*-metilo-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxopentil]-*S*-alanina.

5

13. El método de la reivindicación 9, en donde dicho *N*-metil-*N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxopentil]-*S*-alanina se hace mediante un método que comprende:

- (1) convertir (*R*)-1,3-butanediol en ácido (*S*)-4-(metilditio) pentanoico (19);
- (2) convertir (19) en *N*-hidroxisuccimidil (*S*)-4-(metilditio) pentanoate (20);

10 y

- (3) hacer reaccionar el compuesto (20) con *N*-metilo-L-alanina para dar *N*-metilo-*N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxopentil]-*S*-alanina.

14. El método de la reivindicación 9, donde dicho *N*-metil-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxopentil]-*S*-alanina se hace mediante un método que comprende:

- (1) convertir (*S*)-1,3-butanediol en ácido (*S*)-4-(metilditio) pentanoico (24);
- (2) convertir (24) en *N*-hidroxisuccimidil (*R*)-4-(metilditio) pentanoate (25);

y

- (3) hacer reaccionar (25) con *N*-metil-L-alanina para dar dicho *N*-metilo-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxopentil]-*S*-alanina.

20

15. El método de la reivindicación 10, en donde dicha mezcla de *N*-metil-*N*-(4-(*R*)-metilditio-1-oxopentil)-*R*-alanina y *N*-metilo-*N*-(4-(*S*)-metilditio-1-oxopentil)-*R*-alanina se hace mediante un proceso que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metil metantiolsulfonato para dar ácido 4-metilditio-pentanoico (13);

(2) convertir (13) en *N*-hidroxisuccimidil 4-metilditio-pentanoate (14);

(3) hacer reaccionar (14) con *N*-metil-*D*-alanina para dar dicha mezcla de
5 *N*-metilo-*N*-(4-(*R*)-metilditio-1-oxopentil)-*R*-alanina y *N*-metilo-*N*-(4-(*S*)-metilditio-1-oxopentil)-*R*-alanina.

16. El método de la reivindicación 11, en donde dicha *N*-metilalanina racémica acilatada con un grupo carboxílico que tiene una funcionalidad tiol
10 protegida, en el cual el centro de carbono que tiene el átomo de azufre es racémico o de quiralidad *R* o *S* para dar *N*-metilo-*N*-(4-metilditio-1-oxopentil)-alanina (15) se hace mediante un proceso que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metil metantiolsulfonato para dar ácido 4-metilditio-pentanoico (13);

15 (2) convertir ácido 4-metilditio-pentanoico en *N*-hidroxisuccimidil 4-metilditio-pentanoate (14);

(3) hacer reaccionar (14) con *N*-metilalanina racémica para dar dicha *N*-metilalanina racémica acilatada con un grupo carboxílico que tiene una funcionalidad tiol protegida, en el cual el centro de carbono que tiene el átomo de
20 azufre es racémico o de quiralidad *R* o *S* para dar *N*-metil-*N*-(4-metilditio-1-oxopentil)-alanina.

17. El método de la reivindicación 7, en donde R_1 y R_2 son metilo.

18. El método de la reivindicación 16, en donde dicho compuesto de formula (III-L) es *N*-metilo-*N*-(4-metilo-4-metilditio-1-oxopentil)-alanina que contiene
25 *N*-metilo-alanina.

19. El método de la reivindicación 16, en donde dicho compuesto de formula (III-D) es *N*-metilo-*N*-(4-metil-4-metilditio-1-oxopentil)-alanina que contiene *N*-metilo-*D*-alanina.

20. El método la reivindicación 16, en donde dicho compuesto de formula (III-D,L) es *N*-metilo-*N*-(4-metil-4-metilditio-1-oxopentil)-alanina que contiene *N*-metilalanina racémica.

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18, 19 y 20, en donde dicho *N*-metilo-*N*-(4-metil-4-metilditio-1-oxopentil)-alanina que contiene *N*-metil-*L*- alanina, *N*-metilo-*D*-alanina, o *N*-metilalanina racémica se hace mediante un proceso que comprende:

(1) hacer reaccionar sulfuro de isobutileno (5) con el anion de acetonitrilo para dar 4-mercapto-4-metil-pentannitrilo (6);

(2) hidrolizar (6) para dar ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (7);

(3) convertir (7) en ácido 4-metil-4-(metilditio) pentanoico (8) mediante la reacción con metil metantiolsulfonato;

(4) convertir (8) en *N*-hidroxisuccimidil 4-metil-4-(metilditio) pentanoate(9);

y

(5) hacer reaccionar (9) con *N*-metil-*L*-alanina, *N*-metil-*D*-alanina, o *N*-metilalanina racémica para dar dicho *N*-metilo-*N*-(4-metil-4-metilditio-1-oxopentil)-alanina que contiene *N*-metilo-*L*-alanina, *N*-metilo-*D*-alanina, o *N*-metilalanina racémica.

22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 8 y 9, que comprende además separar los diasterómeros, si están presentes, y purificar el maitansinoide mediante HPLC en sílice enlazada con ciano.

RESUMEN

Se describen nuevos maitansinoides que contienen tiol y disulfuro que tienen una sustitución mono o di-alquilo en el átomo alfa-carbono que tiene el átomo de azufre. Se describen también métodos para la síntesis de estos nuevos maitansinoides y métodos para el enlace de esos nuevos maitansinoides a agentes de enlace celular. Los conjugados de maitansinoide-agente de enlace celular son útiles como agentes terapéuticos, que son suministrados de manera específica a células objetivo y son citotóxicos. Estos conjugados exhiben eficacia terapéutica ampliamente mejorada en modelos de tumor con animales en comparación con los agentes previamente descritos.