

Q.T.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

05-112351

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO AGENTES CITOTÓXICOS MEJORADOS QUE COMPRENDEN
NUEVOS MAITANSINOIDES

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE IMMUNOGEN, INC.

DOMICILIO CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS
DE AMERICA

74. APODERADO HUMBERTO RUBIO CAMACHO

22. BOGOTÁ, D. C., 03 DE NOVIEMBRE DE 2005

SS

PETITORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

20-12-05

① SOLICITUD DE:
☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad
☒ Capítulo I ☐ Capítulo II

SOLICITANTE (71)
Nombre: **IMMUNOGEN, INC.**
Dirección: **128 Sidney Street**
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647**
E-mail:
Domicilio: **CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**
Lugar de constitución: **MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**

REPRESENTANTE O APODERADO (74)
Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
Dirección: **Carrera 7 No. 74 - 64, Of. 508** C.C. ☒ NIT ☐
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** C.E. ☐ OTRO ☐
E-mail: **No. 17'192.002 T.P. 50.007 C&J**

INVENTOR(ES) (72)
Nombre: **1.- Wayne, C. WIDDISON**
2.- Ravi, V., J. CHARI
Dirección: **1.- 72 Cedar Street, Somerville**
2.- 174 Winchester Street, Newton
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647**
E-mail:
Domicilio: **MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US2004/013314** Fecha **20 DE MAYO DE 2.004**
Publicación Internacional No. **WO 2004/103272** Fecha **2 DE DICIEMBRE DE 2.004**

TÍTULO (54) "AGENTES CITOTÓXICOS MEJORADOS QUE COMPRENDEN NUEVOS MAITANSINOIDES"

Clasificación Internacional (51) **A 61 K 47/48**

Prioridad solicitud	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número de
SI ☒ NO ☐	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	20 DE MAYO DE 2.003	60/471,739

Comprobante de pago No. **05-02,008** Fecha: **25 DE OCTUBRE DE 2.005**

cpfm

2

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE PATENTE DE INVENCION
DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

(21) No. SOLICITUD:

(51) INT. CL.:

**(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN:**

(71) SOLICITANTE: IMMUNOGEN, INC.

(30) PRIORIDAD: ESTADOUNIDENSE

**(31) No. DE SOLICITUD: 60/471,739 (72) INVENTORES: Wayne, C. WIDDISON
Ravi, V., J. CHARI**

**(32) FECHA DE
PRESENTACIÓN: 20 DE MAYO DE 2.003**

(33) PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA (74) APODERADO: Humberto RUBIO CAMACHO

Solicitud Internacional No. PCT/US2004/013314 Fecha 20 DE MAYO DE 2.004

Publicación Internacional No. WO 2004/103272 Fecha 2 DE DICIEMBRE DE 2004

FECHA ENTRADA EN FASE NACIONAL:

**(54) TITULO: "AGENTES CITOTÓXICOS MEJORADOS QUE COMPRENDEN
NUEVOS MAITANSINOIDES"**

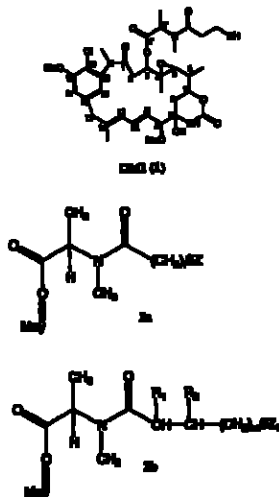
RESUMEN:

Un maitansinoide que tiene, en C-3, C-14 hidroximetil, C-15 hidroxil, o C-20 desmetilo, una cadena lateral de aminoácido acilada con un grupo acilo que tiene un grupo sulfhidrido impedido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que tiene la funcionalidad tiol tiene uno o dos sustituyentes, dichos sustituyentes que son CH₃, C₂H₅, 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 en adición 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.

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica *Se adjunta copia simple. Copia auténtica reposo en el Exp. 03-014.917*
- ☒ Poderes, si fuere el caso. *Se adjunta copia simple. Copia auténtica Exp. 03-014.917*
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la publicación PCT
- ☐ Copia informe búsqueda internacional.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo 28 PCT en Fase Nacional.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros

(11) Figura característica:



(12)

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA

C.C.

17'192.062 de Bogotá

T.P.

50.007 Consejo Superior de
La Judicatura

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

PATENTE DE INVENCION
AGENTES CITOTÓXICOS MEJORADOS QUE
COMPRENDEN NUEVOS MAITANSINOIDÉS

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 82,008
FECHA : OCTUBRE 25 DE 2005

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicacion : 85112351 004400000
Fecha (PR): 2005-11-03 16:25:50 Folios: 160
Tramite : 811 DCI-PATENT 3/O FASE NUL1 411 PRESENTAL
Dependencia: 2005 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO ABOGADOS L	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	41400439	25/10/2005	1,637,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

The Commonwealth of Massachusetts

William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. **Country:** United States of America

This public document

2. **has been signed by:** Kelly Donnelly

3. **acting in the capacity of:** Notary Public

4. **bears the seal/stamp of:**

the State of Massachusetts, whose commission expires on July 18, 2008

Certified

5. **at:** Boston, Massachusetts

6. **the:** 16 March, 2005

7. **by:** the Secretary of the Commonwealth

8. **No.:** 1055182

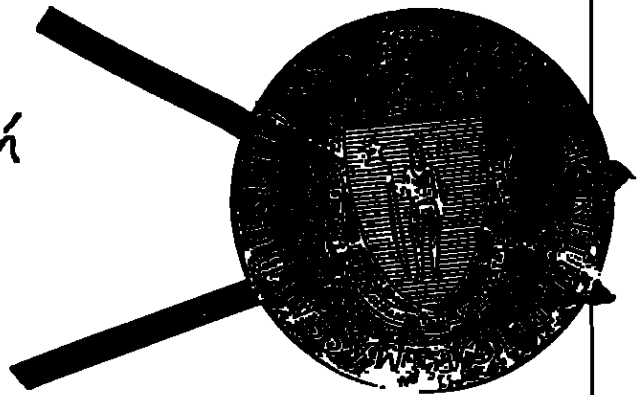
9. **Seal/stamp:**

Great Seal of the Commonwealth

10. **Signature:**



William Francis Galvin
Secretary of the Commonwealth



6

**HUMBERTO RUBIO & CIA LTDA.
ABOGADOS**

PODER

El abajo firmado, en nombre y representación de
IMMUNOGEN, INC

Domiciliado en:

**128 Sidney Street, Cambridge,
Massachusetts, Estados Unidos
de América**

por el presente conferimos poder amplio y suficiente a HUMBERTO RUBIO CAMACHO y/o TINEKE STOL TERZANI y/o HUMBERTO RUBIO STOL y/o ALVARO DIAZ LOZANO y/o MARCELA GOMEZ RUBIO domiciliados en Bogotá, Colombia, para solicitar de las oficinas y autoridades correspondientes la obtención de registros, renovaciones, trasposos y en general todo lo relacionado con el mantenimiento, obtención y protección de sus marcas de fábrica, denominaciones comerciales, marcas de comercio y patentes, licencias sanitarias a cuyo efecto le faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios en cumplimiento del objeto indicado; elevar solicitudes, descripciones, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos; abonar todos los impuestos y cuotas de cualquier otros pagos determinados por la Ley; recibir todos los documentos presentados, solicitar testimonios, desistir y enmendar solicitudes, cobrar y percibir para oponerse y protestar contra cualquier solicitud, que a juicio del apoderado, pudieran prestarse a confusión o infringir o de cualquier modo perjudicar las marcas, denominaciones o patentes del Mandante. A los mandatarios se les otorga autorización amplia y bastante para contestar todos los reclamos y las demandas presentadas ante autoridades administrativas y judiciales, desistir de procedimientos, transar conflictos, pudiendo así mismo sustituir este Poder en todo o en parte y revocar dichas sustituciones.

Dado y firmado hoy

En

Firma(s)/ Signature(s)

Nombre de cada firmante/
Name of each signor

Cargo de cada firmante/
Position of each signor

POWER OF ATTORNEY

The undersigned, in the name and on behalf of
IMMUNOGEN, INC.

with domicile at:

**128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139-4239, US**

hereby grant full and sufficient Power of Attorney to a HUMBERTO RUBIO CAMACHO y/o TINEKE STOL TERZANI y/o HUMBERTO RUBIO STOL y/o ALVARO DIAZ LOZANO y/o MARCELA GOMEZ RUBIO from Bogotá, Colombia, to apply to the proper officers and authorities for the issue of registrations, renewals, assignments, proofs of renewals and in general all that is related to the maintenance, obtention and protection of its trademarks, tradenames, commercial marks, patents and sanitary licenses; to which end it empowers them to take all steps necessary before said authorities for the object stated; to file petitions, prepare descriptions; make protests, declarations, appeals and objections; pay taxes and other charges required by law; apply for certifications, receive documents and take testimony abandon and amend applications and collect refunds; to oppose, ask for the cancellation of and protest any application or registration which in their judgment could lend to confusion or could be considered an infringement or could in any form prejudice the undersigned's trademarks, tradenames, patents and commercial marks. To the said mandatory sufficient Power is granted hereby to answer in the matter of all claims and demands that maybe presented, before administrative or judicial officers of any class, giving them likewise Power to abandon proceeding, settle conflicts, substitute these present in whole or in part and revoke such substitutions.

Given and signed this
in Cambridge, MA, USA


Walter A. Blattler, Vice-President, Research

**Executive Vice President,
Science and Technology**

2

HUMBERTO RUBIO & CIA LTDA.
ABOGADOS

CERTIFICADO NOTARIAL (Individuo)

A los días del mes de ante mi,
Notario Público de compareció personalmente

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que
es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento
que precede, y quien(es) tiene(n) capacidad legal para
otorgarlo.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy 8 de Agosto 2005
compareció(eron) personalmente

Walter A. Blattler

a quien(es) conozco como la(s) persona(s) que
firma(n) este documento en representación de la
sociedad/compañía denominada

IMHUNDGEN, INC.

Certifico:

a) Que

IMHUNDGEN, INC.

es una sociedad/compañía legalmente constituida y
existente de acuerdo con las Leyes de U.S.A.

b) Que el domicilio de dicha sociedad/compañía es
120 Sidney Street, Cambridge

Massachusetts U.S.A.

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el
presente poder están comprendidos dentro del objeto
social de la mencionada sociedad/compañía.

d) Que

Walter A. Blattler

está autorizado para otorgar el presente poder. Lo
anterior está probado por medio de los documentos,
que certifico he visto.

Ciudad hoy 8 de Agosto
de 2005.

NOTARIAL CERTIFICATE (Individual)

On this 8 day of March before me, a Notary
Public of 1st Dist, MA personally appeared to

me known, and known to me to be the person(s) who
executed that foregoing document, and who has
(have) legal capacity to execute it.

NOTARIAL CERTIFICATE (Corporation)

On this 8 day of March, 2005
personally appeared Walter Blattler

whom I know to be the person(s) who signed this
document as representative(s) of the
corporation/company named

Immunogen, Inc.

I Certify:

a) That

Immunogen, Inc.

is a corporation/company legally constituted and in
existence accordance with the law of U.S.A.

b) That the domicile of said corporation/company is

c) That the purpose or purposes for which the present
Power of Attorney is granted are compromised
within the object set forth in the charter of the
mentioned corporation/company.

d) That Mr(s).

Walter Blattler P

is authorized to grant the present Power of Attorney.
The aforementioned was duly proven through the
documents and I duly verify having seen them.
State MA

This 8 day of March, 2005

Kelly J. Donnelly
7-18-08 Commission

TRADUCCION OFICIAL No. 064-05, DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS, SELLADO CON EL SELLO DEL SUSCRITO TRADUCTOR OFICIAL, HOY MARZO 28, 2005, EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA.

La Comunidad de Massachusetts
William Francis Galvin
Secretario de la Comunidad
Apostilla
(Convention de la Haya du 5 octobre 1961)

1. Ciudad: Estados Unidos de América
Este documento publico
2. Ha sido firmado por: KELLY DONNELLY
3. Actuando como: NOTARIO PUBLICO
4. Porta el sello y estampilla de:
El Estado de Massachusetts, cuyo nombramiento vence Julio 18, 2008

CERTIFICADO

- | | |
|---------------------------------------|--|
| 5. En: Boston-Massachusetts | 6. El 16 de Marzo del 2005 |
| 7. por: el Secretario de la Comunidad | |
| 8. No. 1055182 | |
| 9. Sello y estampilla: | 10. Firma: |
| Gran Sello de la Comunidad | William Francis Galvin
Secretario de la Comunidad |

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2005 MAR 20 a 9 46
JCS
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
Sergio Clautonio Salazar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

Sergio Clautonio Salazar Mendoza
Traductor e Interpreté Oficial
Nº 2230 Minjusticia 1991

AGENTES CITOTÓXICOS MEJORADOS QUE COMPRENDEN

NUEVOS MAITANSINOIDES

5 Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional No. 60/471,739, 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
15 preparación de maitansinoides que tiene una porción tiol, la cual puede ser utilizada en la 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. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al, en Anticuerpo Mediated Delivery Systems 25-53 (J.
25 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 (Gamett et al. Cancer Res. 46: 2407-2412 (1986); Ohkawa et al. Cancerimmunol. 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. CancerRes. 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 Relsfeld utilizaron la misma técnica para conjugar daunorubicina para un anticuerpo anti-melanoma (J. Natl. Canc. Inset. 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: 828-829 (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 hidroxilado), 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

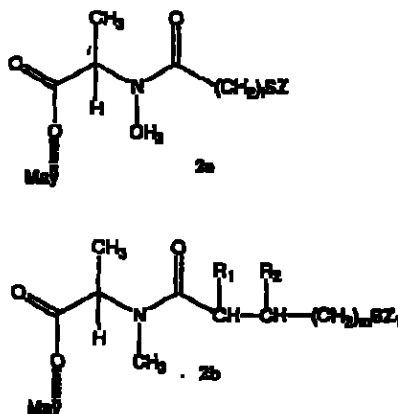
maitansina ha reportado un resultado del 67% de las células que acumulan en mitosis. Se reportó que las células de control no tratadas mostraron un índice mitótico que varía entre 3-2 hasta 5.8% (Sieber et al. 43 Comparative Leucemia Research 1975, bibl. Haemat. 495-500 (1976)). Los experimentos con 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} mg/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, Fed. 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 acilada 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 sulfidrilo en dicho compuesto maitansinoide o un grupo disulfuro en un conjugado de agente de enlace celular enlazado por disulfuro-maitansinoide con dicho maitansinoide que es "no-impedido" ya que no hay sustituyentes voluminosos en el alfa-carbono cercano al grupo sulfidrilo 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 = 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 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 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 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 estérico 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 acilado 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-alquilo en el átomo de

carbono que tiene el átomo de azufre.

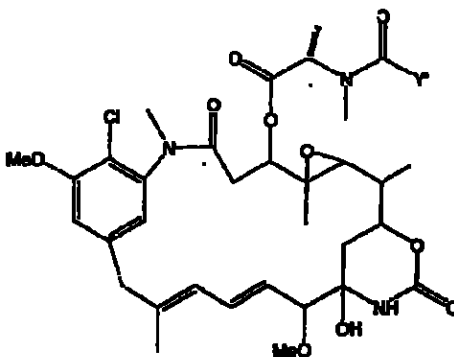
En una segunda modalidad, la presente invención describe métodos para la síntesis de esos nuevos maitansinoides.

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 hidroximetil, C-15 hidroxil, o C-20 desmetilo, una cadena lateral de aminoácido acilado 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 CH_3 , C_2H_5 , 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



SZ,

5

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;

10

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;

15

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.

20

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.

25

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

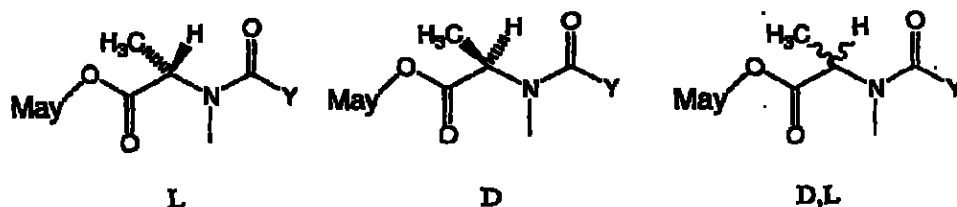
Un compuesto representado por la fórmula 4', en donde R_1 es H, R_2 es metilo y Z

es $-\text{SCH}_3$.

Un compuesto representado por la fórmula 4', en donde R_1 y R_2 son metilo y Z es $-\text{SCH}_3$.

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

5



en donde

(I)

10

Y representa $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1(\text{CR}_6\text{CR}_9)_m(\text{CR}_3\text{CR}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$, 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 ;

15

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;

20

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 $-\text{COR}$ 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

25

May representa un maitansinoide que tiene la cadena lateral en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxil 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

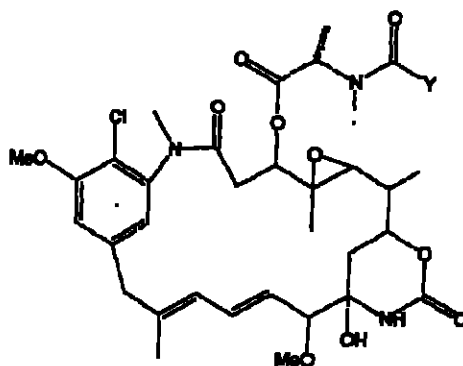
cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es H;

El compuesto antes descrito, en donde R_1 y R_2 son metilo, R_3 , R_4 , 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_3 , R_4 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es $-\text{SCH}_3$;

El compuesto antes descrito, en donde R_1 y R_2 son metilo, R_3 , R_4 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es $-\text{SCH}_3$;

Un compuesto representado por la fórmula 4:



4

en donde:

Y representa $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1(\text{CR}_5\text{CR}_6)_m(\text{CR}_3\text{CR}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$, 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 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;

5 El compuesto de la fórmula 4, en donde R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ 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 R₁ y R₂ son metilo; R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1; n es 0; y Z es H;

10 El compuesto de la fórmula 4, en donde R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, l y m son cada una 1, n es 0, y Z es -SCH₃;

El compuesto de la fórmula 4, en donde R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃;

15 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;

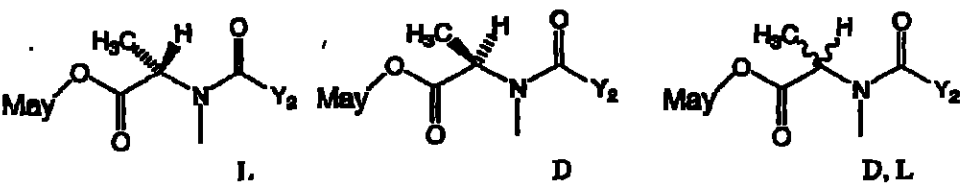
Cualquiera de los conjugados maitansinoide-agente de enlace celular antes mencionados, en donde el agente de enlace celular comprende por lo menos un sitio de enlace de un anticuerpo, preferiblemente MY9 humanizado o de superficie adicional, anti-B4 humanizado o de superficie adicional, o C242 humanizado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

20 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;

25 Un método de esterificación de un maitansinoide en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxil, o C-20 desmetilo, con una cadena lateral de amino ácido acilado 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 hidroxi, 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 (CR₇CR₈)_t(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_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;

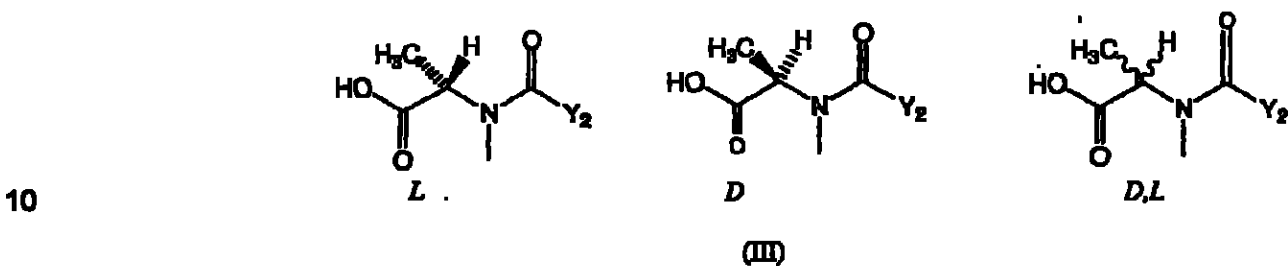
R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo cíclico lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático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

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

Z₂ 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; y

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



en donde:

Y₂ representa (CR₇CR₈)₁(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂SZ₂, en donde:

15 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;

20 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 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

25 Z₂ 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 antes descrito, en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_3 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno H; l y m son cada una 1; y n es 0;

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

5 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);

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);

10 El método antes descrito, en donde el 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 la quiralidad R o S para dar compuestos de la estructura de 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:

15 (1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (12) con metil metantiosulfonato 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);

20 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;

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

25 (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 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 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-
- 20 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_6 , R_8 , R_7 y R_9 son cada uno H; l 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:

(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;

(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;

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

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 sulfidril.

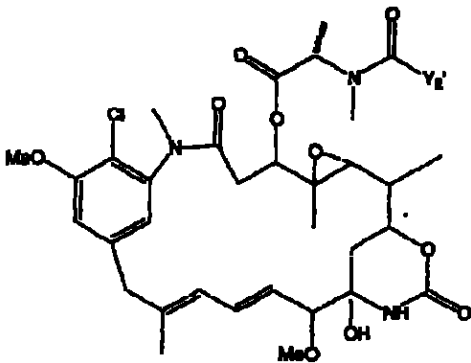
El método antes descrito para elaborar un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular, en donde el grupo ditio reactivo es un grupo ditiopiridilo o un grupo ditiopiridilo sustituido;

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'

5



10

en donde

4₂'

Y₂' representa

(CR₇CR₈)₁(CR₉=CR₁₀)_p(C=C)_qA_r(CR₅CR₆)_mD_u(CR₁₁=CR₁₂)_r(C=C)_sB_t(CR₃CR₄)_nCR₁R₂SZ, en donde:

15

R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅, 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, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser H;

20

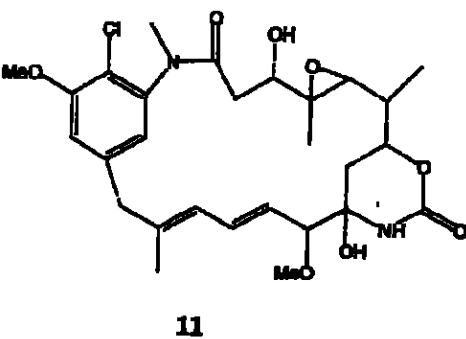
A, B, y D cada uno de manera independiente es cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene de 3 hasta 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

25

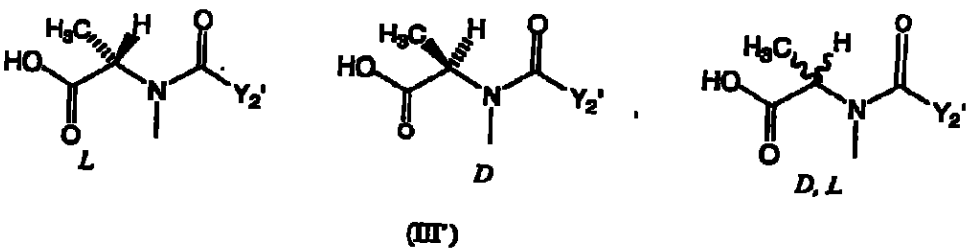
R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático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



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, 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,

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;

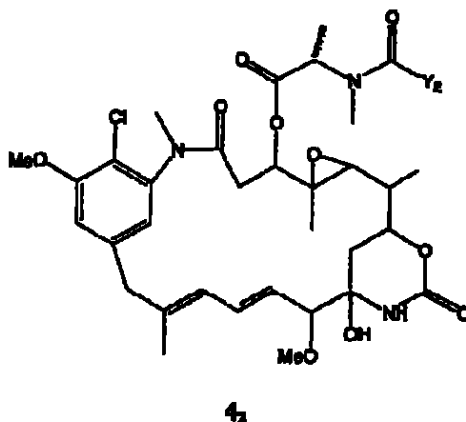
l, m, n, o, p, q, r, s , y t son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en cualquier momento; y

Z_2 es SR o $-\text{COR}$, 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 $4_2'$, 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 $4_2'$, en donde R_1 es H y R_2 es metilo,

Un método de esterificación de maitansinol para dar un maitansinoide de la fórmula 4_2 :



en donde:

Y_2 representa $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1(\text{CR}_5\text{CR}_6)_m(\text{CR}_3\text{CR}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}_2$, en donde:

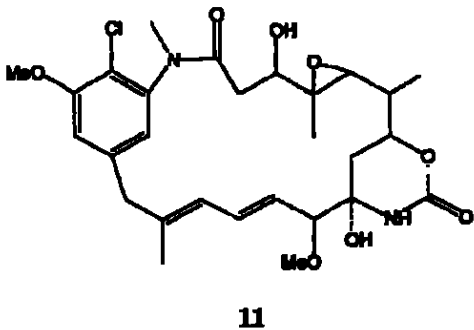
R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico

aromático o heterocicloalquilo, y además R₂ puede ser,

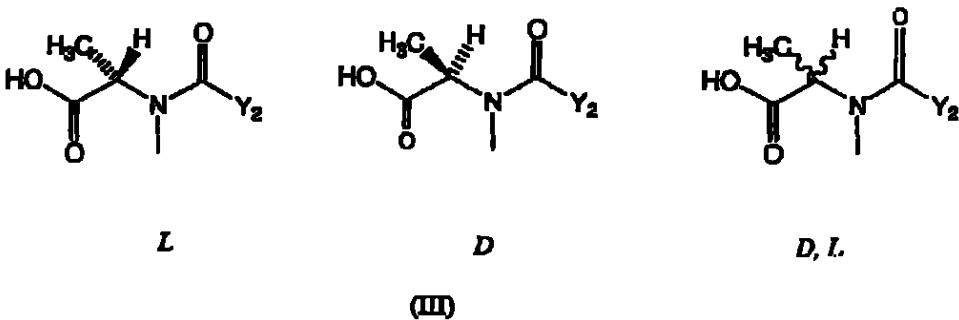
R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

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

Z₂ 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:



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



en donde:

Y₂ representa (CR₇CR₈)₁(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_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 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 alquenilo 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;

5 (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;

10 (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:

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

20 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;

25 (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 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 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 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.

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;

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;

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:

(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);

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

(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;

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;

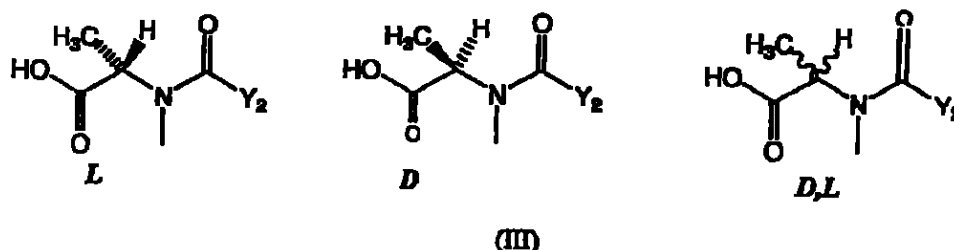
15 Un método para elaborar un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular que comprende elaborar un maitansinoide purificado a través de cualquiera de los métodos antes descritos de esterificación de maitansinol para dar maitansinoides de la fórmula 4b, y hacer reaccionar el maitansinoide con 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;

20 [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.

Métodos de terapia que utilizan los conjugados antes descritos.

Compuestos de la fórmula (III):

25



en donde:

Y_2 representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que 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;

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 alquenilo 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;

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);

(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 (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:

10 (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);

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

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;

20 (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 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 los compuestos de la estructura de 15.

25

A método para hacer 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 los compuestos de la estructura 15, que comprende:

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

5 (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 acilada 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.

10 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;

15 (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

20 (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;

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

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.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

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.

10

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.

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

15

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.

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

20

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.

25

La FIG. 8 es una gráfica que compara la eficacia anti-tumoral 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.

La FIG. 9 es una gráfica que compara la eficacia anti-tumoral in vivo de MY9-8-maitansinoides de la presente invención con conjugados MY9-8 de los maitansinoides previamente descritos, contra xenógrafos de leucemia mieloide promielocítica HL60.

5 La FIG. 10 muestra el resultado de la evaluación de citotoxicidad in vitro del conjugado huMy9-8-DM4 con células HL-60 objetivo y células Namalwa no objetivo.

La FIG 11 muestra la evaluación de la eficiencia in vivo del conjugado huMy9-8-DM4 contra tumores de xenógrafo HL-60 humano en ratones SCID y la compara con aquella de un conjugado huMy9-8 de un maitansinoide previamente descrito (huMy9-8-DM1).

10 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.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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.

20

25

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. 4,258,746) (preparado por la reducción LAH de ansamitocina P2);

(2) C-20-hidroxi (o C-20-demétilo) +/-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-acloxi (-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 acloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 4,450,254) (preparados a partir de *Nocardia*);

(4) C-15-hidroxi/acloxi (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. 4,313,948 y 4,315,929)(aislado a partir de *Trewia nudiflora*);

(6) C-18-N-demetilo (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica 4,382,663 y 4,322,348) (preparados mediante la desmetilación de maitansinol mediante *Streptomyces*); y

(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, 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.

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

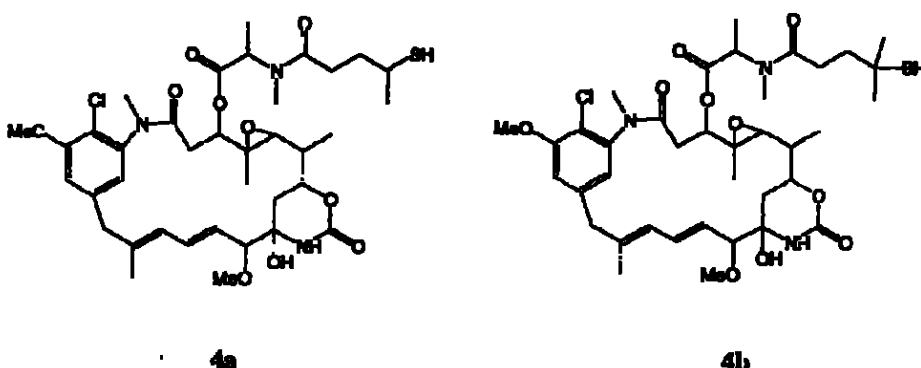
Los maitansinoides particularmente preferidos que comprenden una porción de enlace que contiene un grupo químico reactivo son ésteres C-3 de maitansinol y sus análogos en donde la porción de enlace contiene un enlace de tiol o disulfuro estéricamente impedido.

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 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 tior 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 tior-, N²-deacetil-N²-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (denominado DM3) y N²-deacetil-N²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (denominada DM4). DM3 (4a) y DM4 (4b) están representados en las siguientes fórmulas estructurales:



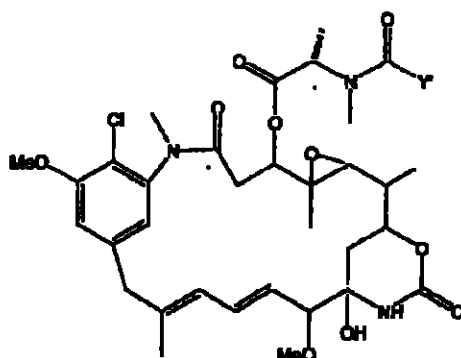
La citotoxicidad in vitro de los nuevos maitansinoides con tior estéricamente impedido y que contienen disulfuro de la invención puede ser evaluada por su habilidad para suprimir la proliferación de varias líneas celulares indeseables in vitro (Fig. 4). Por ejemplo las líneas celulares tal como la línea 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 IC_{50} pueden calcularse después a partir de los resultados de las pruebas.

5 Producción de Maitansinoides que Tienen una Porción Tíol o Disulfuro Estéricamente Impedida

Los maitansinoides novedosos de la invención son aquellos que tienen, en C-3, C-14 hidroximetil, C-15 hidroxi, 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 tíol posee uno o dos sustituyentes, dichos sustituyentes que son 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 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:

5 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;

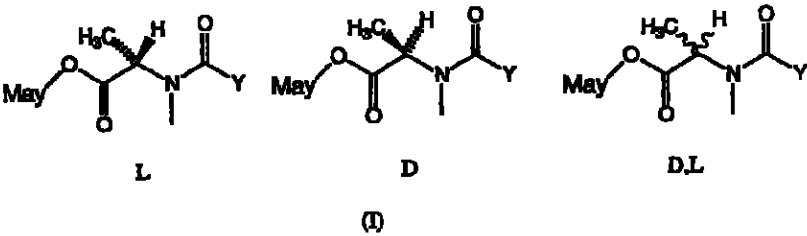
10 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o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

15 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;

20 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', R₁ es H, R₂ es metilo y Z es H; R₁ y R₂ son metilo y Z es H; R₁ es H, R₂ es metilo, y Z es -SCH₃; o R₁ y R₂ son metilo, y Z es -SCH₃

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



en donde:

Y representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ$, en donde:

5 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;

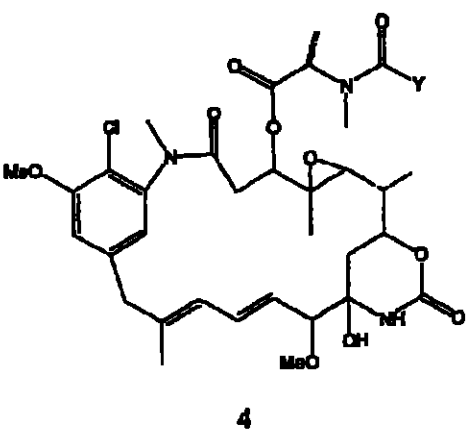
10 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico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

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

15 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;

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

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



en donde los sustituyentes son como se definieron antes.

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 $-\text{SCH}_3$; 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 $-\text{SCH}_3$. 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, R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 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, R_1 y R_2 son ambos metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son 1, y n es 0 (DM4, compuesto 4b); el maitansinoide 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, y l y m son 1, y n es 0, y Z es $-\text{SCH}_3$; y el maitansinoide de la fórmula 4 en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, y l y m son 1, y n es 0, y Z es $-\text{SCH}_3$.

Ejemplos de alquilos o alquenilos 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 alquenilos 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 isopentanilo.

Ejemplos de alquilos o alquenilos cíclicos que tienen desde 3 hasta 10 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 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.

Los maltansinoides novedosos que tienen una porción tioi o disulfuro estéricamente impedida pueden ser preparados por medio de los siguientes métodos recientemente descubiertos:

Síntesis de Maltansinoides.

La Fig. 3a muestra las etapas en la síntesis de maltansinoide 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.

5 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 ditiotretol

10 para dar el L-aminoacil maitansinoide que contiene tior DM4 (4b), el cual fue purificado de nuevo mediante HPLC, utilizando una columna enlazada con ciano.

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

15 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 diastereómeros fue separada

20 mediante HPLC, utilizando una columna enlazada por ciano. El isómero que contiene el L-amino ácido deseado fue recolectado y reducido con ditiotretol 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.

25

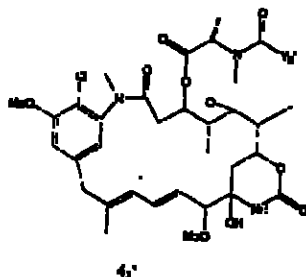
La conversión o (R)-1, 3-butandiol (16) en su ditosilato 17, seguido por reacción secuencial con cianida de sodio y etil xantato de potasio dio nitrilo 18 (Fig.3c). La hidrólisis

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 (15a). La reacción con maitansinol, como se describió antes para el compuesto 15, dio dos diastereómeros de L-DM3SMe 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 diastereómeros de DM3SMe, 4k y 4l.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para la esterificación de un maitansinoide en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxí, 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 tior protegida tiene uno dos sustituyentes, dichos sustituyentes que son CH₃, C₂H₅, 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 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 hidroxí, o C-20 desmetilo, dicho método que comprende hacer reaccionar un maitansinoide en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxí, o C-20 desmetilo, con el aminoácido acilado en donde el grupo acilo tiene un grupo sulfhidrilo protegido.

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



en donde:

Y₂'representa



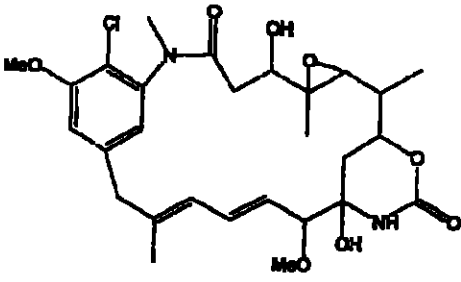
en donde:

5 R₁ y R₂ son cada uno de manera independiente CH₃, C₂H₅, 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, 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;

10 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;

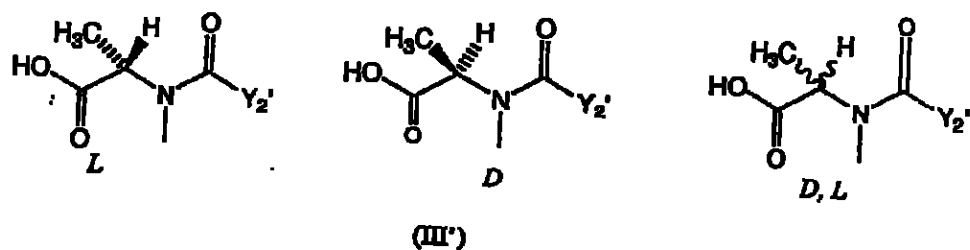
15 l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en ningún momento.

20 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:



11

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



10

en donde:

Y2, representa



en donde:

15 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;

20 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;

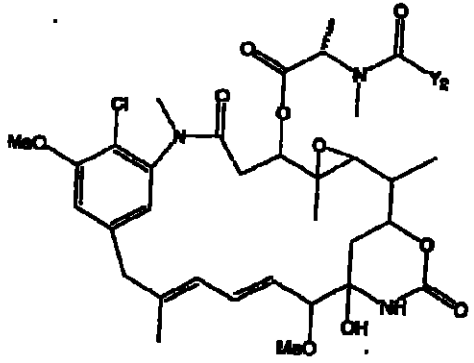
25 l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en ningún momento; y

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.

5 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:

10



15

en donde:

Y₂ representa (CR₇CR₈)₁(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_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 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;

20

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;

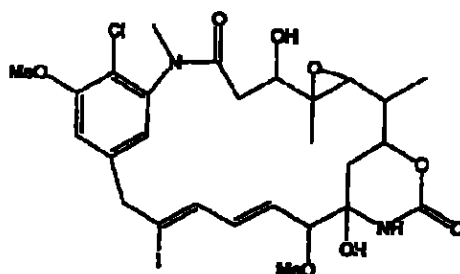
25

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:

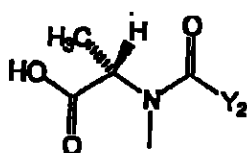
5



11

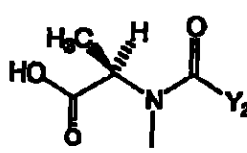
10

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

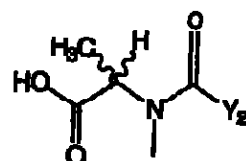


en c

L



D



D,L

15

Y₂ n

(III)

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;

20

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;

25

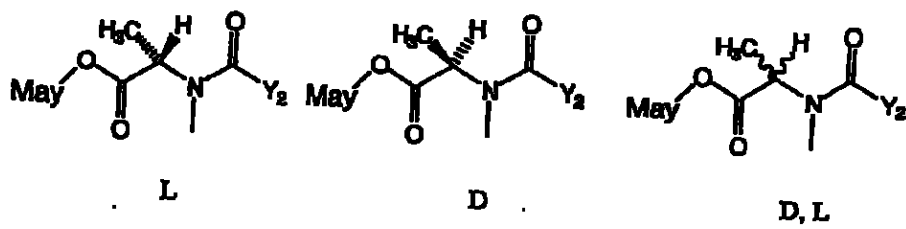
l, m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

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;

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

5 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)

Y₂ representa (CR₇CR₈)₁(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂SZ₂, en donde:

15 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;

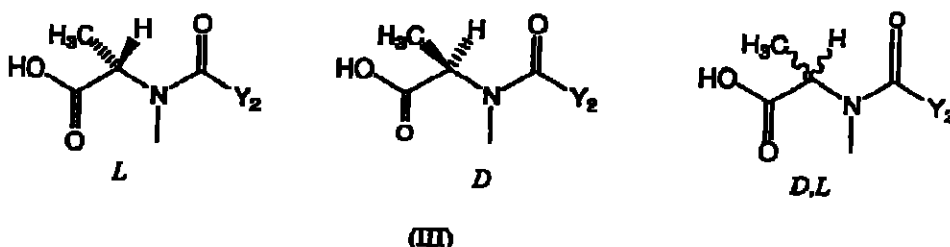
20 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo cíclico lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático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

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

25 Z₂ 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; y

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

5



en donde:

Y_2 representa $(CR_7CR_8)_1(CR_9CR_{10})_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

10

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;

15

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;

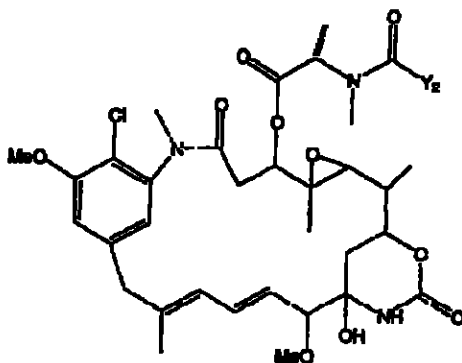
l , m y n son cada uno de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0;

20

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 anillo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

25

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



42

en donde:

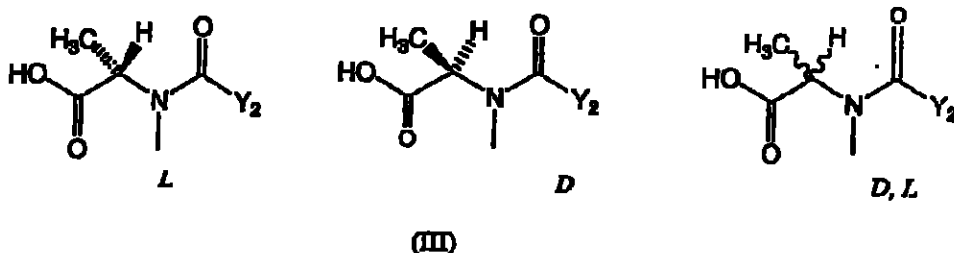
Y_2 representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

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 anillo 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):



en donde:

Y_2 representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$, 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_3 , R_4 , 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_3 , R_4 , 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 acilada 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 acilada 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 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 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 acilada 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).

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

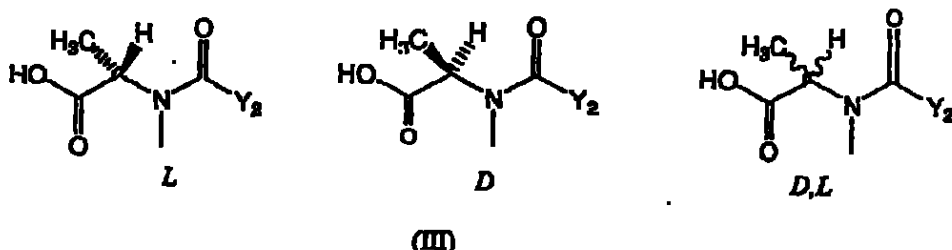
- (1) convertir (S)-1, 3-butandiol en ácido (R)-4-(metilditio) pentanoico 24;
- (2) convertir el compuesto 24 en su éster de N-hidroxisuccinimida (25); y
- (3) hacer reaccionar el compuesto 25 con N-metil-L-alanina para dar el compuesto 15b (S, R).

10 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.

15 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.

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



en donde:

5 Y_2 representa $(CR_7CR_8)_1(CR_9CR_{10})_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$, 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;

10 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;

15 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 anillo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

20 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.

25 Citotoxicidad In Vitro de Maltansinoides

La citotoxicidad in vitro de los maltansinoides 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 (1980));

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 5,989,108; 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. 5,839,841 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-contrahuésped, 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.

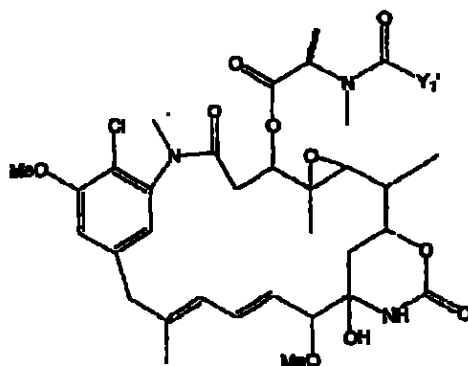
Los cánceres del seno y de los testículos pueden ser activados de manera exitosa con estrógeno (o análogos de estrógeno) o andrógeno (o análogos de andrógeno) respectivamente como agentes de enlace celular.

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 acilado encontrada en C-3, C-14 hidroximetilo, C-15 hidroxí o C-20 desmetilo del maitansinoide, y en donde el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácido acilado 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 4,':



4,'

en donde:

Y₁' representa

$(CR_7CR_8)_1(CR_9=CR_{10})_pC=C_A(CR_5CR_6)_mD_r(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_sB_t(CR_3CR_4)_nCR_1R_2$

S-,

en donde:

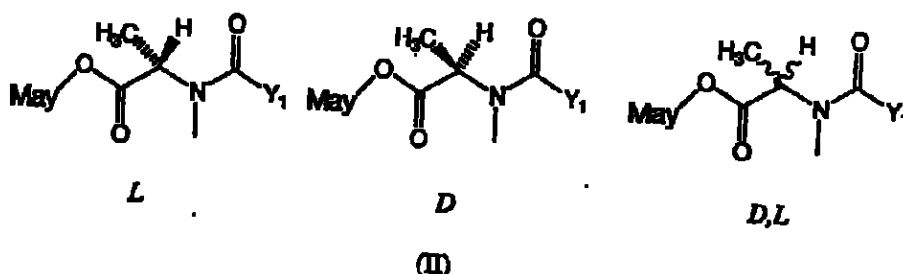
A, B, D son cicloalquilo o cicloalquenilo que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

$R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{11},$ 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 $(CR_7CR_8)_1(CR_9CR_{10})_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$, 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;

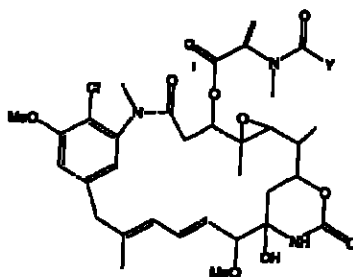
R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 y R_8 son cada uno de manera independiente H, CH_3, C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo

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 hidroxilo 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 R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, l y m son cada una 1, y n es 0; y aquellos en donde R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ 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 sulfhidrido 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 incubar en 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 (Fig5b). 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 sulfhidrido. 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 MY9-8 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-DMI 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.

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

20 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 ascriptamina 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 linfoides 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 µg 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 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 transplante renal, rechazo de transplante hepático, rechazo de transplante pulmonar, rechazo de transplante cardíaco, y rechazo de transplante 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.

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_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 Na_2SO_4 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 sin purificación adicional. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.38 (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 metantioisulfonato (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 metantioisulfonato 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 agitada 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-Hidroxisuccinimidl-4-metil-4-(metilditio)pentanoato (9):

Ácido metilditiopentanoico 8 (3.0 g, 15 mmol) fue disuelto en 20 mL de clouror de metileno y agitado magnéticamente a mediad 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(M + 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 40 mL 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 Na_2SO_4 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 (CDCl_3): δ 1.32 (6H, s), 1.42 (3H, d, J = 7 Hz), 1.90-1.97 (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 diciclohexilcarbodiimida (DCC, 57.1 mg, 0.277 mmol) en 0.67 mL de diclorometano. Después de 1 minuto se agregó una solución de 1 M ZnCl_2 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 diasterómeros 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 diasterómero 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 (CDCl_3): δ 0.80 (3H, s), 1.28-1.38 (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. 5Hz), 6.73 (1H, d, J=11 Hz), 6.81 (1H, d, J=1. 5 Hz).

Alta resolución MS (M +t) 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 ditioneitol (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 Diazem™ 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 (CDCl₃): 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 (M+ Na+) calc.: 802.3101, encontrado: 802.3116.

EJEMPLO 2

Síntesis de Maltansinolde 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. 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 ($M + \text{Na}^+$) calc.: 304.1, encontrado: 304.0.

N-metil-N-(4-metilditio-1-oxopentil)-L-alanina (15): N-metil-L-alanina (0.84 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 Na_2SO_4 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 0.80 g de producto 15 (82% 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 ($M + \text{Na}^+$) calc.: 288.1, encontrado: 288.1. RAUL

N^2 -deacetil- N^2 -(4-metilditio-1-oxopentil)maltansina (L-DM3-SMe, 4c): Una solución de Maltansinol (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 a medida que se agregó una solución de diciclohexilcarbodiimida (DCC, 57.1 mg, 0.277 mmol) en 0.67 mL de diclorometano. Después de 1 minuto, se agregó una solución de 1 M ZnCl_2 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 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, 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 maltansinol 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 diastereómeros 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 DiazemTM CN utilizando como fase móvil una mezcla 88:8:24 de hexano, 2-propanol y acetato de etilo. La velocidad de flujo fue de 118 mL/min. El producto deseado 4c eluido con un tiempo de retención de 11 minutos, el diastereómero 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 (CDCl_3): 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 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 ($M + \text{Na}^+$) calc.: 834.3, encontrado: 834.3.

N^2 -deacetil- N^2 -(4-mercapto-1-oxopentil)maltansina (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 ditiotreitól (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 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 en una columna de 50 cm x 250 cm, 10 micronDiazemTM 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 (CDCl_3): 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), 2.33-2.42 (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.

5 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, 38.08, 21.86, 21.06; MS: 420.99 (M + Na)⁺, 421.93 (M+1+Na)⁺.

S-4-O-Etilxantil-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 secada sobre MgSO₄, filtrada, y después evaporada para dar 2.63 g de crudo de R-3-O-p-toluensulfonil-pentannitrilo. MS 275.80 (M + Na)⁺, 276.75 (M + 1 + Na)⁺. El producto fue

utilizado directamente sin purificación adicional.

A la solución de crudo de R-3-O-p-toluensulfonil-pentannitrilo (2.83 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 (83%, 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-Etibantio-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 sílica, 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 (CDCl_3) 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); ^{13}C NMR 179.18, 45.35, 31.58, 30.73, 24.70, 21.05; MS: 202.92 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺, 203.91 ($\text{M} + \text{H} + \text{Na}$)⁺; $[\alpha] = 41.35$ ($c = 2, \text{CH}_3\text{OH}$).

N-metil-N-[4-(S)-metilditio-1-oxopentil]-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). ^1H 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: ($\text{M} + \text{Na}$) calc. : 288.1, encontrado: 288.1

N2-deacetil-N2-[4-(S)-metilditio-1-oxopentil]maltansina (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 elusión isocrática a una velocidad de flujo de 1 mL/min, con hexano:acetato de etilo:2-propanol (66:24:8, v/v/v). Bajo esas condiciones, el isómero 4g (S,S) eluido en 24.5 minutos. Espectro de masa: m/z 834.2 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺. El pico para el otro isómero 4h (R, S) fue separado y eluido a 34.6 minutos. MS: m/z 834.2 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺.

EJEMPLO 4

Síntesis de Maltansinoide 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 redisoluto en acetato de etilo, lavado con 0.1 M NaHCO₃ acuoso, y NaCl saturado. La capa orgánica fue separada, secada sobre MgSO₄, 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 (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)⁺.

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 NaH₂PO₄ frío, pH 7.5, agua y 1.0 M de NaH₂PO₄ pH 4.0. La capa orgánica fue secada sobre MgSO₄, 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 (CDCl₃) 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); ¹³C NMR 213.04, 119.16, 70.28, 44.57, 32.10, 20.20, 15.21, 13.93; MS: 226.51 (M + Na)⁺, 242.51 (M + K)⁺.

Ácido R-(-)-4-Metilditio-pentanoico (24): Una solución de R-4-O-Etibxantio-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 H₃PO₄ a pH 2.5-3.0 y extraída con EtAc (6 x 75 ml). Las capas orgánicas fueron combinadas, secadas sobre MgSO₄, 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 NaH₂PO₄, pH 7.0 (75 mL) se agregó mediante goteo metil metantioisulfonato (1.96 g, 15.53 mmol) en THF seco (7 mL) 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 H₃PO₄ a un pH 2.5-3.0 y extraída con EtOAc (4 x 100 mL). Las capas orgánicas fueron combinadas, secadas sobre MgSO₄, 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 (CDCl₃) 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); ¹³C NMR 179.46, 45.67, 31.91, 31.07, 25.02, 21.36; MS: 202.9 (M+Na)⁺, 203.9 (M+1+Na)⁺; [α] = -39.16 (c = 2, CH₃OH).

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 (M + Na): calc.: 288.1, encontrado: 288.1

N²-deacetil-N²-(4-(R)-metilditio-1-oxopentil)maltansina (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 diastereómeros que tiene la porción de N-metil-S-alanilo (4k, S, R) y la porción de N-metil-R-alanilo (4l, R, R). Los diastereómeros 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 ($M + Na$)⁺. +.

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 IC₅₀ que varían desde 7 x 10⁻¹² M hasta 2.5 x 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 IC₅₀ que varían desde 1.1 hasta 1.3 x 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.

5 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
10 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
15 determinada de manera espectrofotométrica utilizando los coeficientes de extinción para el anticuerpo $\epsilon_{280\text{nm}} = 217,580 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

[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
20 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 $\epsilon_{280\text{nm}} = 217,580 \text{ M}^{-1}$
25 cm^{-1} y $\epsilon_{282\text{nm}} = 80,082 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; 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 $\epsilon_{262\text{nm}} = 80,062 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; para DM3 o DM4, $\epsilon_{280\text{nm}} = 5,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{262\text{nm}} = 26,790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). 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)

5 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
10 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

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

 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
20 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 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-
25 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 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 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 (1.5×10^5 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 mm³ 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 x 10⁶ células/ratón) en 0.1 mL de medio libre de suero. Los tumores crecieron durante 12 días hasta un tamaño promedio de 100 mm³. 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 µg/kg, qd x 5) administrado en forma intravenosa. El segundo grupo recibió el conjugado MY9-6-DM3 (dosis DM3 de 200 µg/kg, qd x 5) administrado en forma intravenosa. El tercer grupo recibió el conjugado MY9-6-DM4 (dosis DM4 de 200 µg/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 mm³ en 21 días. El tratamiento con MY9-8-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 huMy9-8 utilizando Maltansinoide DM4 (4b).

Una solución de anticuerpo huMy9-8 a una concentración de 8 mg/mL fue incubada durante 2 horas con un exceso molar de 6.5 de SSNPB [sulfosuccinimidi4-(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, $\epsilon_{280\text{nm}} = 208,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{282\text{nm}} =$

72,261 M⁻¹cm⁻¹; para DM4, $\epsilon_{280nm} = 5,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{262nm} = 26,790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 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 Maltansinolde 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 ($\epsilon_{280\text{nm}} 199,560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{282\text{nm}}$: 67,850 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y DM4 ($\epsilon_{280\text{nm}} = 5,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{282\text{nm}} = 26,790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). 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

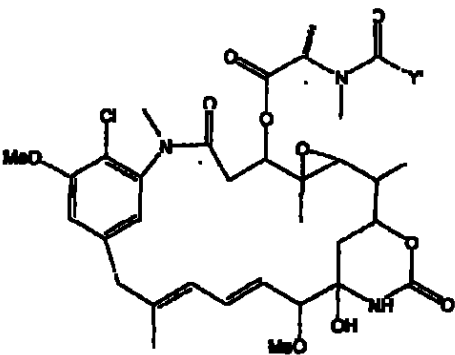
Eficacia in vivo del conjugado huB4-DM4 contra xenógrafos de tumor humano Ramos en ratones SCID

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.

REIVINDICACIONES

1. Un maitansinoide que tiene, en C-3, C-14 hidroximetil, C-15 hidroxil, o C-20 desmetilo, una cadena lateral de aminoácido acilatada con un grupo acilo que tiene un grupo sulfhidrido impedido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que tiene la funcionalidad tiol 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 en adición 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.

2. Un compuesto representado por la formula 4':



4'

en donde:

Y' representa

$$(CR_7CR_8)_1(CR_9=CR_{10})_pC=C_A(CR_5CR_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C=C)_sB_t(CR_3CR_4)_nCR_1R_2$$

SZ,

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 R_2 puede ser H;

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

5 $R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{11},$ 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;

10 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.

15 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 anillo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

3. El compuesto de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque R_1 es H, R_2 es metilo y Z es H.

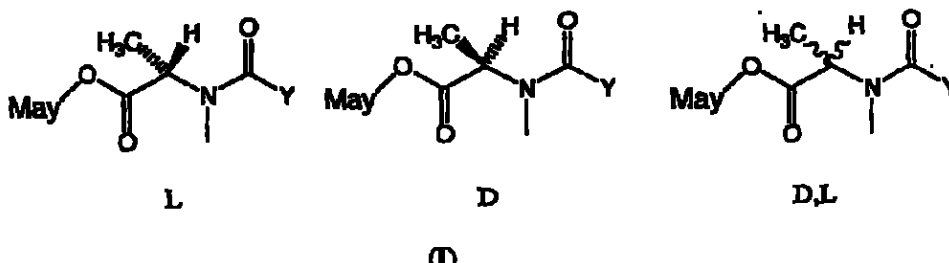
4. El compuesto de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque, en donde R_1 y R_2 son metilo y Z es H.

20 5. El compuesto de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque, en donde R_1 es H, R_2 es metilo y Z es $-SCH_3$.

6. El compuesto de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque, en donde R_1 y R_2 son metilo y Z es $-SCH_3$.

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

25



en donde:

5 Y representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ$, 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 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;

10 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;

15 I, 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

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

8. El compuesto de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, I y m son cada una 1, n es 0, y Z es H.

25 9. El compuesto de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, I y m son 1, n es 0, y Z es H.

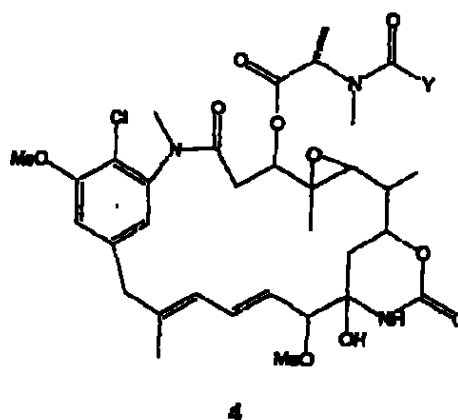
10. El compuesto de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, I y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -

SCH₃.

11. El compuesto de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque R₁ y R₂ son metilo, R₃, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

12. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o 12, caracterizado porque el compuesto está representado por la fórmula (I-L).

13. Un compuesto representado por la fórmula 4:



en donde:

Y representa (CR₇CR₈)_l(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂SZ, 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 una 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 anillo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

14. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H; l y m son cada una 1; n es 0; y Z es H.

5 15. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque R₁ y R₂ son metilo; R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1; n es 0; y Z es H.

16. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, l y m son cada una 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

10 17. El compuesto de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

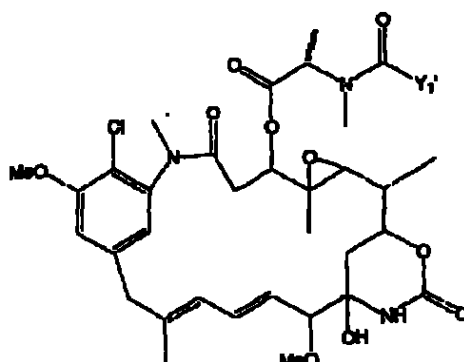
15 18. Un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular que comprende por lo menos un maitansinoide enlazado al agente de enlace celular, en donde el agente de enlace celular es enlazado al maitansinoide utilizando la funcionalidad tiol o disulfuro que está presente en el grupo acilo de una cadena lateral de aminoácido acilada encontrada en C-3, C-14 hidroximetil, C-15 hidroxil o C-20 desmetilo del maitansinoide, y en donde el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácido acilada tiene su funcionalidad tiol o disulfuro ubicada en un 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
20 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.

25 19. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el agente de enlace celular comprende por lo menos un sitio de enlace de un anticuerpo.

20. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque el anticuerpo es MY9, anti-B4 o C242.

21. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque el anticuerpo es MY9 humanizado o de superficie adicional, anti-B4 humanizado o de superficie adicional, o C242 humanizado o de superficie adicional.

22. Un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular, en donde el maitansinoide está representado por la formula 4₁':



en donde:

4₁'

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;

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 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 ningún momento.

23. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque R₁ es H y R₂ es metilo.

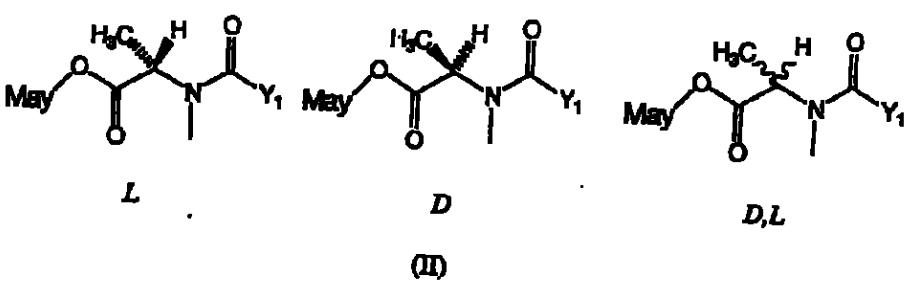
24. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque R₁ y R₂ son metilo.

25. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con cualquiera de las reivindicación 22, 23 o 24, caracterizado porque el agente de enlace celular comprende por lo menos un sitio de enlace de un anticuerpo.

26. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el anticuerpo es MY9, anti-B4 o C242.

27. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el anticuerpo es MY4 humanizado o de superficie adicional MY4, anti-B4 humanizado o de superficie adicional, o C242 humanizado o de superficie adicional.

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



en donde:

Y representa (CR₇CR₈)₁(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂S⁻, 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 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

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 independientemente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0; y

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

29. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque 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.

10 30. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque 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.

15 31. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el maitansinoide está representado por la fórmula (II-L).

32. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque el maitansinoide está representado por la fórmula (II-L).

20 33. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque el maitansinoide está representado por la fórmula (II-L).

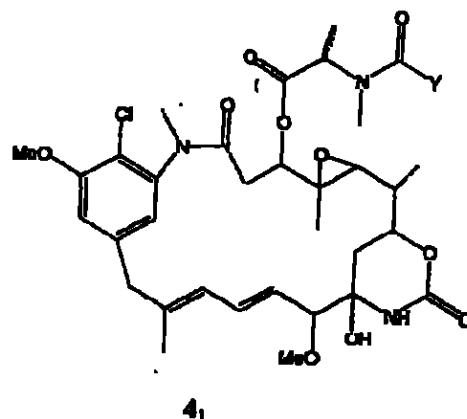
34. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 28 a 32 o 33, caracterizado porque el agente de enlace celular comprende por lo menos un sitio de enlace de un anticuerpo.

25 35. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el anticuerpo es MY9, anti-B4 o C242.

36. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la

reivindicación 34, caracterizado porque el anticuerpo es MY9 humanizado o de superficie adicional, anti-B4 humanizado o de superficie adicional, o C242 humanizado o de superficie adicional.

37. Un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular, caracterizado porque el maitansinoide está representado por la fórmula 4₁:



en donde:

Y₁ representa (CR₇CR₈)₁(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂S-, 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 una de manera independiente un entero desde 1 hasta 5, y además n puede ser 0.

38. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada

uno H; l y m son cada una 1; n es 0.

39. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque R₁ y R₂ son metilo; R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1; n es 0.

5 40. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 37, 38 o 39, caracterizado porque el agente de enlace celular comprende por lo menos un sitio de enlace de un anticuerpo.

41. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque el anticuerpo es MY9, anti-B4 o C242.

10 42. El conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque el anticuerpo es MY9 humanizado o de superficie adicional, anti-B4 humanizado o de superficie adicional, o C242 humanizado o de superficie adicional.

15 43. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24, 28 a 33, 37, 38 o 39, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 44. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 25, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 45. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 26, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

46. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 27, una sal

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

5 47. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 34, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 48. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 35, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 49. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 36, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 40, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

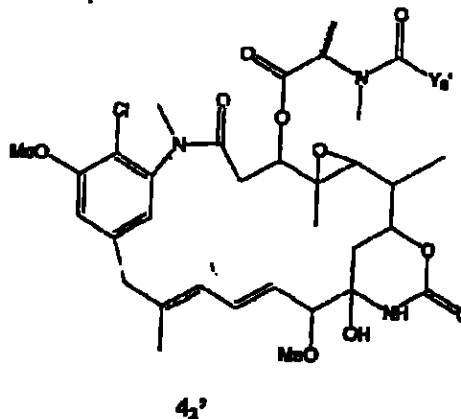
20 51. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 41, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 52. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 42, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

53. Un método de esterificación de un maitansinoide en C-3, C-14 hidroximetil, C-

15 hidroxil, o C-20 desmetil, con un aminoácido acilado en donde el grupo acilo tiene un grupo sulfhidrilo protegido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que tiene el grupo sulfhidrilo protegido tiene uno o dos sustituyentes, dichos sustituyentes que son 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 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 hidroximetil, C-15 hidroxil, o C-20 desmetil, con el aminoácido acilado en donde el grupo acilo tiene un grupo sulfhidrilo protegido.

54. Un método para la esterificación de maitansinol para dar a maitansinoide de la fórmula 42:



en donde:

Y_2' representa



en donde:

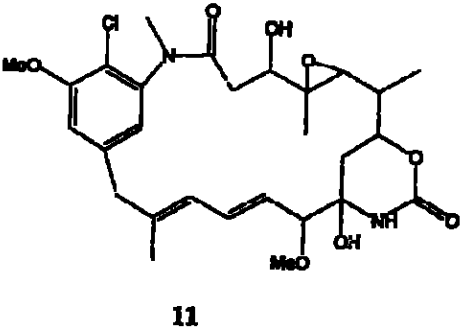
R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,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

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

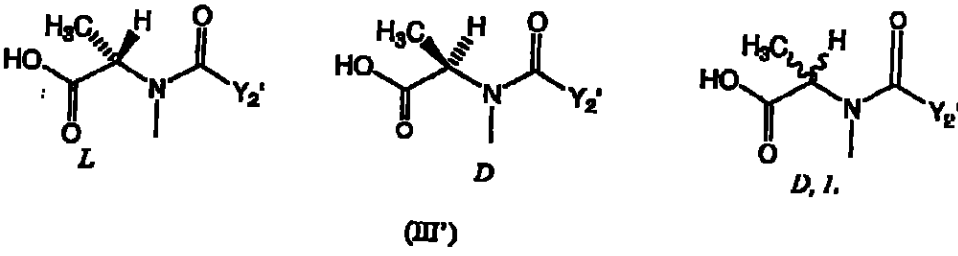
R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenil sustituido o radical heterocíclico aromático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

Z₂ 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, dicho método que comprende hacer reaccionar maitansinol de la estructura 11 en C3:



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



er
Y₂' representa
(CR₇CR₈)₁(CR₉=CR₁₀)_pC=C_qA_r(CR₅CR₆)_mD_u(CR₁₁=CR₁₂)_t(C=C)_sB_v(CR₃CR₄)_nCR₁R₂

SZ₂,

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;

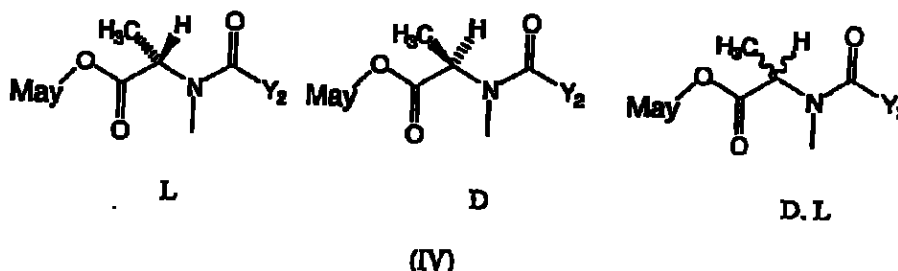
l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno de manera independiente 0 o un entero desde 1 hasta 5, a condición de que por lo menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no sean cero en ningún momento; y

Z₂ 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.

55. El método de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque el compuesto de la fórmula (I) está representado por la fórmula (I-L).

56. El método de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque R₁ es H y R₂ es metilo.

57. 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:

5 Y_2 representa

$(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

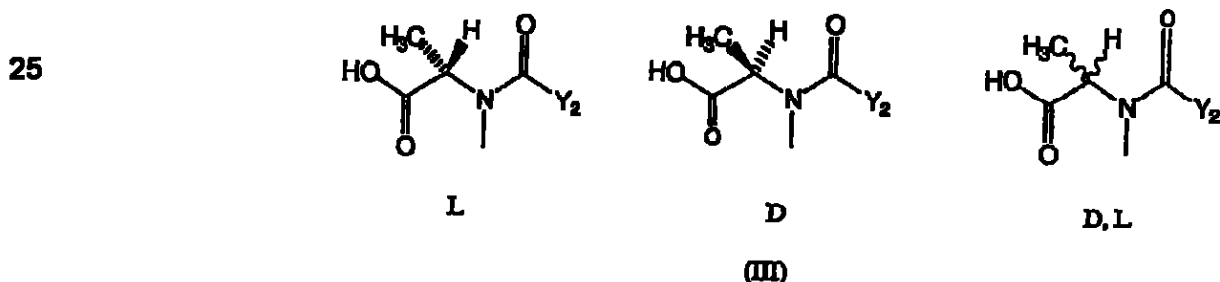
10 R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo,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

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

20 Z_2 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; y

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



en donde:

Y_2 representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$, 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 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;

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.

58. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque 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.

59. El método de conformidad con la reivindicación 58, caracterizado porque el compuesto de la fórmula (I) está representado por la fórmula (I-L).

60. El método de conformidad con la reivindicación 58, caracterizado porque el compuesto de fórmula (III-L) es el compuesto 15a (S, S), 15b (S, R) o una mezcla de 15a (S, S) y 15b (S,R).

61. El método de conformidad con la reivindicación 58, caracterizado porque 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).

62. El método de conformidad con la reivindicación 58, caracterizado porque el compuesto de la fórmula (III-D, L) es N-metilalanina racémica acilada 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 el compuesto de la estructura 15.

63. El método de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque la mezcla de 15a (S, S) y 15b(S, R) se hace 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-metil-L-alanina para dar la mezcla de compuestos 15a(S, S) y 15b(S, R).

64. El método de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque 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;

(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).

65. El método de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque el compuesto 15b (S, R) es elaborado a través de un método que comprende:

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

(2) convertir el compuesto 25 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).

66. El método de conformidad con la reivindicación 61, caracterizado porque 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,

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

67. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque la 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 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 acilada 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.

68. El método de conformidad con la reivindicación 58, caracterizado porque 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.

69. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el compuesto de la fórmula (III-L) es el compuesto 10 que contiene N-metil-L-alanina.

70. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el compuesto de la fórmula (III-D) es el compuesto 10 que contiene N-metil-D-alanina;

71. El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque el compuesto de la fórmula (III-D, L) es el compuesto 10 que contiene N-metilalanina racémica.

72. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69, 70 o 71,

caracterizado porque el compuesto 10 que contiene N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina o N-metilalanina racémica es elaborado a través del proceso que comprende:

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

5 (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 metantioisulfonato;

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

10 (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.

73. Un método para hacer un maitansinoide a través del método de cualquiera de las reivindicaciones 57,58, 59 o 60, que comprende además separar los diastereómeros, si están presentes, y purificar el maitansinoide mediante HPLC en sílice enlazada con ciano.

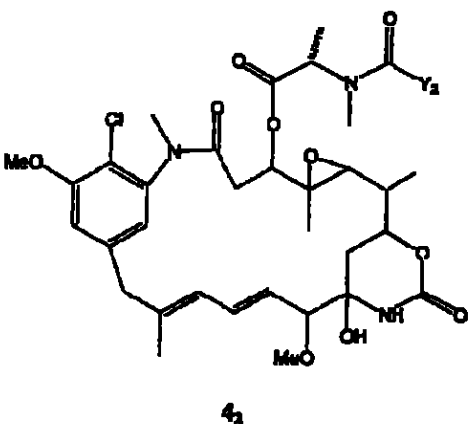
15 74. A método para hacer un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular que comprende hacer un maitansinoide purificado a través del método de conformidad con la reivindicación 73, y hacer reaccionar el maitansinoide purificado con un agente de enlace celular que comprende un grupo ditio reactivo o un grupo sulfhidrilo.

20 75. El método de conformidad con la reivindicación 74, caracterizado porque el grupo ditio reactivo es un grupo ditiopiridilo o un grupo ditiopiridilo sustituido.

76. A método para hacer un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular que comprende hacer un maitansinoide purificado a través del método de conformidad con la reivindicación 72, y hacer reaccionar el maitansinoide purificado con un agente de enlace celular que comprende un grupo maleimido o un grupo haloacetilo.

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

5



en donde:

Y₂' representa (CR₇CR₈)₁(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂SZ₂.

en donde:

10

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;

15

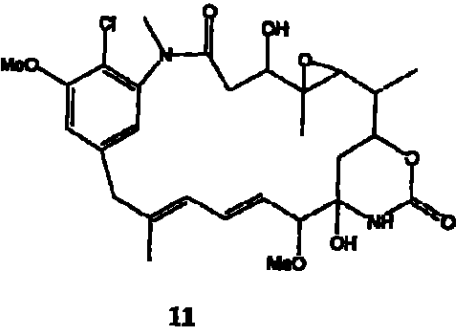
R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈, son cada uno de manera independiente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo;

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

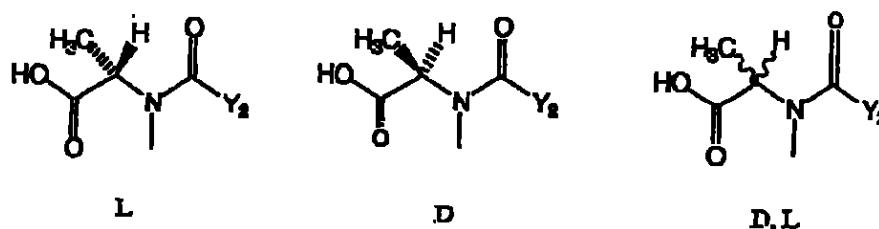
20

Z₂ 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, dicho método que comprende hacer reaccionar maitansinol de la estructura 11 en C3:

25



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



er

(III)

Y_2' representa

$(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

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

Z_2 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.

78. El método de conformidad con la reivindicación 77, caracterizado porque el

compuesto de la fórmula (I) está representado por la fórmula (I-L).

79. El método de conformidad con la reivindicación 77, caracterizado porque 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 80. El método de conformidad con la reivindicación 77, caracterizado porque 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).

81. El método de conformidad con la reivindicación 77, caracterizado porque 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).

10 82. El método de conformidad con la reivindicación 77, caracterizado porque el compuesto de la fórmula (III-D, L) es N-metilalanina racémica acilata 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 los compuestos de la estructura de 15.

15 83. El método de conformidad con la reivindicación 80, caracterizado porque 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 metilmetantiolsulfonato para dar el compuesto 13;

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

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

84. El método de conformidad con la reivindicación 80, caracterizado porque el compuesto 15a (S, S) se hace 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).

85. El método de conformidad con la reivindicación 80, caracterizado porque el compuesto 15b (S, R) se hace a través de 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

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

86. El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque mezcla de compuestos 15 (R, S) y 15 (R, R) puede hacerse a través de un proceso que comprende:

10 (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).

15 87. El método de conformidad con la reivindicación 82, caracterizado porque la N-metilalanina racémica acilata 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 los compuestos de la estructura de 15 se hace a través de un proceso que comprende:

20 (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 acilata 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 los compuestos de la estructura 15.

25

88. El método de conformidad con la reivindicación 77, caracterizado porque R₁ y

R_2 son metilo; R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H; l y m son 1; y n es 0.

89. El método de conformidad con la reivindicación 77, caracterizado porque el compuesto de la fórmula (III-L) es el compuesto 10 que contiene N-metil-L-alanina.

5 90. El método de conformidad con la reivindicación 77, caracterizado porque el compuesto de la fórmula (III-D) es el compuesto 10 que contiene N-metil-D-alanina.

91. El método de conformidad con la reivindicación 77, caracterizado porque el compuesto de la fórmula (III-D,L) es el compuesto 10 que contiene N-metil-alanina racémica.

10 92. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 89, 90 o 91, caracterizado porque el compuesto 10 que contiene N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina o N-metilalanina racémica se hace a través de un proceso que comprende:

(1) hacer reaccionar 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);

15 (3) convertir el compuesto 7 en el disulfuro 8 mediante la reacción con metilmetantiolsulfonato;

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

20 (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.

93. El método para hacer un maitansinoide de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 77, 79 o 88, que comprende además separar los diastereómeros, si están presentes, y purificar el maitansinoide mediante HPLC sobre sílice enlazada con ciano.

25 94. Un método para hacer un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular que comprende elaborar un maitansinoide purificado a través del método de conformidad con la reivindicación 93, y hacer reaccionar el maitansinoide purificado con un agente de enlace celular que comprende un grupo ditio reactivo o un grupo sulfhidrilo.

95. El método de conformidad con la reivindicación 94, caracterizado porque el grupo ditio reactivo es un grupo ditiopiridilo o un grupo ditiopiridilo sustituido.

5 96. Un método para hacer un conjugado de maitansinoide-agente de enlace celular que comprende elaborar un maitansinoide purificado a través del método de conformidad con la reivindicación 93, y hacer reaccionar el maitansinoide purificado con un agente de enlace celular que comprende un grupo maleimido o un grupo haloacetilo.

10 97. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que necesita el tratamiento una cantidad efectiva del conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24, 28 a 33, 37, 38 o 39, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma.

98. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que necesita el tratamiento una cantidad efectiva del conjugado de conformidad con la reivindicación 25, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma.

15 99. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que necesita el tratamiento una cantidad efectiva del conjugado de conformidad con la reivindicación 26, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma.

100. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que necesita el tratamiento una cantidad efectiva del conjugado de conformidad con la reivindicación 27, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma.

20 101. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que necesita el tratamiento una cantidad efectiva del conjugado de conformidad con la reivindicación 34, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma.

25 102. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que necesita el tratamiento una cantidad efectiva del conjugado de conformidad con la reivindicación 35, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma.

103. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que necesita el tratamiento una cantidad efectiva del conjugado de conformidad con la

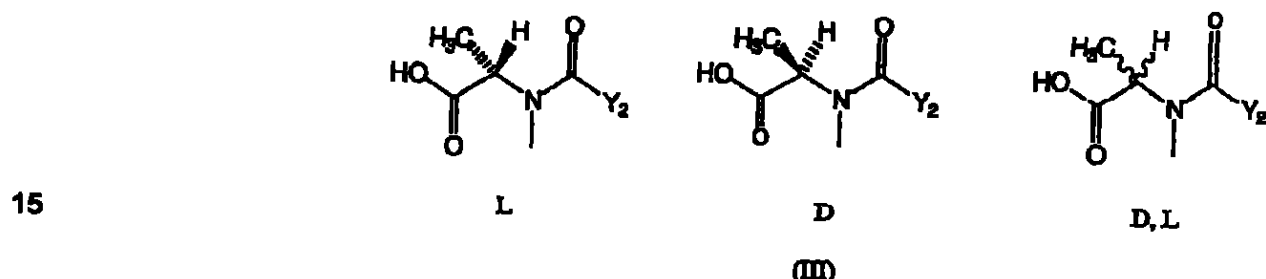
reivindicación 36, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma.

104. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que necesita el tratamiento una cantidad efectiva del conjugado de conformidad con la reivindicación 40, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma.

5 105. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que necesita el tratamiento una cantidad efectiva del conjugado de conformidad con la reivindicación 41, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma.

106. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que necesita el tratamiento una cantidad efectiva del conjugado de conformidad con la
10 reivindicación 42, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma.

107. Un compuesto de la fórmula III:



en donde:

Y_2 representa $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2SZ_2$, en donde:

20 R_1 y R_2 son cada uno de manera independiente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que 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 can be 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 ramificado 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;

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 lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo.

5 108. Compuestos 10(S), 10 (R) o racémico 10.

109. Un método para hacer 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 anión de acetonitrilo para dar el compuesto 6;

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

(3) convertir el compuesto 7 en disulfuro 8 mediante reacción con metilmetantiolsulfonato;

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

15 (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.

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

111. Un método para hacer a 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); y

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

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

113. 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_e).

114. 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 los compuestos de una estructura de 15.

115. Un método para hacer 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 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 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 los compuestos de la estructura 15.

116. Compuesto 15a (S, S).

117. Un 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).

118. Compuesto 15b (S, R).

119. Un 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).

5 120. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 2, 8, 13 o 108, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 121. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 122, que comprende además un anticuerpo.

15 122. Un método para inducir la eliminación celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células objetivo o tejido que contiene células objetivo con una cantidad efectiva de un maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24, 28 a 33, 37 a 40 o 41, una sal o solvato de la misma.

 123. Un método para inducir la eliminación celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células objetivo o tejido que contiene células objetivo con una cantidad efectiva de un maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 25, una sal o solvato de la misma.

20 124. Un método para inducir la eliminación celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células objetivo o tejido que contiene células objetivo con una cantidad efectiva de un maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 26, una sal o solvato de la misma.

25 125. Un método para inducir la eliminación celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células objetivo o tejido que contiene células objetivo con una cantidad efectiva de un maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 27, una sal o solvato de la misma.

126. Un método para inducir la eliminación celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células objetivo o tejido que contiene células objetivo con una cantidad efectiva de un maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 34, una sal o solvato de la misma.

5 127. Un método para inducir la eliminación celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células objetivo o tejido que contiene células objetivo con una cantidad efectiva de un maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 35, una sal o solvato de la misma.

10 128. Un método para inducir la eliminación celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células objetivo o tejido que contiene células objetivo con una cantidad efectiva de un maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 36, una sal o solvato de la misma.

15 129. Un método para inducir la eliminación celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células objetivo o tejido que contiene células objetivo con una cantidad efectiva de un maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 42, una sal o solvato de la misma.

20 130. Un método para inducir la eliminación celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células objetivo o tejido que contiene células objetivo con una cantidad efectiva de un maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 43, una sal o solvato de la misma.

25 131. Un método para inducir la eliminación celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células objetivo o tejido que contiene células objetivo con una cantidad efectiva de un maitansinoide-agente de enlace celular de conformidad con la reivindicación 44, una sal o solvato de la misma.

RESUMEN

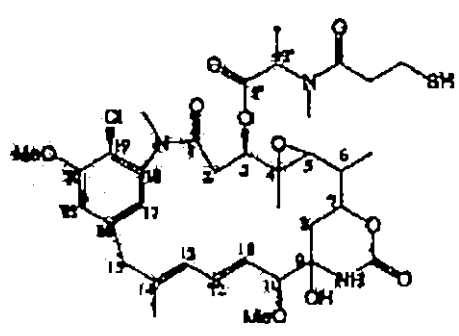
Se describen nuevos maitansinoides que contienen tiol y disulfuro que tienen una sustitución mono o di-alquilo en el átomo alfa-carbono que tiene el átomo de azufre. Se describen también métodos para la síntesis de estos nuevos maitansinoides y métodos para el enlace de esos nuevos maitansinoides a agentes 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.

5

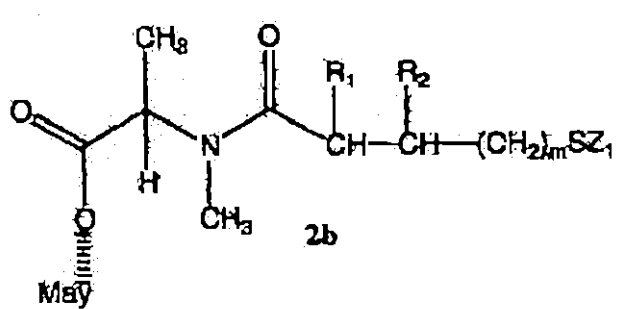
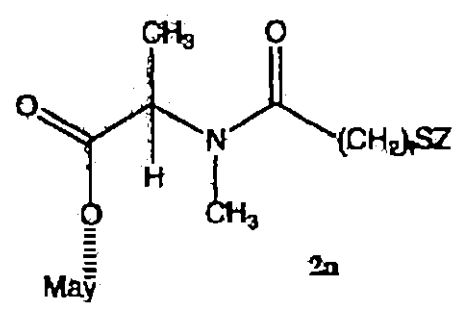
10

Folios 132 y 133
Tarjetas
@

FIG. 1

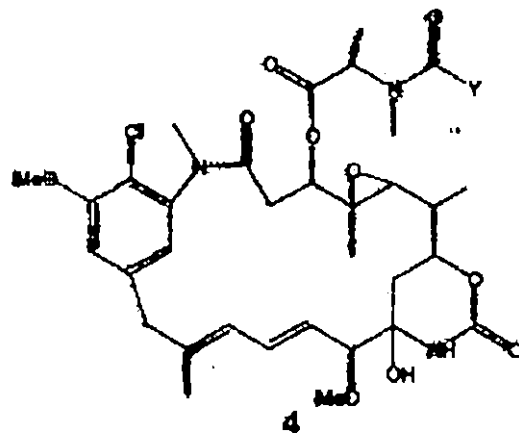


DMI (1)



(May = maytansinoid)

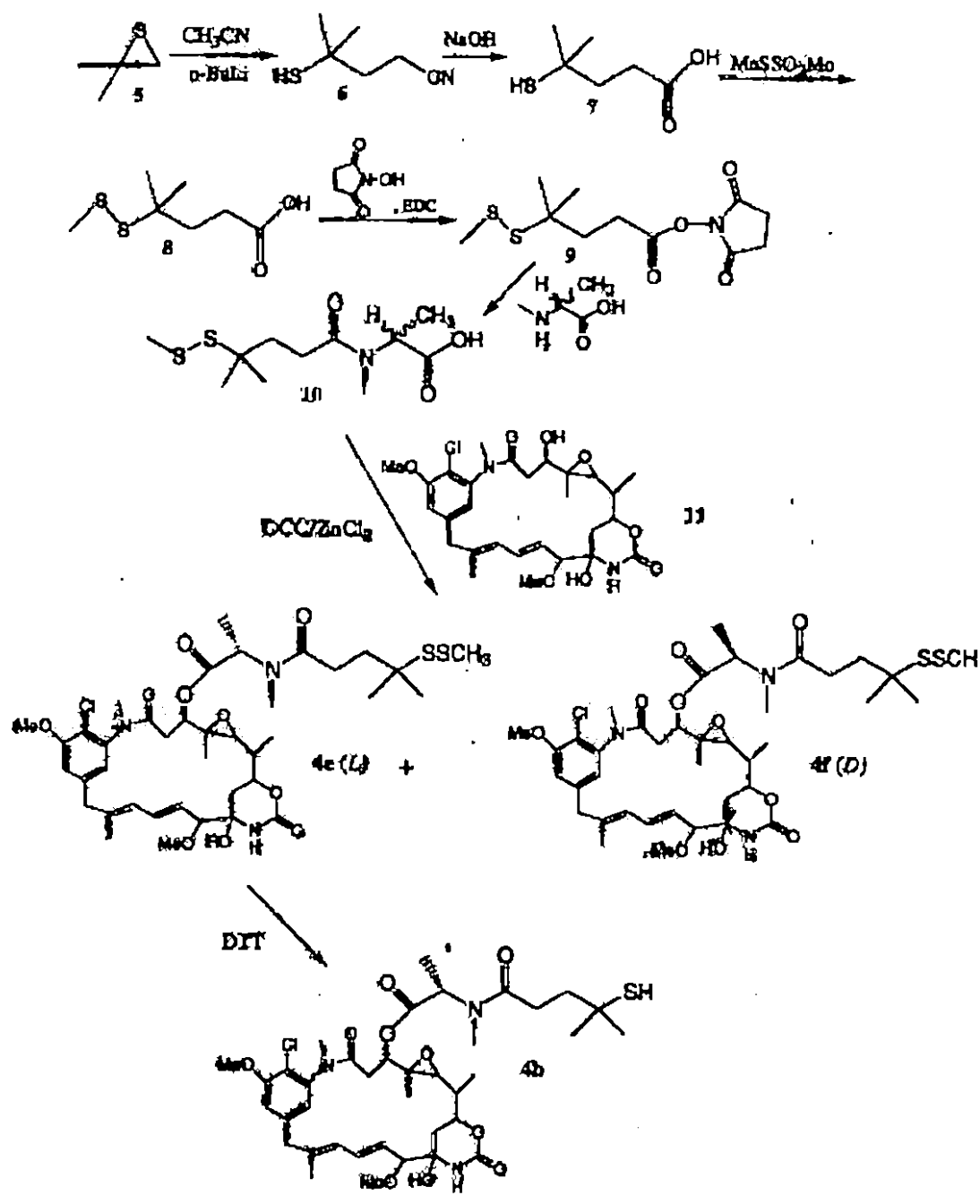
FIG. 2



$$Y = (CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$$

- DMS (4a): $R_1, R_3, R_6, R_7, R_8 = H; R_2 = CH_3$
 $l = 1, m = 1, n = 0$
 $Z = H$
- DMS-SMe (4c): $R_1, R_3, R_6, R_7, R_8 = H; R_2 = CH_3$
 $l = 1, m = 1, n = 0$
 $Z = SCH_3$
- DMS (4b): $R_3, R_6, R_7, R_8 = H; R_1, R_2 = CH_3$
 $l = 1, m = 1, n = 0$
 $Z = H$
- DMS-SMe (4e): $R_3, R_6, R_7, R_8 = H; R_1, R_2 = CH_3$
 $l = 1, m = 1, n = 0$
 $Z = SCH_3$

FIG. 3a



3b

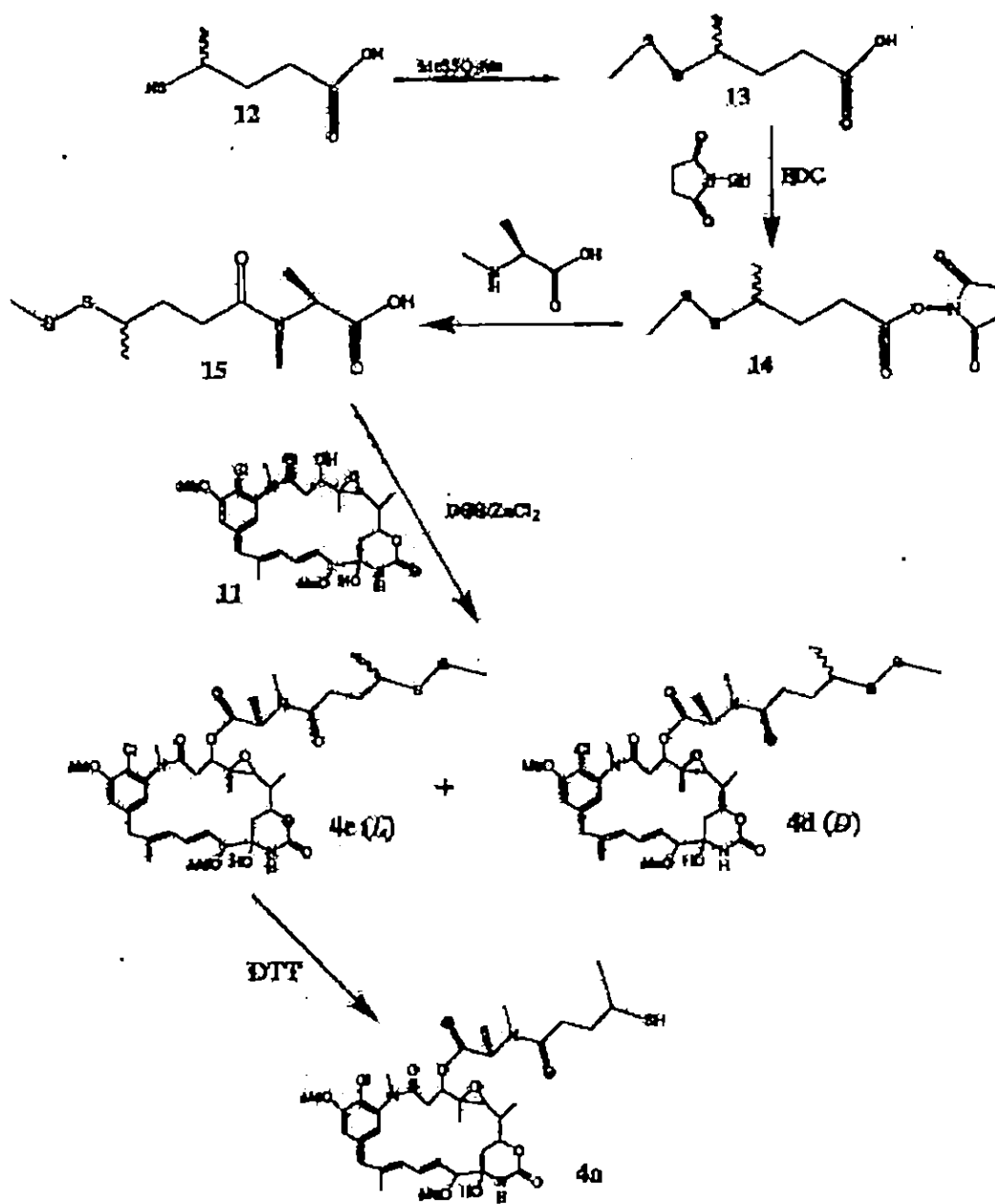


FIG. 3c

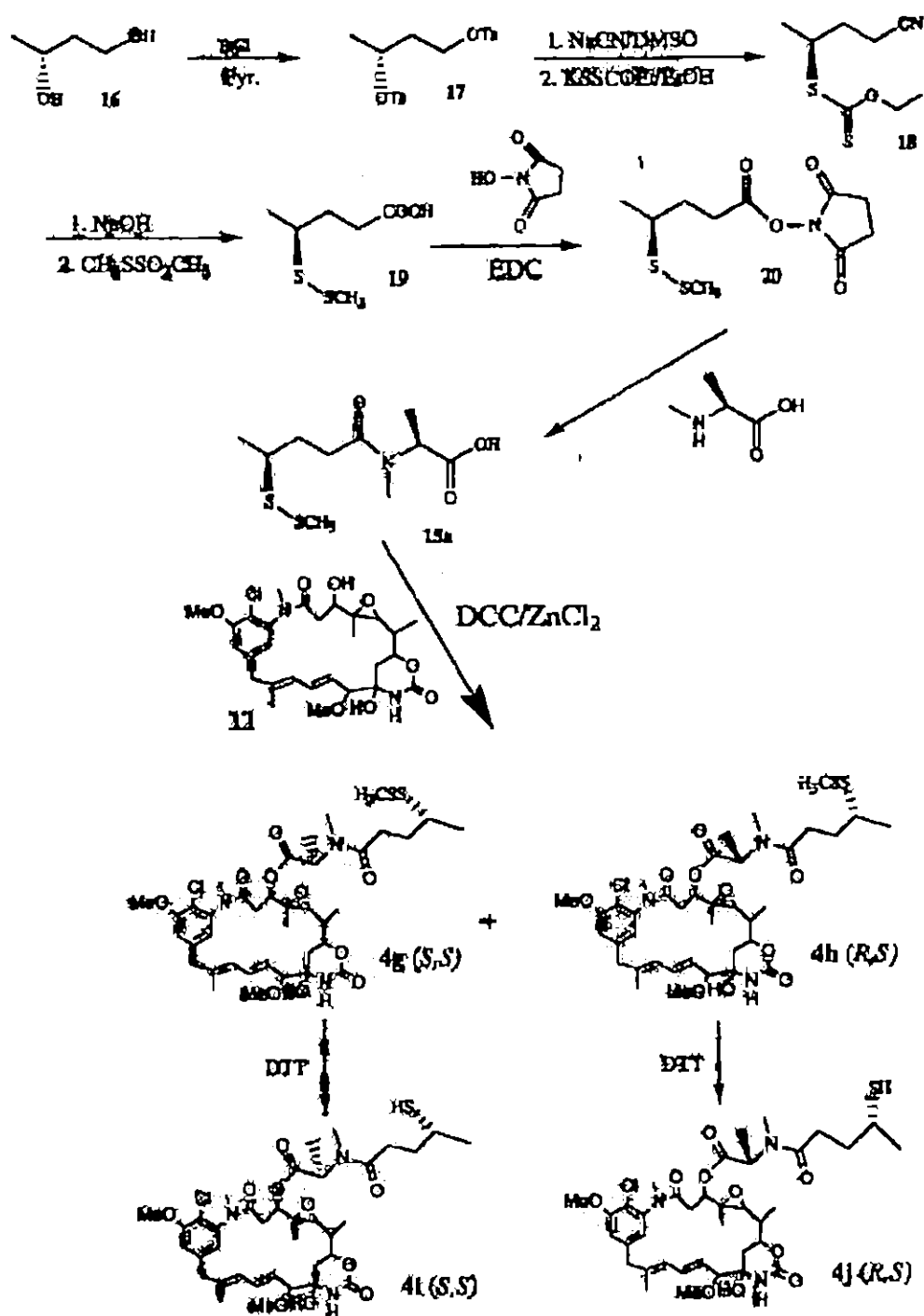


FIG. 3d

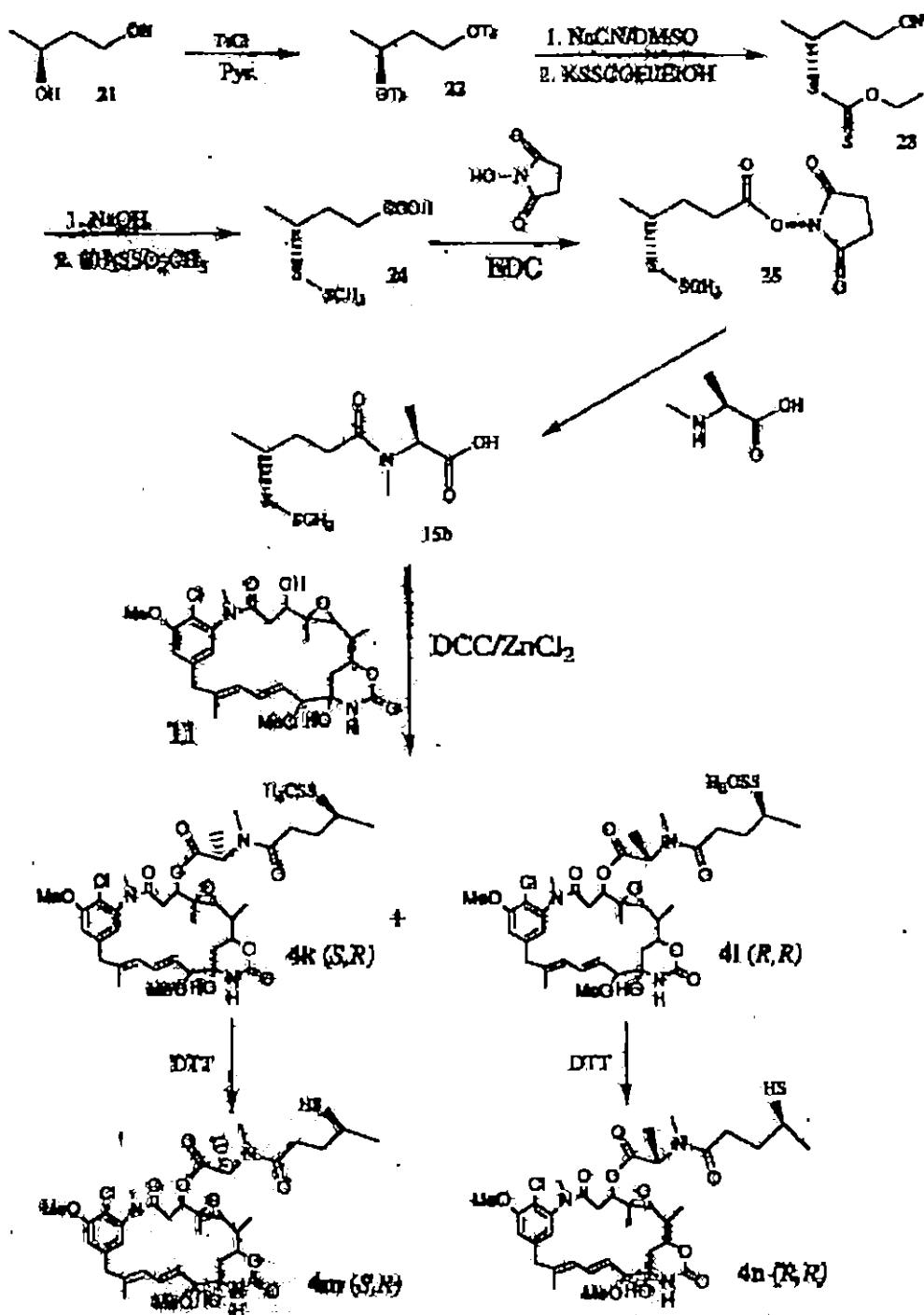
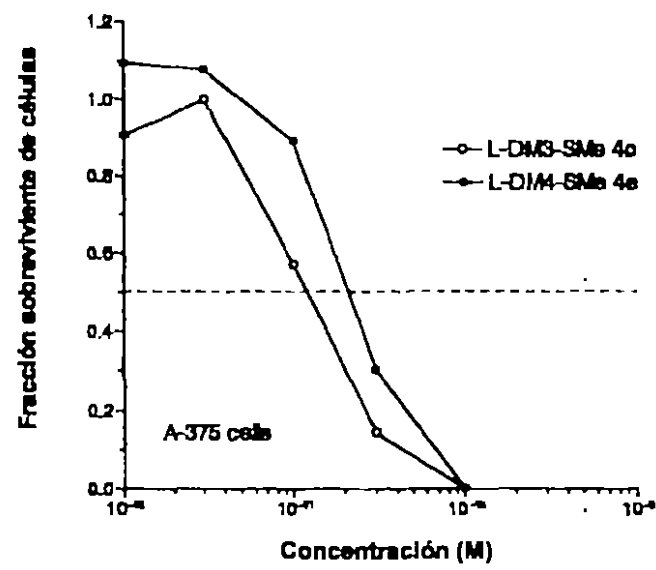


FIGURA 4

a) Citotoxicidad in vitro hacia células A-375



b) Citotoxicidad in vitro hacia células SK-BR-3

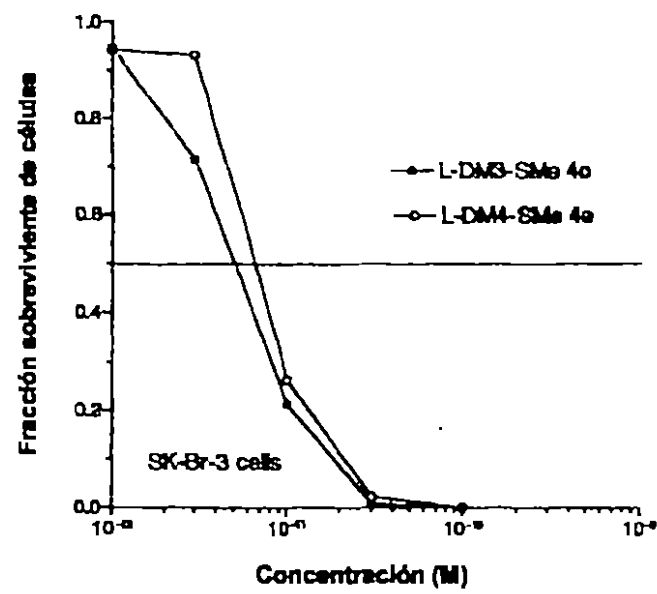
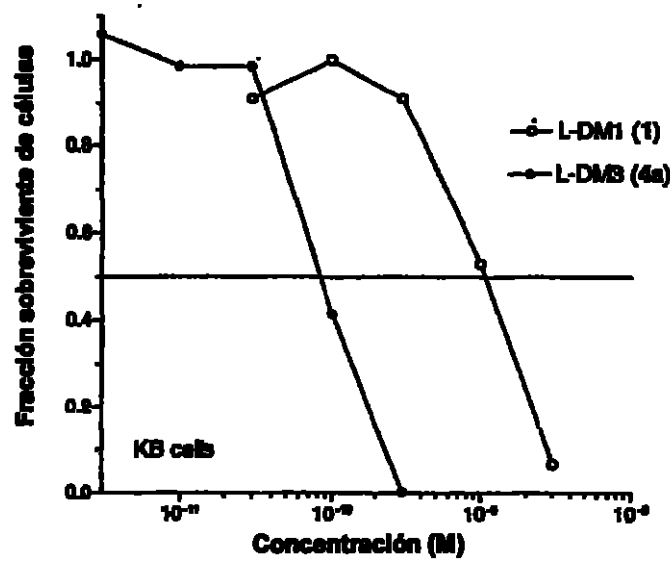


FIGURA 4

c) Citotoxicidad in vitro hacia células KB



d) Citotoxicidad in vitro hacia células SK-Br-3

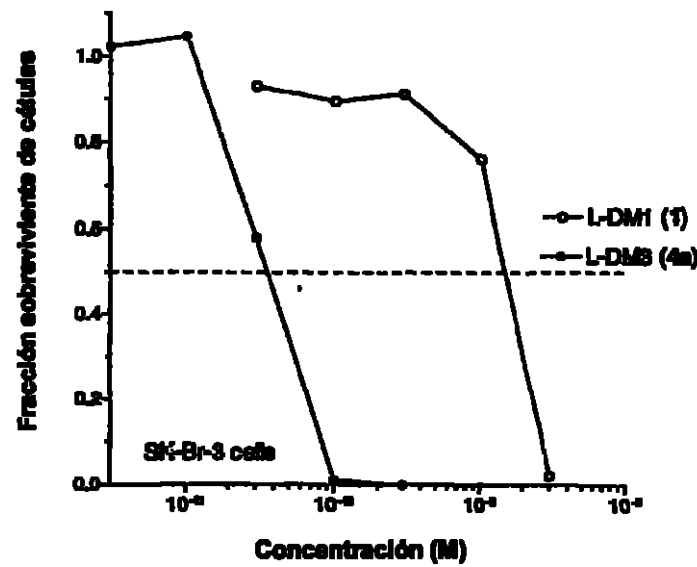


FIG. 5a

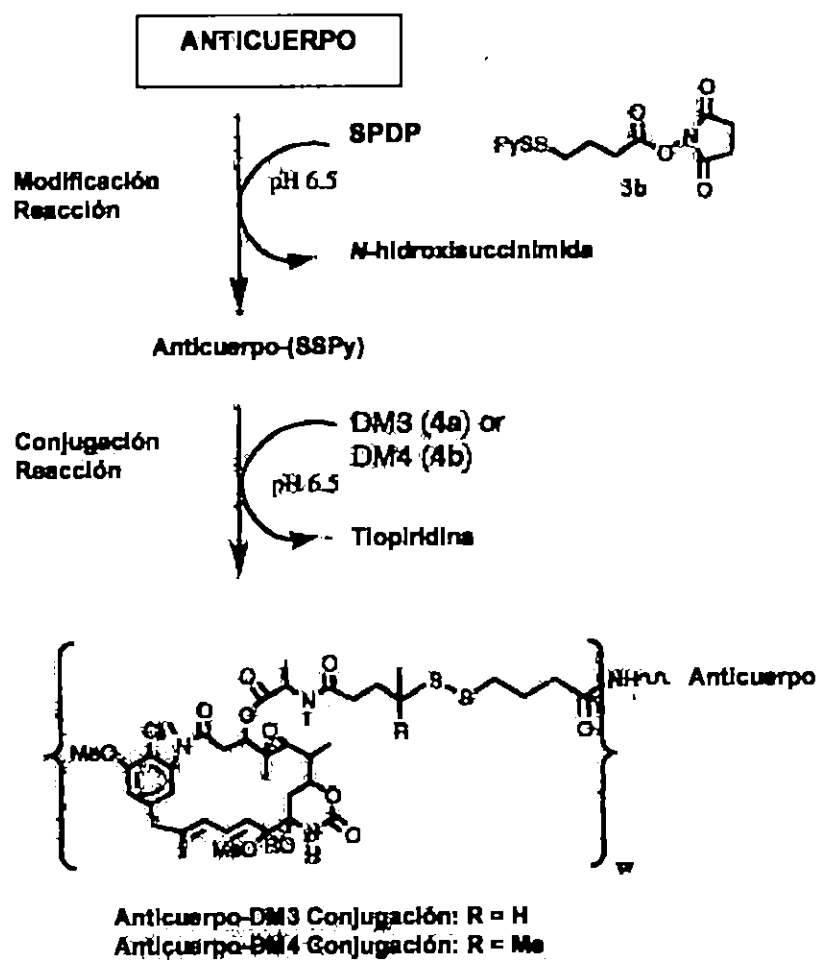


FIG. 5b

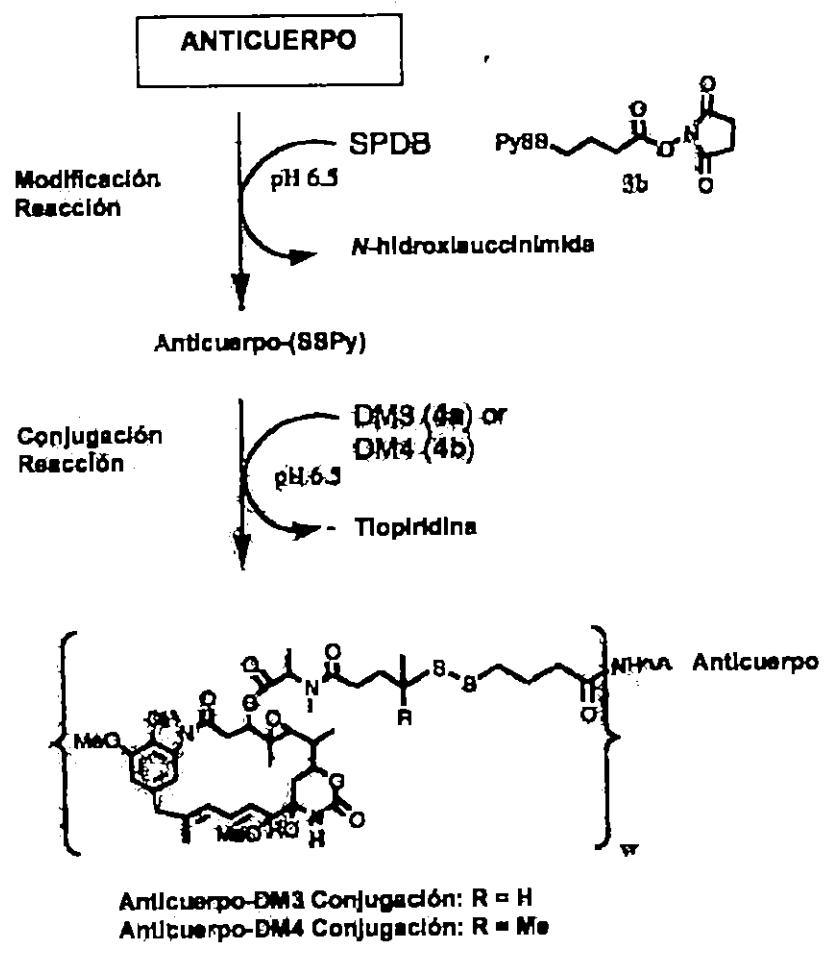


FIG. 5c

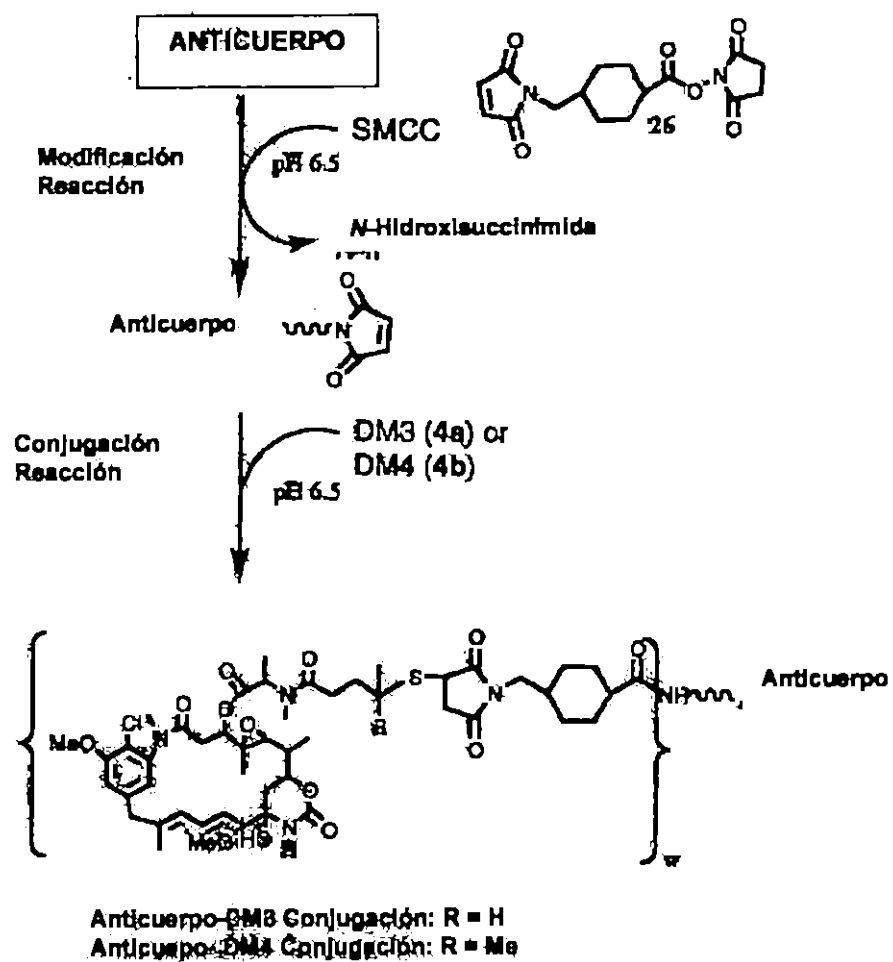
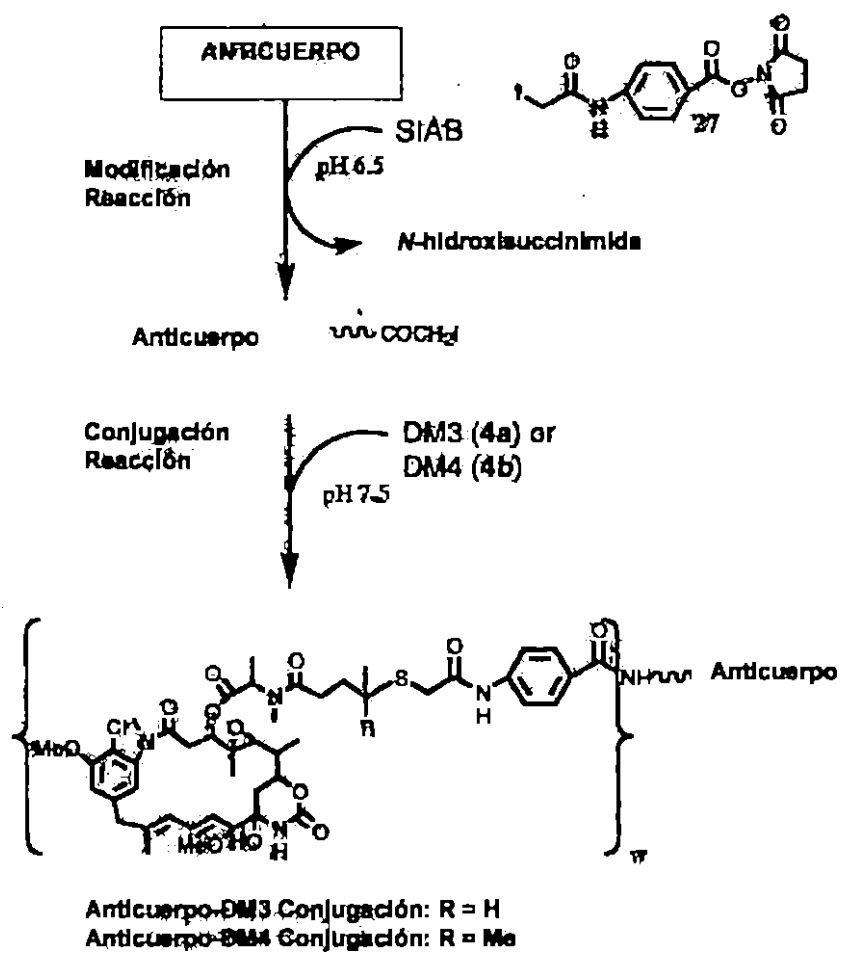


FIG. 5d



a) Citotoxicidad y especificidad In Vitro del huC242-DM3 y huC242-DM4 Conjugaciones

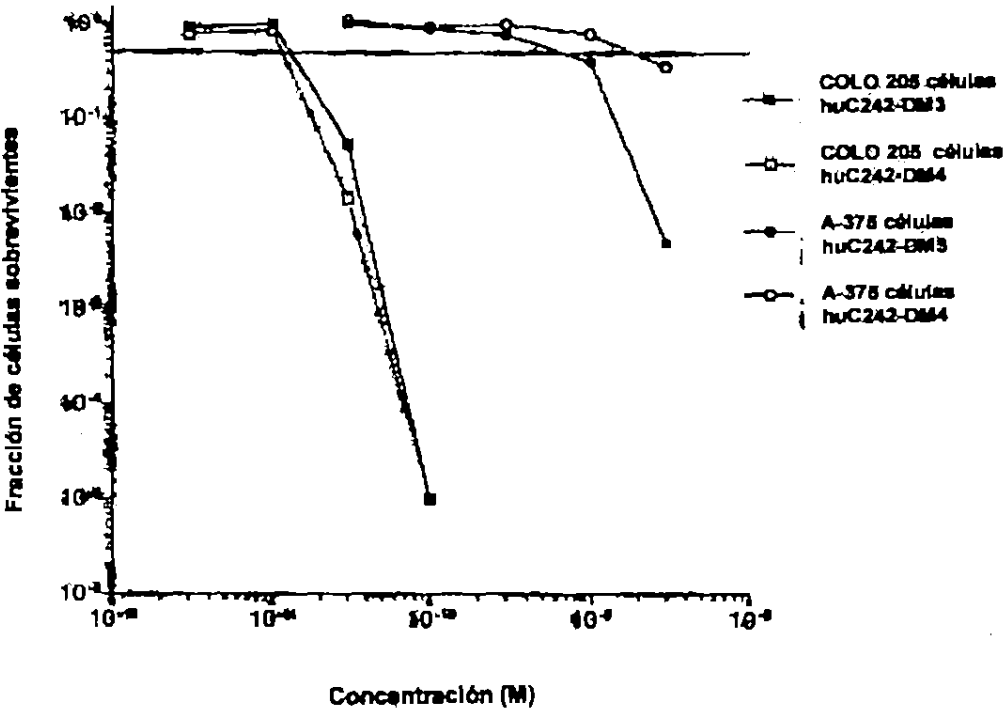


FIGURA 7

Eficacia In vivo de Conjugados huC242-Maltansinólde (Xenógrafos HT-29).

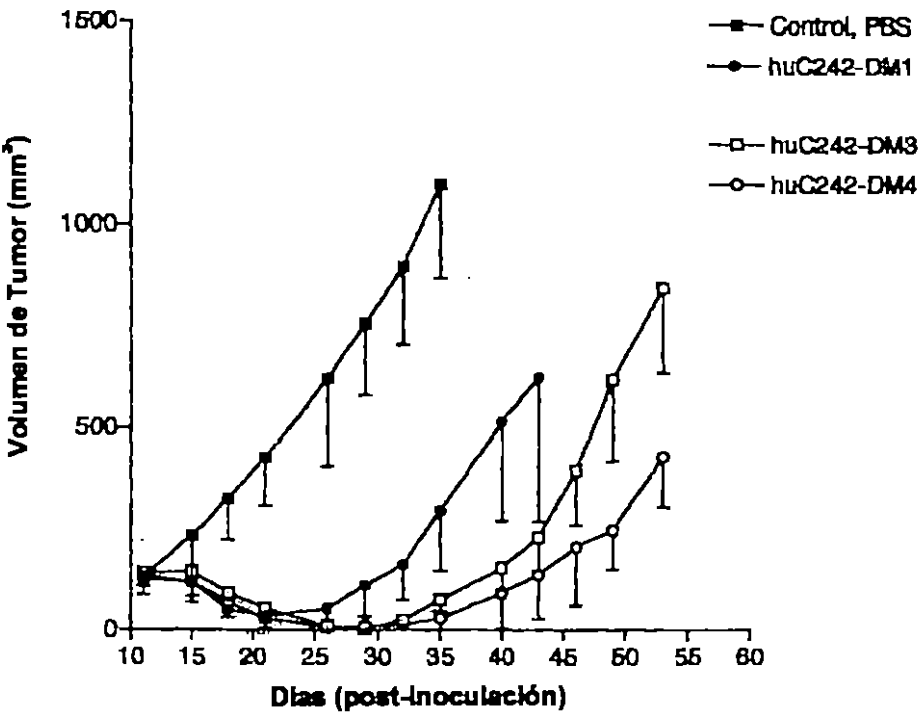


FIGURA 8

Eficacia in vivo de Conjugados huC242-Maltansinólde (Xenógrafos COLO-205).

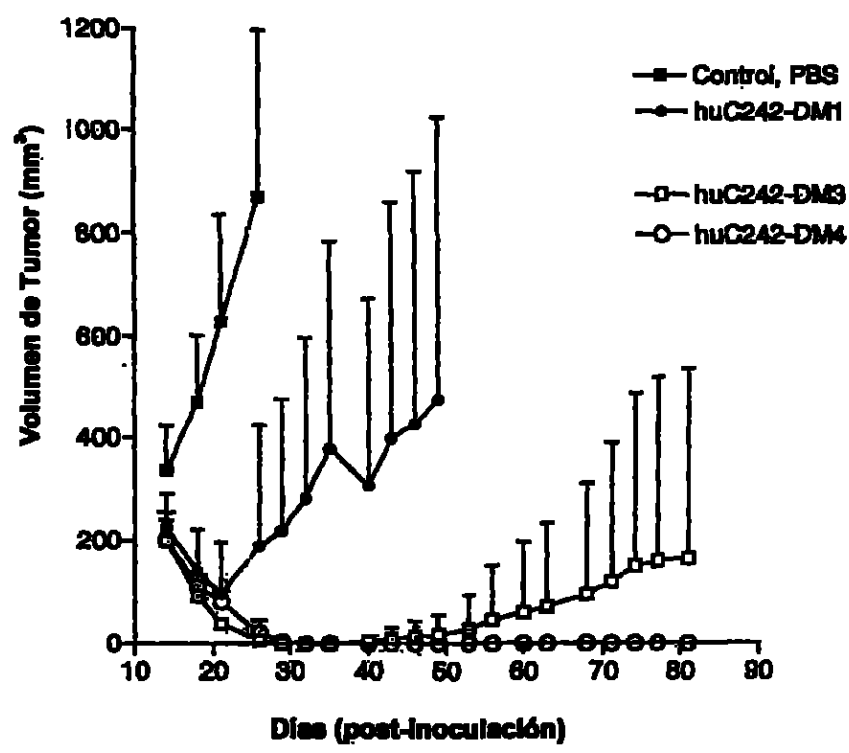


FIGURA 9

Eficacia in vivo de Conjugados MY-9-6-Maltansinólde (Xenógrafos HL60).

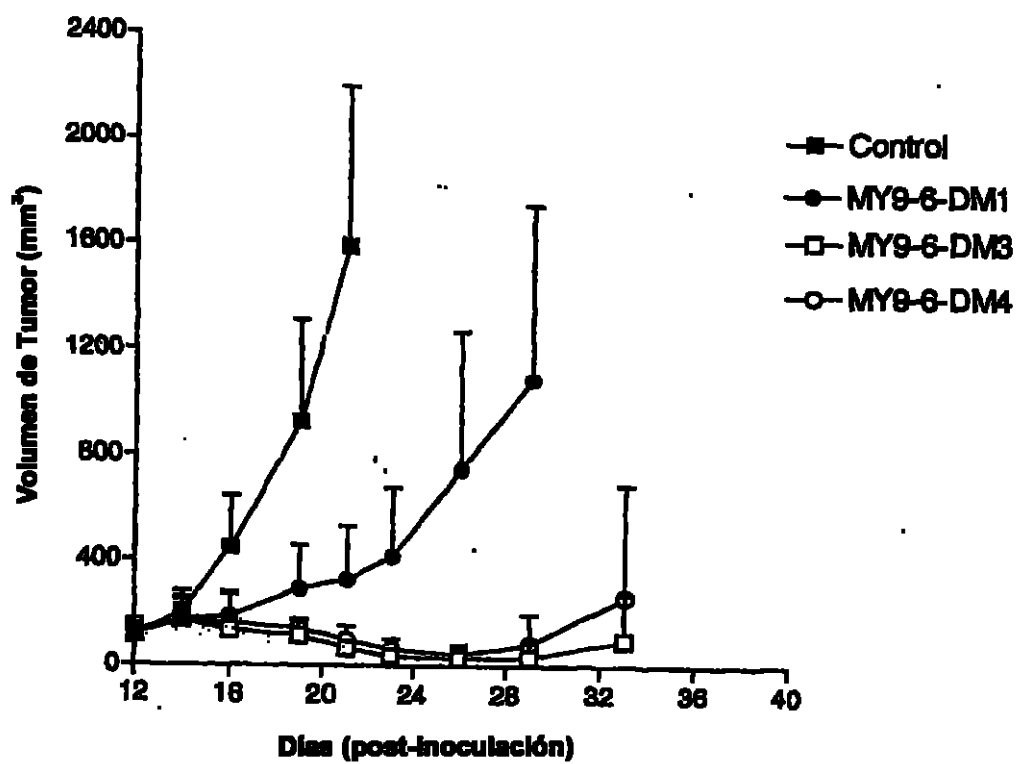


FIG. 10.- Actividad In Vitro del análisis de la citotoxicidad: HuMy9-6-DM4 hacia las células antígeno-positivas HL-60 y las células antígeno negativas de Namaiwa.

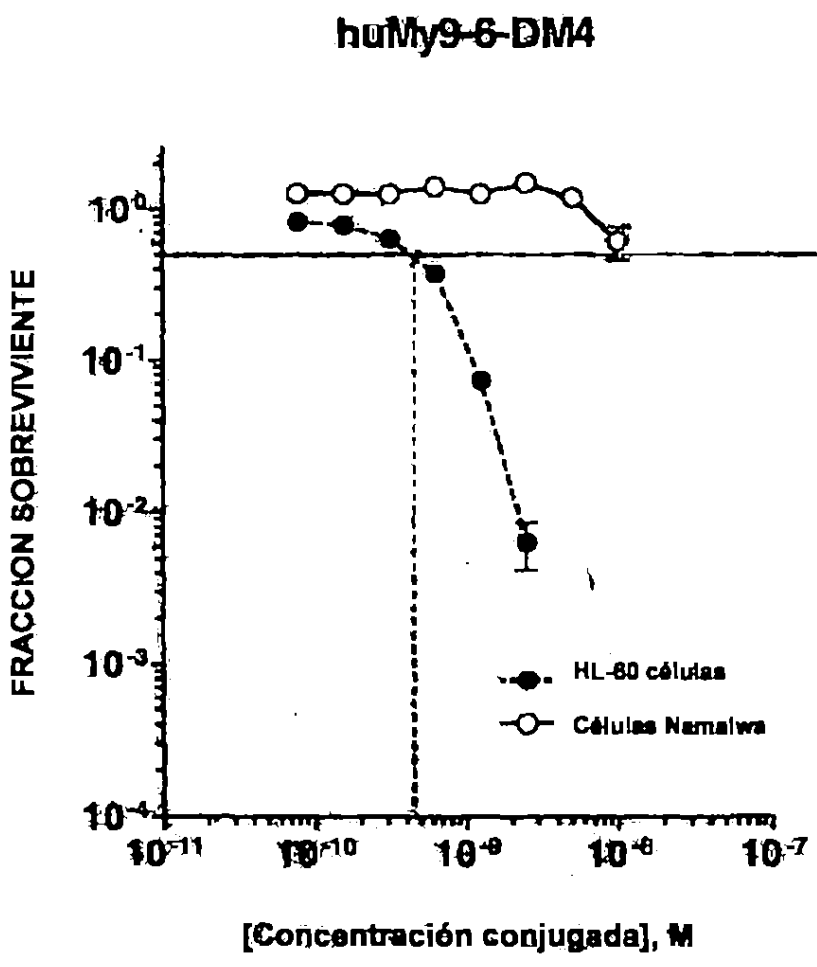


FIG. 11.- Comparación en vivo de la eficacia de las conjugaciones huMy9-6-DM4 y huMy9-6-DM1 contra HL-60 tumor humano xenoinjertado en ratones SCID.

149

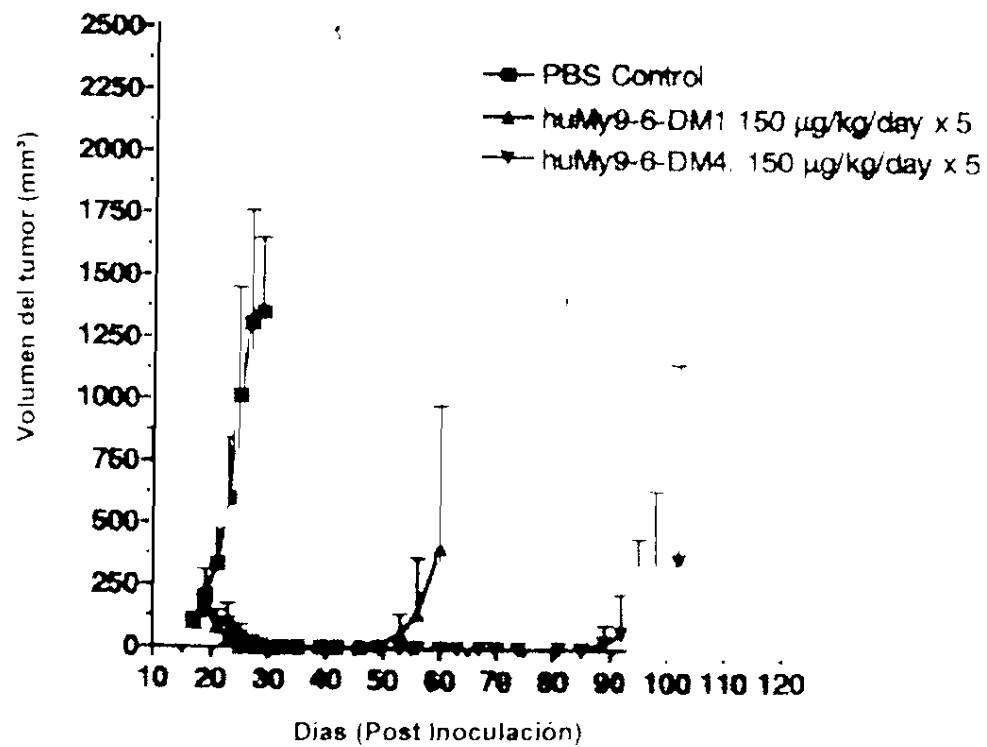


FIG. 12.- Análisis In Vitro de la citotoxicidad de huB4-DM4

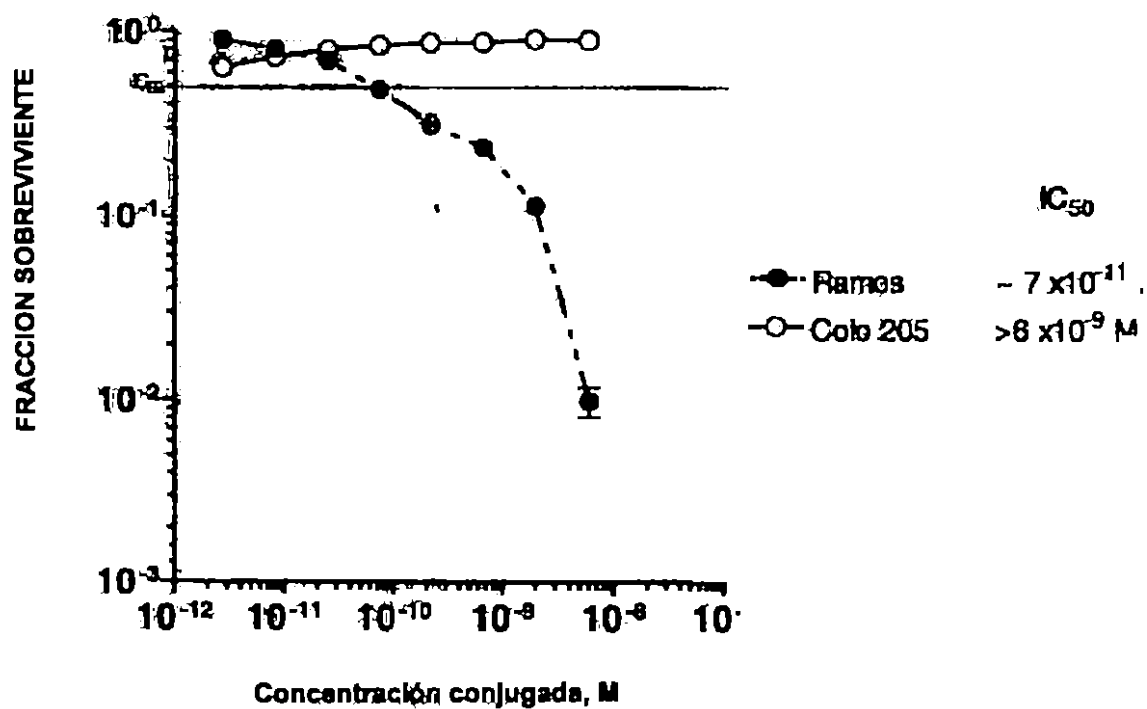


FIGURA 13a.- Eficacia en vivo de la conjugación huB4-DM4 contra xenoinjertos Ramos en ratones SCID.

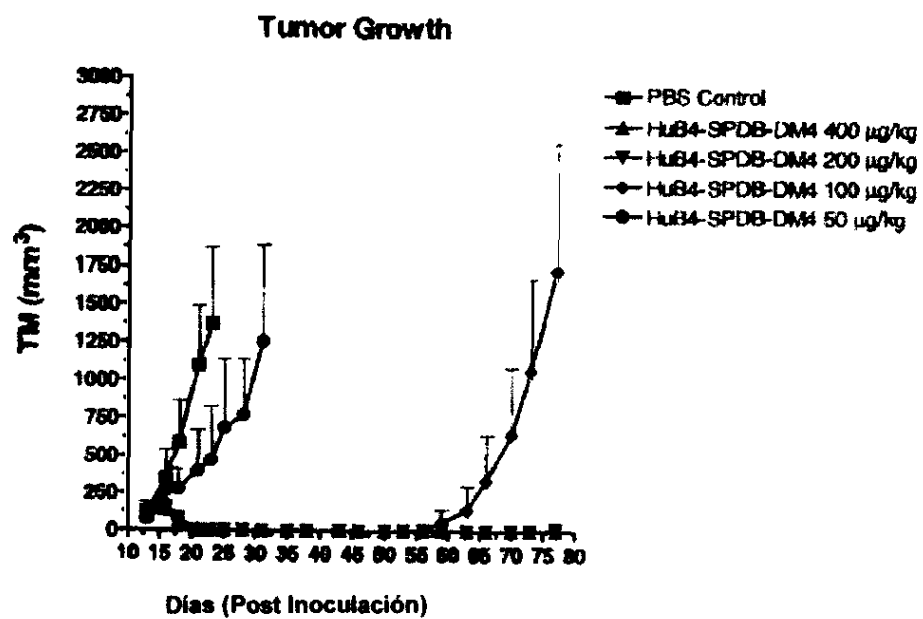
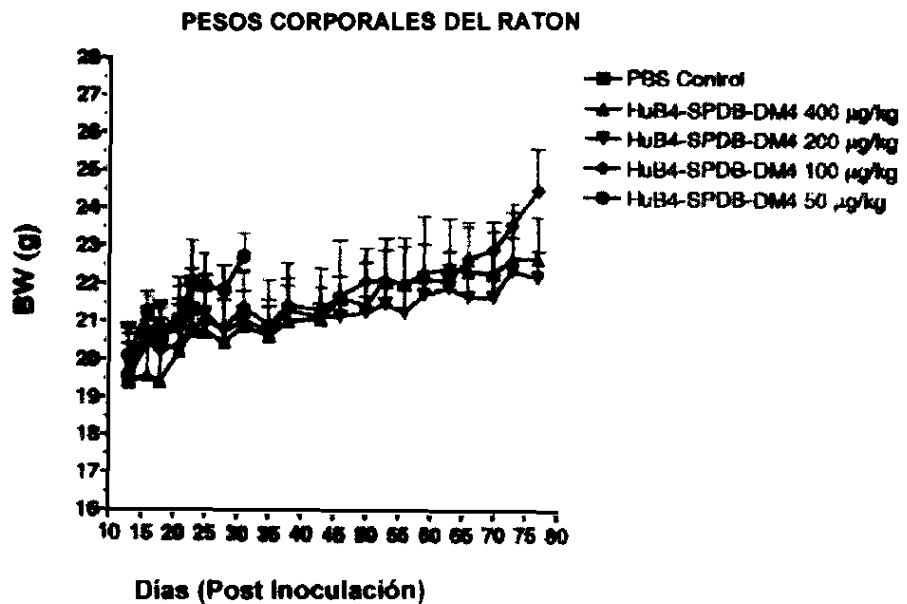
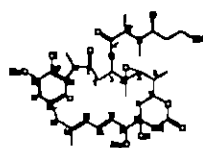
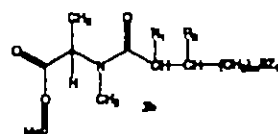
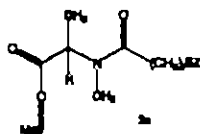


Figura 13b.- Eficacia en vivo de la conjugación huB4-DM4 contra xenoinjertos Ramos en ratones SCID: Cambios del peso corporal en animales



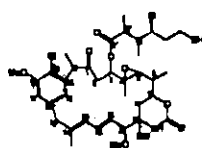


152 (1)

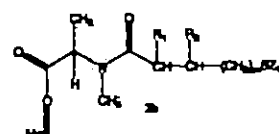
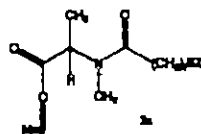


with 152 (1)

with 152 (2)



152 (2)



(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 December 2004 (02.12.2004)

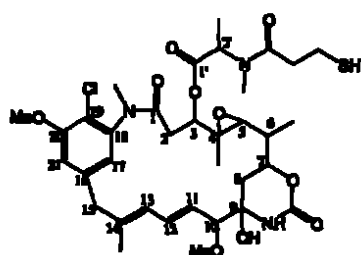
PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/103272 A2

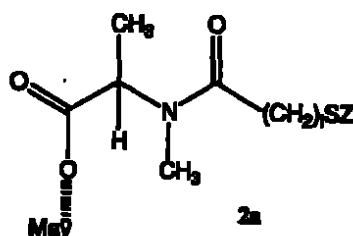
- (51) International Patent Classification⁷: A61K
- (21) International Application Number: PCT/US2004/013314
- (22) International Filing Date: 20 May 2004 (20.05.2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60471,739 20 May 2003 (20.05.2003) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNOGEN, INC. [US/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139-4239 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): WIDDISON, Wayne, C. [US/US]; 72 Cedar Street, Somerville, MA 02143 (US). CHARI, Ravi, V., J. [US/US]; 174 Winchester Street, Newton, MA 02461 (US).
- (74) Agents: MACK, Susan, J. et al.; Sughrue Mion, PLLC, 2100 Pennsylvania Ave., NW, Suite 800, Washington, DC 20037-3213 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,

[Continued on next page]

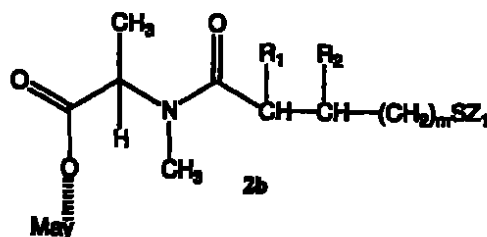
(54) Title: IMPROVED CYTOTOXIC AGENTS COMPRISING NEW MAYTANSINOIDS



DM1 (1)



2a



2b

(May = maytansinoid)

(57) Abstract: New thiol and disulfide-containing maytansinoids bearing a mono or di-alkyl substitution on the α -carbon atom bearing the sulfur atom are disclosed. Also disclosed are methods for the synthesis of these new maytansinoids and methods for the linkage of these new maytansinoids to cell-binding agents. The maytansinoid-cell-binding agent conjugates are useful as therapeutic agents, which are delivered specifically to target cells and are cytotoxic. These conjugates display vastly improved therapeutic efficacy in animal tumor models compared to the previously described agents.



156
154

GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

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



PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.162)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	F177222
I	Title of invention	IMPROVED CYTOTOXIC AGENTS COMPRISING NEW MAYTANSINOIDS
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	IMMUNOGEN, INC.
II-5	Address	128 Sidney Street Cambridge, Massachusetts 02139-4239 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	202-293-7060
II-9	Facsimile No.	202-293-7860
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	WIDDISON, Wayne, C.
III-1-5	Address	72 Cedar Street Somerville, Massachusetts 02143 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-2	Applicant and/or inventor	applicant and inventor US only CHARI, Ravi, V.J. 174 Winchester Street Newton, Massachusetts 02461 United States of America US US
III-2-1	This person is	
III-2-2	Applicant for	
III-2-4	Name (LAST, First)	
III-2-5	Address	
III-2-6	State of nationality	
III-2-7	State of residence	
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent MACK, Susan, J. SUGHRUE MION, PLLC 2100 Pennsylvania Ave., NW Suite 800 Washington, District of Columbia 20037-3213 United States of America 202-293-7060 202-293-7860 30,951
IV-1-1	Name (LAST, First)	
IV-1-2	Address	
IV-1-3	Telephone No.	
IV-1-4	Facsimile No.	
IV-1-6	Agent's registration No.	
IV-2	Additional agent(s)	
IV-2-1	Name(s)	
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.8(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	20 May 2003 (20.05.2003) 60/471,739 US
VI-1-1	Filing date	
VI-1-2	Number	
VI-1-3	Country	

156
156

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

159
152

VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (ISA/US)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	✓
IX-2	Description	98	-
IX-3	Claims	34	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	20	-
IX-7	TOTAL	157	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-18	other	Transmittal Sheet	
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	Fig. 1	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	MACK, Susan, J.	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/US
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

164
189

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacon : 05112351 00000000
Fecha (MM): 2005-11-02 16:25:50
Tramite : 011 (PC)-PROEN 370 FASE NUL 411 PRESENTAC
Dependencia: 2620 DIVISION DE MARCAS COMERCIALES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ☒	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:

Fecha:

- 162
160

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RUBIO CAMACHO HUMBERTO
Apoderado(a) y/o Representante de
IMMUNOGEN, INC

REFERENCIA	Radicación No.	5 112351
	Solicitud internacional	PCT/US2004/013314
	Fecha inicio fase nacional	20/12/2005
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	13638

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


CLARA DE JAIMES
Jefe de la división de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 25 DIC. 2005
adpa1