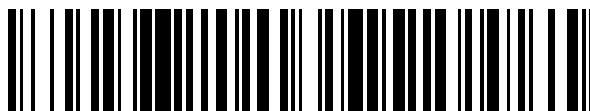


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 670**

51 Int. Cl.:

**C07D 498/16** (2006.01)

**A61K 31/5365** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2004 E 04750945 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 1651162**

54 Título: **Agentes citotóxicos mejorados que comprenden nuevos maitansinoides**

30 Prioridad:

**20.05.2003 US 471739 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.02.2016**

73 Titular/es:

**IMMUNOGEN, INC. (100.0%)  
830 Winter Street  
Waltham, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**WIDDISON, WAYNE C. y  
CHARI, RAVI V. J.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 559 670 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Agentes citotóxicos mejorados que comprenden nuevos maitansinoides

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional nº 60/471.739, presentada el 20 de mayo, 2003.

## Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un método para preparar conjugados citotóxicos mejorados que comprenden maitansinoides y agentes de unión a células. Estos conjugados tienen uso terapéutico cuando son suministrados a una población celular específica de una forma dirigida. La presente invención se refiere también a un método para preparar maitansinoides que tienen un resto tiol, que se pueden usar en la preparación de conjugados citotóxicos. La presente invención se refiere además a nuevos maitansinoides y a nuevos compuestos intermedios en la síntesis de los nuevos maitansinoides.

## Antecedentes de la invención

- 15 Han aparecido muchos informes sobre los intentos de localización específica de células tumorales con conjugados de anticuerpo monoclonal-fármaco (Sela et al. in *Immunoconjugates* 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al. en *Targeted Drugs* 1-22 (E. Goldberg, ed. 1983); Diener et al. en *Antibody Mediated Delivery Systems* 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al. en *Antibody Mediated Delivery Systems* 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol et al. en *Antibody Mediated Delivery Systems* 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988). Fármacos citotóxicos tales como el metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C, y clorambucilo, se han conjugado con una variedad de anticuerpos monoclonales murinos. En algunos casos, las moléculas de fármaco se unieron a moléculas de anticuerpo mediante una molécula vehículo intermedia tal como albúmina de suero (Garnett et al. *Cancer Res.* 46:2407-2412 (1986); Ohkawa et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 23:81-86 (1986); Endo et al. *Cancer Res.* 47:1076-1080 (1980)), dextrano (Hurwitz et al. *Appl. Biochem.* 2:25-35 (1980); Manabi et al. *Biochem. Pharmacol.* 34:289-291 (1985); Dillman et al. *Cancer Res.* 46:4886-4891 (1986); Shoval et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 8276-8280 (1988)), o ácido poliglutámico (Tsukada et al. *J. Natl. Canc. Inst.* 73:721-729 (1984); Kato et al. *J. Med. Chem.* 27:1602-1607 (1984); Tsukada et al. *Br. J. Cancer* 52:111-116 (1985)).

- 25 Se ha usado una gran variedad de tecnologías de conectores para preparar dichos inmunoconjugados, y se han investigado conectores tanto escindibles como no escindibles. En la mayoría de los casos, el potencial citotóxico completo de los fármacos solo podía verse, sin embargo, si las moléculas de fármaco podían ser liberadas de los conjugados en forma sin modificar en el sitio diana.

- 30 Uno de los conectores escindibles que se ha usado para preparar conjugados de anticuerpo-fármaco es un conector lábil frente a ácidos basado en el ácido cis-aconítico que aprovecha el entorno ácido de diferentes compartimentos intracelulares tales como los endosomas encontrados durante la endocitosis mediada por receptor y los lisosomas. Shen y Ryser introdujeron este método para preparar conjugados de daunorubicina con vehículos macromoleculares (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102:1048-1054 (1981)). Yang y Reisfeld usaron la misma tecnología para conjugar daunorubicina a un anticuerpo antimelanoma (*J. Natl. Canc. Inst.* 80:1154-1159 (1988)). Recientemente, Dillman et al. también usaron un conector lábil frente a ácidos de una forma similar para preparar conjugados de daunorubicina con un anticuerpo anti-linfocitos T (*Cancer Res.* 48:6097-6102 (1988)).

Un procedimiento alternativo, explorado por Trouet et al. implicaba unir daunorubicina a un anticuerpo mediante un brazo espaciador peptídico (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:626-629 (1982)). Esto se hizo bajo la premisa de que el fármaco libre podría liberarse de dicho conjugado por acción de peptidasas lisosómicas.

- 40 Sin embargo, los ensayos citotóxicos in vitro han puesto de manifiesto que los conjugados de anticuerpo-fármaco raramente logran la misma potencia citotóxica que los fármacos no conjugados libres. Esto sugería que los mecanismos mediante los cuales las moléculas de fármaco son liberadas de los anticuerpos son muy ineficaces. En el campo de las inmunotoxinas, se mostró que los conjugados formados por puentes disulfuro entre anticuerpos monoclonales y toxinas proteínas catalíticamente activas, eran más citotóxicos que los conjugados que contenían otros conectores. 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 alta concentración intracelular de glutatión que contribuía a la escisión eficaz del enlace disulfuro entre una molécula de anticuerpo y una toxina. A pesar de esto, solo hay unos pocos ejemplos descritos del uso de enlaces disulfuro para la preparación de conjugados entre fármacos y macromoléculas. Shen et al. describieron la conversión del metotrexato en un derivado de mercaptoetilamida, seguido de conjugación con poli-D-lisina mediante un enlace disulfuro (*J. Biol. Chem.* 260:10905-10908 (1985)). Además, unos pocos informes describían la preparación de conjugados del fármaco tóxico clisemicina que contiene trisulfuro con anticuerpo (Hinman et al, 53 *Cancer Res.* 3336-3342 (1993), Hamann et al., *Bioconjugate Chem.* 13, 40-46 (2002), Hamann et al., *Bioconjugate Chem.*, 13, 47-58 (2002)).

- 55 Una razón para la falta de conjugados de anticuerpo-fármaco unidos por disulfuro es la falta de disponibilidad de fármacos citotóxicos que lleven un resto que contenga átomo de azufre, que se pueda usar fácilmente para unir el

fármaco a un anticuerpo por un enlace disulfuro. Además, la modificación química de fármacos existentes es difícil sin disminuir su potencial citotóxico.

Los maitansinoides son fármacos altamente tóxicos. La maitansina fue aislada por primera vez por Kupchan et al. del arbusto del este de África *Maytenus serrata* and se mostró que era de 100 a 1000 veces más citotóxica que los agentes quimioterapéuticos del cáncer convencionales tales como el metotrexato, daunorubicina, y vincristina (patente de EE.UU. n° 3.896.111). Posteriormente se descubrió que algunos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres en C-3 del maitansinol (patente de EE.UU. n° 4.151.042). También se han descrito ésteres en C-3 sintéticos del maitansinol y análogos del maitansinol (Kupchan et al. *J. Med. Chem.* 21:31-37 (1978); Higashide et al. *Nature* 270:721-722 (1977); Kawai et al. *Chem. Pharm. Bull.* 32:3441-3451 (1984)). Los ejemplos de análogos del maitansinol a partir de los cuales se han preparado ésteres en C-3 incluyen maitansinol con modificaciones en el anillo aromático (p. ej., descloro) o en C-9, C-14 (p. ej., grupo metilo hidroxilado), C-15, C-18, C-20 y C-4,5.

Los ésteres en C-3 del maitansinol naturales y sintéticos se pueden clasificar en dos grupos:

(a) ésteres en C-3 con ácidos carboxílicos simples (patentes de EE.UU. n° 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 en C-3 con derivados de *N*-metil-L-alanina (patentes de EE.UU. n° 4.137.230; 4.260.608; 5.208.020; y *Chem. Pharm. Bull.* 12:3441 (1984)).

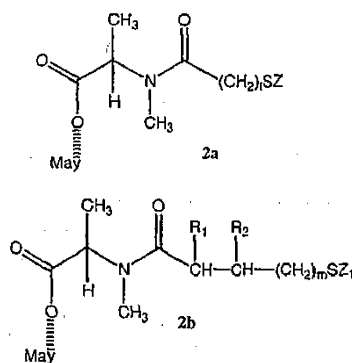
Se encontró que los ésteres del grupo (b) eran mucho más citotóxicos que los ésteres del grupo (a).

La maitansina es un inhibidor mitótico. Se ha descrito que el tratamiento de células L1210 in vivo con maitansina produce mitosis en 67% de las células que se acumulan. Se describió que las células de control no tratadas demostraban un índice mitótico en el intervalo de entre 3,2 a 5,8% (Sieber et al. 43 *Comparative Leukemia 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 por interferencia 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)).

Se ha encontrado que in vitro, las suspensiones de células de leucemia murina P388, L1210, y LY5178 eran inhibidas por la maitansina en dosis de  $10^{-3}$  a  $10^{-1}$   $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , siendo la línea celular P388 la más sensible. También se ha mostrado que la maitansina es un inhibidor activo del crecimiento in vitro de las células de carcinoma nasofaríngeo humano, y se describió que la línea de leucemia linfoblástica aguda humana CEM era inhibida en concentraciones tan bajas como  $10^{-7}$  mg/ml (Wolpert-DeFillippes et al. *Biochem. Pharmacol.* 24:1735-1738 (1975)).

Se ha mostrado que la maitansina in vivo también es activa. Se mostró que el crecimiento tumoral en el sistema de leucemia linfocítica P388 era inhibida a lo largo de un intervalo de dosis de 50 a 100 veces, lo que sugería un índice terapéutico alto; también se podía demostrar actividad inhibitoria significativa con el sistema de leucemia de ratón L1210, el sistema de carcinoma de pulmón de Lewis humano y el sistema de melanocarcinoma B-16 humano (Kupchan, *Ped. Proc.* 33:2288-2295 (1974)). Los maitansinoides usados en conjugados con agentes de unión a células se describen en las patentes de EE.UU. n° 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 estos conjugados, el agente de unión a células está unido al maitansinoide DM1 [*N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*-<sup>2</sup>-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, 1, número CAS: 139504-50-0, FIG. 1]

En las patentes anteriores, los fármacos maitansinoides que llevan cadenas laterales de *N*-metil-L-alanina acetilada tiene la fórmula **2a,b**:



En la fórmula **2a**, 1 representa un número entero de 1 a 10. Por lo tanto, los maitansinoides de fórmula **2a** tienen el átomo de azufre conectado a un grupo metileno no sustituido ( $-\text{CH}_2-\text{S}-$ ). Se dice que un grupo sulfhidrilo en dicho

compuesto maitansinoide o un grupo disulfuro en un conjugado de agente de unión a células-maitansinoide unido por disulfuro con dicho maitansinoide no está "impedido" puesto que no hay sustituyentes voluminosos en el carbono  $\alpha$  al lado del grupo sulfhidrilo o disulfuro, que produzcan 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 donde  $m = 0$ , y  $R_2 = \text{CH}_3$  o  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ . Si  $m = 0$ , entonces el maitansinoide lleva un sustituyente en el carbono que lleva el grupo funcional tiol o un grupo funcional disulfuro después de conjugación con un agente de unión a células mediante un enlace disulfuro. Sin embargo, debido a que en este caso el átomo de azufre está en posición  $\beta$  respecto a un grupo carbonilo, se encuentra que estos maitansinoides y conjugados de dichos maitansinoides con agentes de unión a células mediante un enlace disulfuro, son inestables debido a su tendencia a sufrir una eliminación  $\beta$ .

### Compendio de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que la unión de maitansinoides, que llevan un grupo tiol con impedimento estérico (que tienen uno o dos sustituyentes en el carbono  $\alpha$  que lleva el grupo funcional tiol), con agentes de unión a células, da conjugados que tienen actividad antitumoral ampliamente mejorada in vivo comparado con los conjugados preparados con los maitansinoides previamente descritos que no tienen un sustituyente en el átomo de carbono  $\alpha$  que lleva el enlace disulfuro. Otro descubrimiento inesperado era que se obtiene actividad biológica mejorada cuando el impedimento estérico está de forma óptima en el lado del maitansinoide del enlace disulfuro en los conjugados. Además, el grupo acilo de la cadena lateral del aminoácido acilado del maitansinoide que lleva el grupo sulfhidrilo tiene que tener una longitud de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre el grupo carbonilo de la amida y el átomo de azufre.

Estos descubrimientos muestran que los conjugados de agente de unión a células-maitansinoide unidos por disulfuro, se pueden construir de forma que dichas sustituciones en los dos átomos de carbono  $\alpha$  que llevan el enlace disulfuro pueden conducir a diferentes grados de impedimento estérico en cualquiera de los lados del enlace disulfuro.

Por consiguiente, la presente invención describe la síntesis de nuevos maitansinoides que contienen disulfuro y tiol con impedimento estérico, que llevan uno o dos sustituyentes alquilo en el átomo de carbono  $\alpha$  que lleva el átomo de azufre. Además, el grupo acilo de la cadena lateral del aminoácido acilado tiene una longitud de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre el grupo carbonilo de la amida y el átomo de azufre.

También se describe la preparación y evaluación biológica de los conjugados de agente de unión a células de estos nuevos maitansinoides.

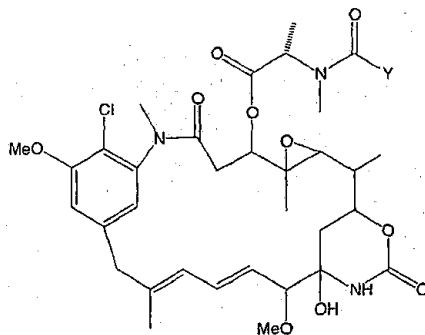
En una realización de la invención, se describen nuevos maitansinoides que contienen tiol y disulfuro que llevan una sustitución de mono o di-alquilo en el átomo de carbono que lleva el átomo de azufre.

En una segunda realización, la presente invención describe métodos para la síntesis de estos nuevos maitansinoides.

En una tercera realización, se describen métodos para la unión de estos nuevos maitansinoides a los agentes que se unen a células. Estos conjugados son útiles como agentes terapéuticos, que son suministrados específicamente en las células diana y son citotóxicos. Estos conjugados presentan eficacia terapéuticamente ampliamente mejorada en modelos de tumores animales comparado con los agentes previamente descritos.

Más específicamente, la presente invención proporciona:

Un compuesto representado por la fórmula **4**:



**4**

en donde:

Y es como se define en la reivindicación 1.

El compuesto de fórmula 4, en donde R1 es metilo; R2 es H; y Z es H;

El compuesto de fórmula 4, en donde R1 y R2 son metilo; y Z es H;

El compuesto de fórmula 4, en donde R1 es metilo, R2 es H, y Z es -SCH3;

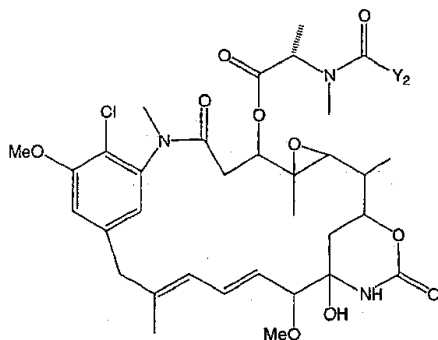
5 El compuesto de fórmula 4, en donde R1 y R2 son metilo, y Z es -SCH3;

Un conjugado de maitansinoide-agente de unión a células que comprende al menos un maitansinoide unido al agente de unión a células, en donde el maitansinoide es cualquiera de los compuestos descritos antes;

10 Cualquiera de los conjugados de maitansinoide-agente de unión a células descritos antes, en donde el agente de unión a células comprende al menos un sitio de unión de un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo MY9 humanizado o recubierto, anti-B4 humanizado o recubierto, o C242 humanizado o recubierto;

Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de cualquiera de los conjugados de maitansinoide-agente de unión a células descritos antes, una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable;

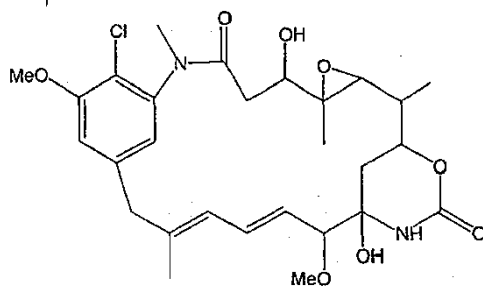
Un método de esterificación de maitansinol para dar un maitansinoide de fórmula 4<sub>2</sub>:



15

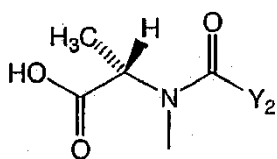
4<sub>2</sub>

comprendiendo dicho método hacer reaccionar el maitansinol de la estructura 11:

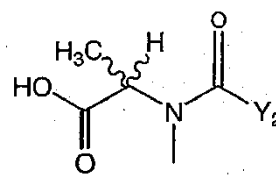


11

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



L



D, L

(III)

en donde:

Y<sub>2</sub> es como se define en la reivindicación 9.

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

- 5 El método descrito antes de esterificación del maitansinol para dar maitansinoides de fórmula **4a**, en donde dicho 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)**;

10 El método descrito antes de esterificación del maitansinol para dar maitansinoides de fórmula **4a**, en donde dicho compuesto de fórmula (III-D,L) es la *N*-metilalanina acilada con un grupo carboxílico que lleva un grupo funcional tiol protegido, en el que el centro de carbono que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S para dar los compuestos de estructura **15**;

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

- (1) hacer reaccionar el ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotiolsulfonato de metilo para dar el compuesto **13**;
- 15 (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)**;

El método descrito antes de esterificación del maitansinol, en donde dicho compuesto **15a(S,S)** se hace por un método que comprende:

- (1) convertir el (R)-1,3-butanodiol en ácido (S)-4-(metilditio)pentanoico **19**;
- 20 (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 descrito antes de esterificación del maitansinol, en donde dicho compuesto **15b(S,R)** se hace por un método que comprende:

- (1) convertir el (S)-1,3-butanodiol en ácido (R)-4-(metilditio)pentanoico **24**;
- 25 (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)**;

30 El método descrito antes de esterificación del maitansinol para dar maitansinoides de fórmula **4a**, en donde la *N*-metilalanina acilada racémica, con un grupo carboxílico que lleva un grupo funcional tiol protegido, en el que el centro de carbono que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S, para dar los compuestos de estructura **15**, se hace por un procedimiento que comprende:

- (1) hacer reaccionar el ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotiolsulfonato de metilo para dar el compuesto **13**;
- (2) convertir el compuesto **13** en su éster de *N*-hidroxisuccinimida **14**;
- 35 (3) hacer reaccionar el compuesto **14** con *N*-metilalanina racémica para dar la *N*-metilalanina acilada racémica con un grupo carboxílico que lleva un grupo funcional tiol protegido, en el que el centro de carbono que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S para dar los compuestos de estructura **15**.

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

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

El método descrito antes de esterificación del maitansinol para dar maitansinoides de fórmula **4b**, en donde el compuesto **10** contiene *N*-metil-L-alanina o la *N*-metilalanina racémica, se hace por un procedimiento que comprende:

- (1) hacer reaccionar sulfuro de isobutileno (**5**) con el anión de acetonitrilo para dar el compuesto **6**;
- 45 (2) hidrolizar el compuesto **6** para dar el ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (**7**);

(3) convertir el compuesto **7** en el disulfuro **8** por reacción con metanotiolsulfonato de metilo;

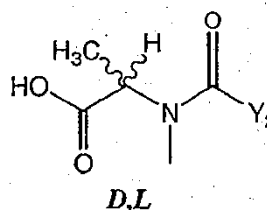
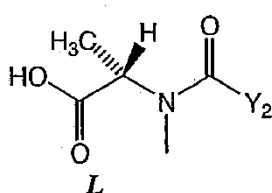
(4) convertir el compuesto **8** en su éster de *N*-hidroxisuccinimida **9**; y

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

- 5 El método descrito antes de esterificación del maitansinol con el compuesto **10** seguido de separación de los diastereoisómeros, si están presentes, y purificación del maitansinoide por HPLC en sílice ciano-boridada, que además comprende la reducción del enlace disulfuro, para dar maitansinoideos de fórmula **4b**;

10 Un método para hacer un conjugado de maitansinoide-agente de unión a células que comprende hacer un maitansinoide purificado mediante cualquiera de los métodos de esterificación del maitansinol descritos antes para dar maitansinoideos de fórmula **4b**, y hacer reaccionar el maitansinoide con un agente de unión a células que comprende un grupo ditio reactivo, preferiblemente un grupo ditiopiridilo o un grupo ditiopiridilo sustituido;

Compuestos de fórmula (III):



(III)

como se define en la reivindicación 9.

- 15 Compuestos **10 (S)** o racémico **10**;

Un método para hacer el compuesto **10** que contiene *N*-metil-L-alanina o *N*-metilalanina racémica, 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**);

(3) convertir el compuesto **7** en el disulfuro **8** por reacción con metanotiolsulfonato de metilo;

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

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

- 25 (1) hacer reaccionar el ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotiolsulfonato de metilo 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 dicha mezcla de compuestos **15a(S,S)** y **15b(S,R)**;

- 30 La *N*-metilalanina acilada racémica con un grupo carboxílico que lleva un grupo funcional tiol protegido, en el que el centro de carbono que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S, para dar compuestos de la estructura **15**.

35 Un método para hacer la *N*-metilalanina acilada racémica con un grupo carboxílico que lleva un grupo funcional tiol protegido, en el que el centro de carbono que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S, para dar compuestos de la estructura **15**, que comprende:

(1) hacer reaccionar el ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotiolsulfonato de metilo 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 lleva un grupo funcional tiol protegido, en el que el centro de carbono que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S para dar los compuestos de estructura **15**.

Compuesto **15a**(S,S);

5 Compuesto **15b**(S,R);

Un método para hacer el compuesto **15a**(S,S) que comprende:

(1) convertir el (R)-1,3-butanodiol 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 dicho compuesto **15a**(S,S);

10 Un método para hacer el compuesto **15b**(S,R) que comprende:

(1) convertir el (S)-1,3-butanodiol 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 dicho compuesto **15b**(S,R);

15 Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de cualquiera de los conjugados de compuestos maitansinoides descritos antes, una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable;

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

20 Un método para inducir la muerte celular en poblaciones de células seleccionadas in vitro o ex vivo, que comprende poner en contacto células diana o tejido que contiene las células diana, con una cantidad eficaz de cualquiera de los maitansinoides-agentes de unión a células descritos antes, sus sales o solvatos.

### Breve descripción de las figuras

La figura **1** muestra las estructuras de maitansinoides descritos previamente.

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

25 Las figuras **3a-d** muestran esquemas para la síntesis de maitansinoides representativos de la presente invención.

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

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

30 Las figuras **5a-d** muestran esquemas para preparar conjugados de agentes de unión a células con maitansinoides de la presente invención.

La figura **6** es una gráfica que muestra la potencia in vitro de conjugados de agente de unión a células-maitansinoide de la presente invención.

35 La figura **7** es una gráfica que compara la eficacia antitumoral in vivo de huC242-maitansinoides de la presente invención con conjugados de huC42 de maitansinoides previamente descritos, contra xenoinjertos de tumor de colon humano HT-29.

La figura **8** es una gráfica que compara la eficacia antitumoral in vivo de huC242-maitansinoides de la presente invención con conjugados de huC242 de maitansinoides previamente descritos, contra xenoinjertos de tumor de colon humano COLO 205.

40 La figura **9** es una gráfica que compara la eficacia antitumoral in vivo de MY9-6-maitansinoides de la presente invención con conjugados de MY9-6 de maitansinoides previamente descritos, contra xenoinjertos de leucemia mielocítica promielocítica HL60.

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



La figura 11 muestra la evaluación de eficacia in vivo del conjugado huMy9-6-DM4 contra tumores de xenoinjerto humano HL-60 en ratones SCID y la compara con la de un conjugado huMy9-6 de un maitansinoide previamente descrito (huMy9-6-DMI).

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

La figura 13a muestra la evaluación de eficacia in vivo del conjugado huB4-DM4 contra tumores de xenoinjerto Ramos humanos en ratones SCID, y la figura 13b muestra los cambios en los pesos corporales de los animales durante el periodo de ensayo.

### Descripción detallada de la invención

10 Esta invención describe nuevos maitansinoides que contienen disulfuro y tiol con impedimento estérico, en los que el átomo de carbono  $\alpha$  que lleva el átomo de azufre lleva uno o dos sustituyentes alquilo. La invención también describe un procedimiento para la síntesis de estos nuevos maitansinoides. Se describen además nuevos compuestos que son útiles como compuestos intermedios en la síntesis de nuevos maitansinoides. Además, esta invención describe la preparación de conjugados de estos nuevos maitansinoides con agentes de unión a células.

15 La técnica pone de manifiesto que es extremadamente difícil modificar fármacos existentes sin disminuir su potencial citotóxico. La invención descrita supera este problema enseñando un método de síntesis de nuevas moléculas de maitansinoide que contienen un resto tiol o disulfuro con impedimento estérico. Los nuevos maitansinoides descritos conservan, y en algunos casos incluso potencian, la potencia citotóxica de los maitansinoides previamente descritos.

20 Los conjugados de maitansinoide-agente de unión a células permiten la medición completa de la acción citotóxica de los maitansinoides que se van a aplicar de una forma dirigida solo contra células no deseadas, evitando así efectos secundarios debidos al daño a células sanas a las que no van dirigidos. Por lo tanto, la invención proporciona agentes útiles, y métodos nuevos para hacerlos, para la eliminación de células enfermas o anómalas que van a matar o lisar, tales como células tumorales (en particular células de tumores sólidos), células infectadas por virus, células infectadas por microorganismos, células infectadas por parásitos, células autoinmunes (células que producen anticuerpos), células activadas (las implicadas en el rechazo de injerto o enfermedad de injerto contra huésped), o cualquier otro tipo de células enfermas o anómalas, mientras que presentan efectos secundarios mínimos.

25 Por lo tanto, esta invención enseña un método para producir conjugados citotóxicos mejorados que comprenden nuevos agentes maitansinoides y agentes de unión a células, con actividad biológica ampliamente mejorada, comparado con maitansinoides y agentes de unión a células previamente descritos. La invención enseña además un método para la síntesis de derivados de maitansinoide que tienen un resto tiol o disulfuro con impedimento estérico, que permite la unión química de un agente de unión a células, mientras que presenta una alta citotoxicidad sea en forma unida o en forma liberada o en ambos estados. El conjugado citotóxico de acuerdo con la presente invención, comprende uno o más maitansinoides unidos a un agente de unión a células. Con el fin de unir el maitansinoide al agente de unión a células, el maitansinoide primero debe modificarse.

30 Los maitansinoides que se pueden usar en la presente invención para producir los maitansinoides que son capaces de unirse a un agente de unión a células, son bien conocidos en la técnica y se pueden aislar de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos o preparar de forma sintética de acuerdo con métodos conocidos.

Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen el maitansinol.

35 Con el fin de unir el maitansinoide al agente de unión a células, el maitansinoide comprende un resto conector. El resto conector contiene un enlace químico que permite la liberación de los maitansinoides completamente activos en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces lábiles frente a ácidos, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles frente a peptidasa y enlaces lábiles frente a esterases. Son preferidos los enlaces disulfuro.

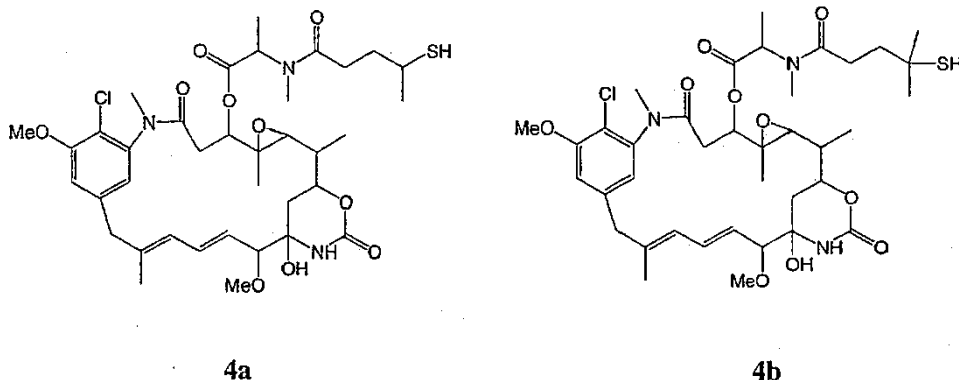
40 La descripción de la patente de EE.UU. nº 5.208.020 enseña la producción de maitansinoides que llevan dichos enlaces.

De acuerdo con la presente invención, el resto conector comprende un resto tiol o disulfuro con impedimento estérico.

45 Los maitansinoides que comprende un resto conector que contiene un grupo químico reactivo de acuerdo con la invención, son ésteres en C-3 del maitansinol donde el resto conector contiene un enlace tiol o disulfuro con impedimento estérico.

50 Además, aunque la síntesis de los ésteres de maitansinol que tienen un resto conector se describe a continuación en términos de restos conectores que contienen un enlace disulfuro en la posición C-3, un experto en la técnica entenderá que también se pueden usar restos conectores con otros enlaces químicos, como se ha descrito antes, con la presente invención.

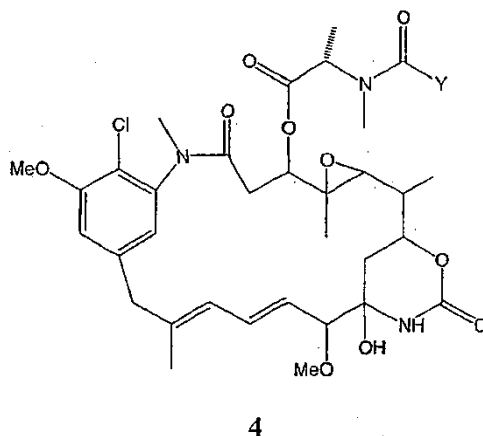
Las estructuras de los diferentes maitansinoides de la presente invención se representan en la figura 2. La síntesis de los maitansinoides que tienen un resto tiol o disulfuro con impedimento estérico se puede describir con referencia a la figura 3. Muchos de los métodos ilustrados a continuación usan los maitansinoides que contienen tiol *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*-<sup>2</sup>(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (denominado DM3) y *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*-<sup>2</sup>(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (denominado DM4). DM3 (**4a**) y DM4 (**4b**) se representan mediante las siguientes fórmulas estructurales:



La citotoxicidad in vitro de los nuevos maitansinoides que contienen tiol y disulfuro con impedimento estérico de la invención, se pueden evaluar por su capacidad de suprimir la proliferación de diferentes líneas celulares no deseadas in vitro (figura 4). Por ejemplo, líneas celulares tales como la línea de carcinoma de mama humano SK-BR-3, o la línea celular de carcinoma epidermoide KB, se pueden usar para evaluar la citotoxicidad de estos nuevos maitansinoides. Las células evaluadas se pueden exponer a los compuestos durante 72 horas, y se pueden medir las fracciones de células que sobreviven en ensayos directos por métodos conocidos. Después se pueden calcular los calores de  $Cl_{50}$  a partir de los resultados de los ensayos.

#### 15 Producción de maitansinoides que tienen un resto tiol o disulfuro con impedimento estérico

El maitansinoide de acuerdo con la invención es el éster en C-3, que es un compuesto representado por la fórmula 4:



en donde los sustituyentes son como se definen en la reivindicación 1.

Son especialmente preferidos cualquiera de los compuestos descritos antes, 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; los 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; los 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 uno 1, n es 0, y Z es  $-SCH_3$ ; y los compuestos donde  $R_1$  y  $R_2$  son 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  $-SCH_3$ . Además, se usa el estereoisómero *L*-alanina ya que el el más útil para los conjugados de la invención.

Las realizaciones preferidas de la fórmula 4 incluyen DM3 y DM4, es decir, el maitansinoide de fórmula 4 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 fórmula 4 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 fórmula 4 en donde  $R_1$  es H,  $R_2$  es metilo,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ , y  $R_8$  son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es  $-SCH_3$ ; y el maitansinoide de fórmula 4 en donde  $R_1$  y  $R_2$  son metilo,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ , y  $R_8$  son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es  $-SCH_3$ .

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

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

- 5 Los ejemplos de alquilos o alqueniilos cíclicos que tienen de 3 a 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 a 10 átomos de carbono, y los arilos sustituidos incluyen arilos que tienen de 6 a 10 átomos de carbono que llevan al menos un sustituyente alquilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono, o sustituyentes alcoxi tal como metoxi, etoxi, o un sustituyente halógeno o un sustituyente nitro.

- 10 Los ejemplos de arilo simple que contiene de 6 a 10 átomos de carbono incluyen fenilo y naftilo.

Los ejemplos de arilo sustituido incluyen nitrofenilo, dinitrofenilo.

Los radicales aromáticos heterocíclicos incluyen grupos que tienen un anillo de 3 a 10 miembros que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados de N, O o S.

- 15 Los radicales heterocíclicos incluyen compuestos cíclicos, que comprenden sistemas de anillo de 3 a 10 miembros, que contienen uno o dos heteroátomos, seleccionados de N, O o S.

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

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

- 20 Los nuevos maitansinoides que tienen un resto tiol o disulfuro con impedimento estérico se pueden preparar por los siguientes métodos recién descritos:

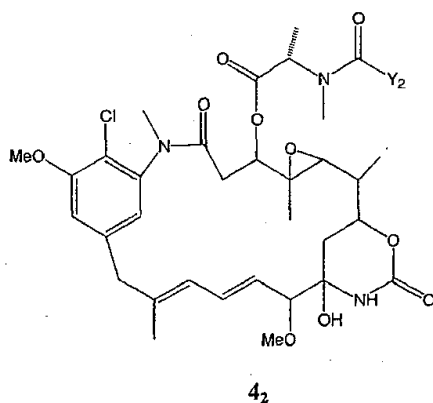
#### Síntesis de maitansinoides

- 25 La figura 3a muestra las etapas de la síntesis del maitansinoide DM4 (**4b**). Se hace reaccionar el sulfuro de isobutileno (**5**) con el anión del acetonitrilo para dar el compuesto mercapto **6**. La hidrólisis del compuesto **6** con base proporcionó el ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (**7**). La conversión del compuesto **7** en el disulfuro **8** se lleva a cabo por reacción con metanotiolsulfonato de metilo (MeSSO<sub>2</sub>Me). La conversión del compuesto **8** en el éster de *N*-hidroxisuccinimida **9** seguido de reacción con *N*-metil-*L*-alanina proporcionó el ácido carboxílico **10**, que se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice. La reacción del compuesto **10** con maitansinol (**11**) en presencia de *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y cloruro de cinc dio la 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 diastereoisómeros se separó por HPLC, usando una columna con ciano unido. El isómero que contiene el *L*-aminoácido deseado se recogió y se redujo con ditiotreitolo para dar el *L*-aminoacil-maitansinoide que contiene tiol DM4 (**4b**), que se purificó de nuevo por HPLC usando una columna con ciano unido.

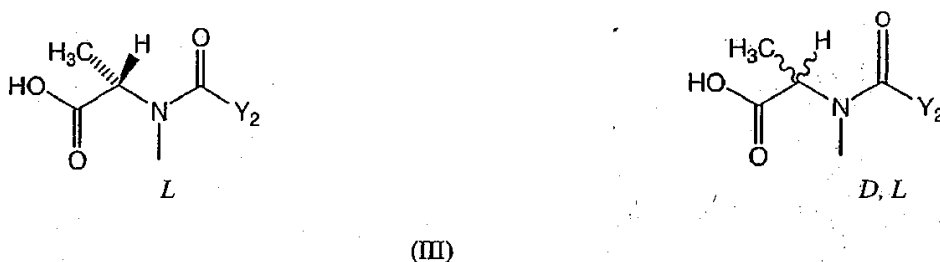
- 35 La figura 3b muestra las etapas de la síntesis del maitansinoide DM3 (**4a**). El ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) se convirtió en el metildisulfuro por reacción con metanotiolsulfonato de metilo para dar el compuesto **13**. La conversión del compuesto **13** en el éster de *N*-hidroxisuccinimida **14** seguido de reacción con *N*-metil-*L*-alanina proporcionó el ácido carboxílico **15**, que se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice. La reacción del compuesto **15** con maitansinol (**11**) en presencia de *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y cloruro de cinc dio la 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 diastereoisómeros se separó por HPLC, usando una columna con ciano unido. El isómero que contiene el *L*-aminoácido deseado se recogió y se redujo con ditiotreitolo para dar el maitansinoide que contiene mercapto-*L*-aminoácido DM3 (**4a**), que de nuevo se purificó por HPLC, usando una columna con ciano unido.

- 45 Las figuras 3c y d muestran la síntesis de DM3 que lleva el resto (*S*)-4-metilditio-1-oxopentilo o el resto (*R*)-4-metilditio-1-oxo-pentilo. La conversión del (*R*)-1,3-butanodiol (**16**) en su ditosilato **17**, seguido de reacción secuencial con cianuro de sodio y etil-xantato de potasio dio el nitrilo **18** (Fig. 3c). La hidrólisis con base, seguido de intercambio de disulfuro dio el ácido (*S*)-4-metilditio-pentanoico **19**. La conversión del compuesto **19** en el éster de succinimidilo **20**, seguido de reacción con *N*-metil-*L*-alanina dio la *N*-metil-*N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxo-pentil]-*S*-alanina (**15a**). La reacción con maitansinol, como se ha descrito antes para el compuesto **15**, dio los dos diastereoisómeros de *L*-DM3SMe **4g** y **4h**. Igualmente, el (*S*)-1,3-butanodiol (**21**) se convirtió en el ácido (*R*)-4-metilditio-pentanoico **24** y después en el compuesto **15b**. La reacción con maitansinol, como se ha descrito antes, dio los dos diastereoisómeros de DM3SMe, **4k** y **4l**.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método de esterificación del maitansinol para dar un maitansinoide de fórmula **4z**:



Dicho método comprende hacer reaccionar el maitansinol en el C-3 con un compuesto de fórmula (III-L) o (III-D, L):



en donde:

- 5 Y<sub>2</sub> es como se define en la reivindicación 9.

Preferiblemente, el compuesto representado por la fórmula (III) es el estereoisómero L.

- 10 Cuando se hace DM3, el compuesto de fórmula (III-L) es **15a**(S,S), **15b**(S,R) o una mezcla de **15a**(S,S) y **15b**(S,R); y el compuesto de fórmula (III-D,L) es la *N*-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva un grupo funcional tiol protegido, en el que el centro de carbono que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S, para dar los compuestos de estructura **15**.

La mezcla de los compuestos **15a**(S,S) y **15b**(S,R) se puede hacer por un procedimiento que comprende:

- (1) hacer reaccionar el ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotiol sulfonato de metilo para dar el compuesto **13**;
- (2) convertir el compuesto **13** en su éster de *N*-hidroxisuccinimida **14**;
- 15 (3) hacer reaccionar el compuesto **14** con *N*-metil-L-alanina para dar la mezcla de compuestos **15a**(S,S) y **15b**(S,R);

La *N*-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva un grupo funcional tiol protegido, en el que el centro de carbono que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S, para dar compuestos de la estructura **15**, se puede hacer por un procedimiento que comprende:

- 20 (1) hacer reaccionar el ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotiol sulfonato de metilo 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 dicha *N*-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva un grupo funcional tiol protegido, en el que el centro de carbono que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S, para dar los compuestos de estructura **15**.

- 25 El compuesto **15a**(S,S) se puede hacer por un procedimiento que comprende:

- (1) convertir el (R)-1,3-butanodiol 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 dicho compuesto **15a**(S,S);

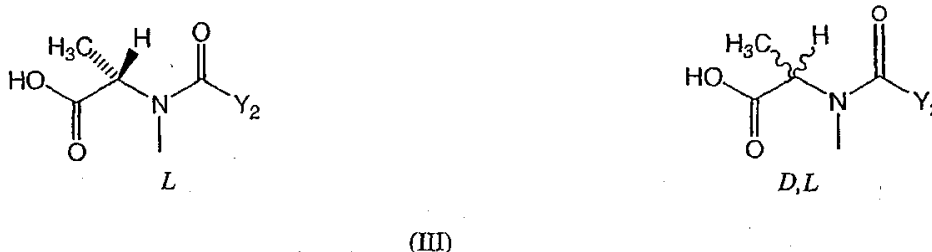
El compuesto **15b(S,R)** se puede hacer por un procedimiento que comprende:

- (1) convertir el (S)-1,3-butanodiol 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 dicho compuesto **15b(S,R)**.

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

El compuesto **10** que contiene N-metil-L-alanina o N-metilalanina racémica se hace por un procedimiento 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 el disulfuro **8** por reacción con metanotiolsulfonato de metilo;
  - (4) convertir el compuesto **8** en su éster de N-hidroxisuccinimida **9**; y
  - (5) hacer reaccionar el compuesto **9** con N-metil-L-alanina o N-metilalanina racémica para dar el compuesto **10** que contiene N-metil-L-alanina o N-metilalanina racémica.
- 15 De acuerdo con la presente invención, los compuestos de fórmula III también son nuevos:



en donde:

Y<sub>2</sub> es como se define en la reivindicación 9.

- 20 Los compuestos de fórmula III los puede hacer fácilmente el experto en la técnica por métodos análogos a los descritos en la presente memoria para hacer los compuestos **10** y **15**.

#### Citotoxicidad in vitro de maitansinoides

- 25 La citotoxicidad in vitro de los maitansinoides de la presente invención se muestra en la figura 4. Los nuevos maitansinoides (**4c**, **4e**) que llevan un enlace disulfuro impedido son muy potentes contra las líneas celulares ensayadas. Por lo tanto el compuesto **4c** mata células A-375 y células SK-Br-3 con valores de CI<sub>50</sub> de 1,5 x 10<sup>-11</sup> M y 7,0 x 10<sup>-12</sup> M respectivamente. Igualmente, el maitansinoide **4e** también es muy potente con valores de CI<sub>50</sub> de 3,2 x 10<sup>-11</sup> M y 9,0 x 10<sup>-12</sup> M contra células A-375 y SK-Br-3 respectivamente. La comparación de la potencia in vitro del maitansinoide que contiene tiol impedido **4a** de la presente invención, con el maitansinoide **1** previamente descrito (Fig. 4c,d), indica que los nuevos maitansinoides son de 20 a 50 veces más potentes que los descritos previamente.

#### Preparación de agentes de unión a células

- 30 La eficacia de los compuestos de la invención como agentes terapéuticos depende de la selección cuidadosa de un agente de unión a células adecuado. Los agentes de unión a células pueden ser de cualquier clase actualmente conocida, o que se dé a conocer, e incluye péptidos y no péptidos. En general, estos pueden ser anticuerpos (en especial anticuerpos monoclonales), linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas de transporte de nutrientes (tales como transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia de unión a células.
- 35 Los ejemplos más específicos de agentes de unión a células que se pueden usar incluyen:

anticuerpos policlonales;

anticuerpos monoclonales;

fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', y F(ab')<sub>2</sub>, Fv (Parham, *J. Immunol.* 131:2895-2902 (1983); Spring et al. *J. Immunol.* 113:470-478 (1974); Nisonoff et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230-244 (1960));

- interferones (p. ej., alfa, beta, gamma);

linfoquinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;

- 5 hormonas tales como insulina, TRH (hormona liberadora de tirotropina), MSH (hormona estimulante de melanocitos), hormonas esteroideas, tales como andrógenos y estrógenos;

factores de crecimiento y factores estimuladores de colonias 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

- 10 vitaminas, tales como folato.

Las técnicas de anticuerpos monoclonales permiten la producción de agentes de unión a células extremadamente específicos en forma de anticuerpos monoclonales específicos. Se conocen particularmente bien en la materia las técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos por inmunización de ratones, ratas, hámsteres o cualquier otro mamífero, con el antígeno de interés tal como células diana intactas, antígenos aislados de la célula diana, virus enteros, virus entero atenuado, y proteínas víricas tales como proteínas de recubrimiento víricas. También se pueden usar células humanas sensibilizadas. Otra forma de crear anticuerpos monoclonales es el uso de bibliotecas en fagos de scFv (región variable monocatenaria), específicamente scFv humano (véase, p. ej., Griffiths et al., patentes de EE.UU. nº 5.885.793 y 5.969.108; McCafferty et al., WO 92/01047; Liming et al., WO 99/06587). Además, también se pueden usar anticuerpos recubiertos descritos en la patente de EE.UU. nº 5.639.641, así como anticuerpos humanizados.

- 15  
20

La selección del agente de unión a células adecuado es una cuestión de elección que depende de la población de células particular a la que va a dirigirse, pero en general se prefieren anticuerpos monoclonales humanos, si hay uno adecuado disponible.

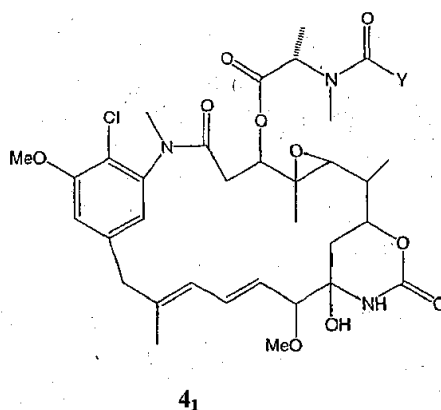
- 25 Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG<sub>1</sub> murino que se une específicamente al antígeno CD33 {J.D. Griffin et al 8 *Leukemia Res.*, 521 (1984)} y se puede usar si las células diana expresan CD33 como en la enfermedad de la leucemia mieloide aguda (LMA). Igualmente, el anticuerpo monoclonal anti-B4 es una IgG<sub>1</sub> murina, que se une al antígeno CD19 en los linfocitos B {Nadler et al, 131 *J. Immunol.* 244-250 (1983)} y se puede usar si las células diana son células B o células enfermas que expresan este antígeno, tal como en el linfoma de no Hodgkin o leucemia linfoblástica crónica. Igualmente, el anticuerpo monoclonal, C242, que se une al antígeno CanAg, (patente de EE.UU. nº 5.552.293) se puede usar para tratar tumores que expresan CanAg, tales como cánceres colorrectal, pancreático y gástrico.

- 30 Además, el GM-CSF, que se une a células mieloides se puede usar como un agente de unión a células para células enfermas de leucemia mieloide aguda. La IL-2 que se une a linfocitos T activados se puede usar para prevenir el rechazo de injerto de trasplante, para tratamiento y prevención de enfermedades de injerto contra huésped, y para el tratamiento de leucemia de linfocitos T aguda. MSH, que se une a melanocitos, se pueden usar para el tratamiento de melanoma. El ácido fólico se puede usar para dirigirse al receptor de folato expresado en tumores de ovario y otros tumores. El factor de crecimiento epidérmico se puede usar para dirigirse a cánceres escamosos tales como de pulmón y cabeza y cuello. La somatostatina se puede usar para dirigirse a neuroblastomas y otros tipo de tumores.

- 35 Los cánceres de mama y testículos son abordados con éxito con estrógenos (o análogos de estrógenos) o andrógenos (o análogos de andrógenos) respectivamente, como agentes de unión a células.

#### Producción de conjugados de citoquinas

La presente invención proporciona también un conjugado de maitansinoide-agente de unión a células, en donde el maitansinoide se representa por la fórmula 4<sub>1</sub>:



en donde los sustituyentes son como se definen en la reivindicación 6.

Los conjugados citotóxicos representativos de la invención son anticuerpo/maitansinoide, fragmento de anticuerpo/maitansinoide, factor de crecimiento epidérmico (EGF)/maitansinoide, hormona estimuladora de melanocitos (MSH)/maitansinoide, hormona estimuladora de tiroides (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 unión a células modificado de forma adecuada para producir conjugados citotóxicos. Estos conjugados se pueden purificar por filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico o por HPLC.

Los esquemas para preparar conjugados a partir de maitansinoides que contienen grupo sulfhidrido se muestran en la figura 5. Específicamente Mote (Fig. 5a, b), una solución de un anticuerpo en tampón acuoso, se puede incubar con un exceso molar de un agente modificador de anticuerpo tal como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP, **3a**) para introducir grupos ditiopiridilo (Fig 5a), o con *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB, **3b**) para introducir grupos ditiopiridilo (Fig 5b). Después, el anticuerpo modificado se hace reaccionar con maitansinoides que contienen tiol (tal como **4a** o **4b**) para producir un conjugado de anticuerpo-maitansinoide unido por disulfuro. El conjugado de maitansinoide-anticuerpo se puede purificar después por filtración en gel.

Alternativamente, el anticuerpo se puede incubar con un exceso molar de un agente modificador de anticuerpo tal como 2-iminotiolano para introducir grupos sulfhidrido. Después, el anticuerpo modificado se hace reaccionar con los maitansinoides que contienen disulfuro adecuados para producir un conjugado de anticuerpo-maitansinoide unido por disulfuro. El conjugado de maitansinoide-anticuerpo se puede purificar después por filtración en gel.

El número de moléculas de maitansinoide (indicado con *w* en las figuras 5a a 5d) unidas por molécula de anticuerpo, se puede determinar midiendo por espectrofotometría la relación de la absorbancia a 252 nm y 280 nm. Por este método se pueden unir una media de 1-10 moléculas de maitansinoide/anticuerpo. El número medio preferido de moléculas de maitansinoide unidas por molécula de anticuerpo es 2-5, y lo más preferido es 3-4,5.

Alternativamente, se puede incubar una solución de un anticuerpo en tampón acuoso con un exceso molar de anticuerpo-agente modificador tal como 4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de *N*-succinimidilo (SMCC, **26**) para introducir grupos maleimido (Fig. 5c), o con 4-(yodoacetil)-aminobenzoato de *N*-succinimidilo (SIAB, **27**) para introducir grupos yodoacetilo (Fig. 5d). Después, el anticuerpo modificado se hace reaccionar con maitansinoides que contienen tiol (tal como **4a** o **4b**) para producir un conjugado de anticuerpo-maitansinoide unido por tioéter. El conjugado de maitansinoide-anticuerpo se puede purificar después por filtración en gel.

El número de moléculas de maitansinoide unidas por molécula de anticuerpo se puede determinar por análisis espectrofotométrico como se ha descrito antes.

Por lo tanto, la presente descripción proporciona un método para hacer un conjugado de maitansinoide-agente de unión a células, que comprende hacer un maitansinoide purificado por uno de los métodos descritos antes, y hacer reaccionar el maitansinoide purificado con un agente de unión a células que comprende un grupo ditiol o un sulfhidrido reactivo. Preferiblemente, el grupo ditiol reactivo es un grupo ditiopiridilo o un grupo ditiopiridilo sustituido. En especial preferiblemente, el grupo ditiol reactivo comprende un grupo nitropiridilditio o dinitropiridilditio.

En otro método, el maitansinoide purificado se hace reaccionar con un agente de unión a células que comprende un grupo maleimido o un grupo halogenoacetilo.

Los conjugados de agentes de unión a células con fármacos maitansinoides de la invención, se pueden evaluar por su capacidad para suprimir la proliferación de diferentes líneas celulares no deseadas *in vitro* (Fig. 6). Por ejemplo, se pueden usar líneas celulares tales como la línea de carcinoma de colon humano COLO 205, la línea celular de

melanoma humano A-375, la línea de celular de leucemia mieloide humana HL60, para evaluar la citotoxicidad de estos conjugados. Las células evaluadas se pueden exponer a los compuestos durante 24 horas, y se pueden medir las fracciones de células que sobreviven en ensayos directos por métodos conocidos. Después se pueden calcular los valores de  $CI_{50}$  a partir de los resultados de los ensayos.

5 La potencia y especificidad de diana in vitro de los conjugados de anticuerpo-maitansinoide de la presente invención se muestran en las figuras 6, 10 y 12. Por lo tanto, la figura 6 muestra que tanto huC242-DM3 como huC242-DM4 son muy potentes para matar células COLO 205 positivas para el antígeno, con valores de  $CI_{50}$  de  $1,3 \times 10^{-11}$  M y  $1,1 \times 10^{-11}$  M respectivamente. En cambio, las células A-375 negativas para el antígeno son aproximadamente 500 veces menos sensibles, demostrando que los conjugados de maitansinoides de la presente invención son muy potentes y específicos. Igualmente, las figuras 10 y 12 demuestran la alta potencia y especificidad de diana de conjugados de maitansinoides de la presente invención, con anticuerpos MY9-6 y anti-B4, respectivamente.

15 Se comparó la eficacia antitumoral in vivo de conjugados de anticuerpos con los maitansinoides que contienen tiol impedido de la presente invención, con los conjugados de maitansinoides descritos previamente, en diferentes modelos de tumores humanos en ratones. En el primer modelo (Fig. 7), ratones SCID que llevaban xenoinjertos de tumor de colon humano HT-29 subcutáneos establecidos, se trataron con el conjugado de anticuerpo (huC242-DM1) del maitansinoide DM1 previamente descrito, o con los dos nuevos conjugados de maitansinoides (huC242-DM3, huC242-DM4). El tratamiento con huC242-DM1 produjo un retraso del crecimiento tumoral de 18 días. En cambio, los nuevos agentes eran significativamente más eficaces, con retrasos del crecimiento tumoral de 28 días para huC242-DM3 y de 36 días para huC242-DM4.

20 En el segundo modelo (figura 8), ratones que llevaban xenoinjertos de tumor de colon humano COLO 205 subcutáneos establecidos, se trataron con el conjugado de anticuerpo (huC242-DM1) del maitansinoide DM1 previamente descrito, o con los dos nuevos conjugados de maitansinoides (huC242-DM3, huC242-DM4). El tratamiento con huC242-DM1 no produjo remisión tumoral y produjo un retraso del crecimiento tumoral de 20 días. En cambio, los nuevos agentes eran significativamente más eficaces. Se logró una remisión tumoral completa que duraba 45 días en el grupo tratado con huC242-DM3. huC242-DM4 era incluso más eficaz dando como resultado el curado de todos los ratones tratados.

25 En el tercer modelo (figura 9), ratones que llevaban xenoinjertos de leucemia mieloide humana HL60 subcutáneos establecidos, se trataron 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 produjo remisión tumoral y produjo un retraso del crecimiento tumoral de 5 días. En cambio, los nuevos agentes eran significativamente más eficaces. Dieron como resultado la remisión tumoral. Tanto MY9-6-DM3 como MY-9-6-DM4 produjeron retrasos del crecimiento tumoral mayores de 20 días.

30 En el cuarto modelo (figura 11), se comparó directamente un maitansinoide de la presente invención (huMY9-6-DM4) con el de un conjugado del maitansinoide previamente descrito (huMY9-6-DM1) en un modelo de xenoinjerto subcutáneo, establecido con células HL-60. Con una dosis equivalente, el tratamiento con el conjugado de la presente invención, MY9-6-DM4, dio como resultado la remisión tumoral completa que duraba 85 días. En cambio, el conjugado del maitansinoide previamente descrito es mucho menos eficaz con un retraso del crecimiento tumoral de solo aproximadamente 48 días.

35 En el quinto modelo (figura 13a), un conjugado de un maitansinoide de la presente invención con el anticuerpo huB4 muestra alta actividad antitumoral de una forma dependiente de la dosis en un modelo de tumor Ramos subcutáneo. Las remisiones tumorales completas y los curados se logran con dosis que no son tóxicas (figuras 13a,b).

40 Los resultados de los cinco experimentos de eficacia anteriores demuestran que los maitansinoides que contienen tiol con impedimento estérico de la presente invención, dan conjugados de agente de unión a células con actividad antitumoral enormemente mejorada comparados con los conjugados de maitansinoide-agente de unión a células previamente descritos.

#### Composiciones y métodos de uso

45 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de cualquiera de los maitansinoides-agentes de unión a células de la presente invención, una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 Igualmente, la presente descripción proporciona un método para inducir la muerte celular en poblaciones de células seleccionadas, que comprende poner en contacto células diana o tejidos que contienen células diana, con una cantidad eficaz de un agente citotóxico que comprende cualquiera de los maitansinoides-agentes de unión a células de la presente invención, o una de sus sales o solvatos. Las células diana son células a las que se pueden unir los agentes de unión a células.

55 Si se desea, se pueden administrar otros agentes, tales como otros agentes antitumorales, junto con el conjugado.



Los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos, y los pueden determinar por expertos en la técnica como justifique la situación clínica.

5 Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) solución salina tamponada con fosfato Dulbecco, pH aproximadamente 7,4, que contiene o no contiene aproximadamente de 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humana, (2) solución salina al 0,9% (NaCl al 0,9% en p/v), y (3) dextrosa al 5% (p/v); y también pueden contener un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizante tal como Tween 20.

El método para inducir la muerte celular en poblaciones de células seleccionadas se puede poner en práctica in vitro, in vivo o ex vivo.

10 Los ejemplos de usos in vitro incluyen tratamiento de médula ósea autóloga antes de su trasplante al mismo paciente con el fin de matar células enfermas o malignas: tratamientos de la médula ósea antes de su trasplante con el fin de matar linfocitos T competentes y prevenir la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD); tratamientos de cultivos celulares con el fin de matar todas las células excepto las variantes deseadas que no expresan el antígeno diana; o matar variantes que expresan el antígeno no deseado.

Las condiciones de uso in vitro no clínico son determinadas fácilmente por un experto en la técnica.

15 Los ejemplos de uso ex vivo clínico son separar las células tumorales o células linfoides de la médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento del cáncer o en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria, o separar linfocitos T y otras células linfoides de la médula ósea autóloga o alogénica o tejido antes de trasplante con el fin de prevenir la GVHD. El tratamiento se puede llevar a cabo como sigue. Se recoge médula ósea del paciente u otro individuo y después se incuba en medio que contiene suero al que se añade agente citotóxico de la invención, las  
20 concentraciones están en el intervalo de 10  $\mu$ M a 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis, son determinadas fácilmente por un experto en la técnica. Después de incubación, las células de la médula ósea se lavan con medio que contiene suero y se devuelven al paciente por vía intravenosa de acuerdo con métodos conocidos. En circunstancias en las que el paciente recibe otro tratamiento tal como durante el transcurso  
25 de quimioterapia ablativa o irradiación total del cuerpo entre el momento de recogida de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de la médula ósea tratadas se almacenan congeladas en nitrógeno líquido usando equipamiento médico convencional.

30 Para uso in vivo clínico, el agente citotóxico de la invención se suministrará como una solución o un polvo liofilizado en los que se examina la esterilidad y los niveles de endotoxinas. Los ejemplos de protocolos adecuados de administración de conjugados son como sigue. Los conjugados se administran semanalmente durante 4 semanas como un bolo intravenoso cada semana. Las dosis de bolos se administran en 50 a 1000 ml de solución salina normal a la que se pueden añadir de 5 a 10 ml de albúmina de suero humana. Las dosificaciones serán de 10  $\mu$ g a 2000 mg por administración, intravenosa (en el intervalo de 100 ng a 20 mg/kg diarios). Después de cuatro semanas de tratamiento, el paciente puede continuar recibiendo tratamiento semanalmente. Los protocolos clínicos  
35 específicos con relación a la vía de administración, excipientes, diluyentes, dosificaciones, tiempos, etc., los puede determinar el experto en la técnica según justifique la situación clínica.

40 Los ejemplos de afecciones médicas que se puede tratar de acuerdo con los métodos in vivo o ex vivo de inducción de muerte celular en poblaciones de células seleccionadas incluyen tumores malignos de cualquier tipo, incluyendo, por ejemplo, cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario y órganos linfáticos; enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazos de injerto, tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante de hígado, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante cardíaco, y rechazo de médula ósea; enfermedad de injerto contra huésped; infecciones víricas, tales como infección por CMV, infección por VIH, SIDA, etc.; e infecciones parasitarias, tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis, y otras determinadas por el experto en la técnica.

#### 45 EJEMPLOS

La invención ahora se ilustrará por referencia a ejemplos no limitantes. Salvo que se exponga lo contrario, todos los porcentajes, proporciones, partes etc. son en peso.

50 Todos los reactivos se adquirieron en Aldrich Chemical Co., New Jersey, u otras fuentes comerciales. El maitansinol (11) se preparó como se ha descrito previamente (patente de EE.UU. nº 6.333.410). Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN  $^1$ H) se adquirieron en un instrumento Bruker de 400 MHz y los espectros de masas se adquirieron en un instrumento Bruker Daltonics Esquire 3000 usando ionización por electropulverización.

## EJEMPLO 1

## Síntesis del maitansinoide 4b

**Ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (7):** Un matraz de 500 ml se equipó con una barra agitadora y un embudo de adición de 150 ml. El sistema se puso en una atmósfera de argón. Se añadieron 150 ml de tetrahidrofurano anhidro (THF) y 75 ml de n-BuLi 2,5 M en hexanos (18,7 mmol) mediante una cánula y la solución se enfrió en un baño de hielo seco/acetona a -78°C. Se añadió gota a gota acetonitrilo (7,3 g, 9,4 ml, 18 mmol) mediante una jeringa a lo largo de aproximadamente 5 min. La reacción se agitó durante 30 min, mientras se formaba un precipitado de litio-acetonitrilo blanco. Se disolvió sulfuro de isobutileno (15 g, 17 mmol) en 100 ml de THF anhidro y se añadió gota a gota a lo largo de aproximadamente 30 min mediante el embudo de adición. El baño de enfriamiento se retiró y la reacción se dejó agitar durante 3 horas. El matraz se enfrió en un baño de hielo/agua mientras se añadían gota a gota 38 ml de HCl 0,5 M. Se retuvo la capa de THF y la capa acuosa se lavó dos veces con 75 ml de acetato de etilo. Las capas de THF y acetato de etilo se combinaron, se secaron sobre aproximadamente 20 g de sulfato sódico anhidro y se transfirieron a un matraz de 250 ml. Se separó el disolvente por evaporación en rotavapor con vacío para dar el compuesto bruto 6. Se añadieron etanol (30 ml) y una barra agitadora. El contenido se agitó mientras se añadía lentamente una solución de 8,0 g de NaOH en 30 ml de agua desionizada. El matraz se equipó con un refrigerante de reflujo y se puso en una atmósfera de argón. La reacción se calentó a reflujo durante la noche y después se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió agua desionizada (60 ml) y la mezcla se extrajo dos veces con porciones de 25 ml de una mezcla 2:1 de acetato de etilo y hexano. La capa acuosa se acidificó a pH 2 con HCl concentrado y después se extrajo 3 veces con porciones de 75 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se separó por evaporación en rotavapor con vacío para dar 10 g del producto 7 (39% de rendimiento). El material se usó sin más purificación. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 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 se agitó con agitador magnético mientras se añadía carbonato sódico (6,4 g, 60 mmol) al ácido a una velocidad que no produjera espuma excesiva. El matraz se equipó con un embudo de adición de 100 ml, que se cargó con una solución de metanotiol sulfonato de metilo (7,5 g, 60 mmol) disuelto en 30 ml de etanol al 100% destilado en vidrio. El matraz se enfrió en un baño de hielo/agua y el sistema se mantuvo en una atmósfera de argón. Se añadió gota a gota metanotiol sulfonato de metilo al matraz tan rápidamente como fuera posible sin producir espuma excesiva. Se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla de reacción se dejó agitar durante 3 horas adicionales. El disolvente se separó por evaporación en rotavapor a vacío, hasta que quedaban aproximadamente 20 ml. Después de lo cual se añadieron 10 ml de solución saturada de bicarbonato sódico y 30 ml de agua desionizada. La mezcla se lavó tres veces con porciones de 25 ml de acetato de etilo en un embudo de separación. La capa acuosa se ajustó a aproximadamente pH 2 con HCl 5 M y se extrajo dos veces con porciones de 120 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con 20 ml de una solución compuesta de solución saturada de NaCl y HCl 1 M en una relación 4:1. Después, la capa orgánica se secó sobre 14 g de sulfato sódico anhidro y el disolvente se separó por evaporación en rotavapor a vacío para dar 5,4 g del producto 8 (70% de rendimiento). El material se puede llevar a la siguiente etapa sin más purificación. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 1,54 (6H, s), 2,15-2,21 (2H, m), 2,64 (3H, s), 2,69-2,72 (2H, m). MS (M + Na<sup>+</sup>) calc.: 217,0, encontrado: 217,1

**4-Metil-4-(metilditio)pentanoato de N-hidroxisuccinimido (9):** Se disolvió el ácido metilditiopentanoico 8 (3,0 g, 15 mmol) en 20 ml de cloruro de metileno y se agitó con agitador magnético mientras se añadía N-hidroxisuccinimida (2,65 g, 23 mmol) seguido de hidrocloreto de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC, 4,4 g, 23 mmol). La mezcla se agitó en atmósfera de argón durante 2 horas. La mezcla de reacción se vertió en un embudo de separación de 125 ml, se añadieron 40 ml de acetato de etilo y la solución se lavó dos veces con porciones de 20 ml de tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 6,0, y una vez con 12 ml de solución saturada de cloruro sódico. La capa orgánica se secó sobre 14 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se separó por evaporación en rotavapor con vacío para dar 4,0 g del producto 9 (90% de rendimiento), que se usó sin más purificación. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 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<sup>+</sup>) calc.: 314,0, encontrado: 314,1

**N-metil-N-(4-metil-4-metilditio-1-oxopentil)-L-alanina (10):** Se disolvió N-Metil-L-alanina (2,85 g, 18,0 mmol) en 50 ml de una solución de dimetoxietano y agua desionizada 1:1 en un matraz de 125 ml equipado con una barra agitadora magnética. Se añadió trietilamina (6,9 g, 36 mmol) y la solución se agitó energicamente mientras se añadía gota a gota el compuesto 9 (5,44 g, 18 mmol) disuelto en 40 ml de la misma mezcla de disolventes, a lo largo de aproximadamente 5 min. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se concentró a aproximadamente 40 ml por evaporación en rotavapor con vacío, y después se añadieron 10 ml de agua desionizada y HCl 1 M, para dar un pH de aproximadamente 2. La mezcla se vertió en un embudo de separación y se extrajo dos veces con porciones de 50 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron y después se lavaron con 7 ml de solución saturada de cloruro sódico. La capa orgánica se secó sobre 8,0 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se separó por evaporación en rotavapor a vacío. El residuo se recogió en un volumen mínimo de acetato de etilo y se purificó por cromatografía en sílice (sílice: calidad ultrarrápida de 40 micrómetros, lecho de sílice: 24 x 3,0 cm, fase móvil: hexanos:acetato de etilo:ácido acético 50:48:2). Se combinaron las fracciones que contenían el producto deseado y el disolvente se separó a vacío. El ácido acético residual se separó disolviendo el residuo en un volumen mínimo de

acetato de etilo y precipitando el producto por la adición rápida pero gota a gota de hexano, con agitación. Se añadió hexano hasta que ya no se detectó producto en el líquido sobrenadante por análisis de TLC. El precipitado se secó a vacío durante 4 horas para dar 2,2 g del producto 10 (51% de rendimiento). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 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<sup>+</sup>) calc.: 302,1, encontrado: 302,0.

**N<sup>2</sup>-Desacetil-N<sup>2</sup>-(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 se agitó con agitador magnético en una atmósfera de argón mientras se añadía una solución de dicitiohexilcarbodiimida (DCC, 57,1 mg, 0,277 mmol) en 0,67 ml de diclorometano. Después de 1 min se añadió una solución de ZnCl<sub>2</sub> 1 M en éter dietílico (0,03 ml, 0,03 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se añadieron 5 ml de acetato de etilo y la mezcla se filtró a vacío a través de un papel de filtro grueso. El filtrado se lavó con 2 ml de solución saturada de bicarbonato sódico, seguido de 1 ml de solución saturada de cloruro sódico. La capa orgánica se secó sobre 2 g de sulfato sódico anhidro. El disolvente se separó a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en sílice usando una mezcla de diclorometano y metanol para separar el maitansinol sin reaccionar. Se combinaron fracciones que contenían el producto deseado y el disolvente se separó a vacío para dar una mezcla de diastereoisómeros 4e y 4f. El residuo se recogió en un volumen mínimo de acetato de etilo y se purificó en una columna de 50 cm por 250 cm, 10 micrómetros Diazem™ CN usando como fase móvil una mezcla de hexano, 2-propanol y acetato de etilo en una relación 68:8:24. El caudal era 118 ml/min. En estas condiciones, el producto deseado 4e eluyó con un tiempo de retención de 11 min y el diastereoisómero no deseado 4f tenía un tiempo de retención de 19 min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y el disolvente se separó a vacío para dar 12,0 mg del producto 4e (36% de rendimiento). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 0,80 (3H, s), 1:28-1,36 (13H, m), 1,42-1,46 (2H, m), 1,53-1,63 (2H, m), 1,64 (3H, s), 1,75-1,85 (1H, m), 1,90-2,10 (1H, m), 2,18 (1H, dd, J=3 Hz y 14 Hz), 2,31 (3H, s), 2,40-2,49 (1H, m), 2,50-2,65 (1H, m), 2,85 (3H, s), 3,04 (1H, d, J=9 Hz), 3,11 (1H,d,J=11 Hz), 3,23 (3H,s), 3,35 (3H,s), 3,49 (1H, d, J=9 Hz), 3,63 (1H, d, J=12 Hz), 3,98 (3H, s), 4,27 (1H, t, J=10 Hz), 4,79 (1H, dd, J=3 Hz y 12 Hz), 5,41 (1H, q, J=7 Hz), 5,66 (1H, dd, J=9 Hz y 15 Hz), 6,21 (1H, s), 6,42 (1H, dd, J=11 Hz y 15 Hz), 6,65 (1H, d, J=1,5 Hz), 6,73 (1H, d, J=11 Hz), 6,81 (1H, d, J=1,5 Hz). MS de alta resolución (M + H<sup>+</sup>) calc.: 826,3174, encontrado: 826,3150.

**N<sup>2</sup>-Desacetil-N<sup>2</sup>-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)maitansina (L-DM4, 4b).** El disulfuro **4e** anterior (12 mg, 0,015 mmol) se disolvió en 1,0 ml de acetato de etilo:metanol 1:1. Después se añadió una solución de ditiotretol (18 mg, 0,117 mmol) en 0,50 ml de tampón de fosfato 50 mM, pH 7,5. La solución se agitó con agitador magnético en una atmósfera de argón durante 3 horas, después se añadió 1 ml de tampón de fosfato 200 mM, pH 6,0, y la mezcla se extrajo tres veces con porciones de 2 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con 1 ml de solución saturada de cloruro sódico, después se secaron sobre 1 g de sulfato sódico anhidro. El disolvente se separó a vacío y el residuo se recogió en una cantidad mínima de acetato de etilo y se purificó en una columna de 50 cm x 250 cm, 10 micrómetros Diazem™ CN usando una fase móvil de hexano, 2-propanol y acetato de etilo en una proporción de 70:8:22. El caudal era 22 ml/min. El producto deseado **4b** eluyó con un tiempo de retención de 10 min. Se combinaron las fracciones que contenían el compuesto **4b** puro y el disolvente se separó a vacío para dar 11 mg del compuesto **4b** (97% de rendimiento). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 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). MS de alta resolución (M + Na<sup>+</sup>) calc.: δ02,3101, encontrado: 802,3116.

## 45 Ejemplo 2

### Síntesis del maitansinoide 4a

**Ácido 4-metilditio-pentanoico (13):** Una solución de ácido 4-mercaptopentanoico (**12**, 16,6 g, 124 mmol) se disolvió en 350 ml de agua desionizada en un matraz de 500 ml. La solución se agitó con agitador magnético mientras se añadía carbonato sódico (19,7 g, 186 mmol) al ácido a una velocidad que no produjera espuma excesiva. El matraz se equipó con un embudo de adición de 250 ml, que se cargó con una solución de metanotiolsulfonato de metilo (23,4 g, 186 mmol) disuelto en 220 ml de etanol al 100% destilado en vidrio. El matraz se enfrió en un baño de hielo/agua y el sistema se mantuvo en una atmósfera de argón. La solución de metanotiolsulfonato de metilo se añadió gota a gota al matraz tan rápido como fuera posible, pero a una velocidad que se previniera la espuma excesiva. Se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla de reacción se dejó agitar durante 2 horas adicionales. El disolvente se separó por evaporación en rotavapor a vacío, hasta que quedaban aproximadamente 250 ml. Después de lo cual se añadieron 30 ml de solución saturada de bicarbonato sódico y 50 ml de agua desionizada. La mezcla se lavó tres veces con porciones de 200 ml de acetato de etilo en un embudo de separación. La capa acuosa se ajustó a aproximadamente pH 2 con HCl 5 M y se extrajo dos veces con porciones de 400 ml de acetato de etilo. Las capas orgánica se combinaron, se lavaron con 60 ml de una mezcla de solución saturada de NaCl y HCl 1 M 4:1, después se secaron sobre 50 g de sulfato sódico anhidro, y finalmente el disolvente se separó por evaporación en rotavapor a vacío para dar 10,2 g del producto 13 (45% de rendimiento). El material se

usó en la siguiente reacción sin más purificación. RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  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.

**4-Metilditio-pentanoato de N-hidroxisuccinimidilo (14):** Se disolvió ácido 4-metilditio-pentanoico (13,075 g, 4,16 mmol) en 7,0 ml de cloruro de metileno y se agitó con agitador magnético mientras se añadía N-hidroxisuccinimida (0,526 g, 4,57 mmol) seguido de hidrocloreuro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (0,877 g, 4,57 mmol). La mezcla se agitó en una atmósfera de argón durante 2,5 horas, y después se vertió en un embudo de separación de 60 ml que contenía 20 ml de acetato de etilo. La solución resultante se lavó dos veces con porciones de 15 ml de tampón de fosfato potásico 50 mM, a pH 6,0, y una vez con 5 ml de solución saturada de cloruro sódico. La capa orgánica se secó sobre 8 g de Na $_2$ SO $_4$  anhidro, y el disolvente se separó por evaporación en rotavapor con vacío para dar 1,15 g del producto **14** (87% de rendimiento), que se usó para la siguiente reacción sin más purificación. RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  1,48 (3H, d,  $J = 7$ ), 2,06 (1H, m), 2,17 (1H, m), 2,55 (3H, s), 2,93 (2H, t,  $J = 7$ ), 2,98 (4H, s), 3,15 (1H, m). MS (M + Na $^+$ ) calc.: 304,1, encontrado: 304,0.

**N-Metil-N-(4-metilditio-1-oxopentil)-L-alanina (15):** Se disolvió N-Metil-L-alanina (0,64 g, 6,2 mmol) en 8 ml de una mezcla de dimetoxietano y agua desionizada 1:1 en un matraz de 125 ml equipado con una barra agitadora magnética. Se añadió trietilamina (0,841 g, 8,3 mmol) y el matraz se agitó enérgicamente mientras se añadía gota a gota una solución del compuesto **14** (1,0 g, 3,6 mmol) disuelto en 8 ml de la misma mezcla de disolventes, a lo largo de aproximadamente 5 min. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se concentró a aproximadamente 3 ml por evaporación en rotavapor a vacío, y después se añadieron 15 ml de agua desionizada y HCl 1 M, para dar un pH de aproximadamente 2. La mezcla se vertió en un embudo de separación de 60 ml y se extrajo dos veces con porciones de 15 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con 3 ml de solución saturada de cloruro sódico, después se secaron sobre 8,0 g de Na $_2$ SO $_4$  anhidro, y finalmente se separó el disolvente por evaporación en rotavapor con vacío. El residuo se recogió en un volumen mínimo de acetato de etilo y se purificó por cromatografía en sílice (sílice: calidad ultrarrápida de 40 micrómetros, lecho de sílice 24 x 3,0 cm, fase móvil hexano:acetato de etilo:ácido acético 50:48:2). Se combinaron las fracciones que contenían el producto 15 deseado y el disolvente se separó a vacío. El ácido acético residual se separó disolviendo el residuo en un volumen mínimo de acetato de etilo y precipitando el producto por la adición rápida pero gota a gota de hexano, con agitación. Se añadió hexano hasta que ya no se detectó producto en el líquido sobrenadante por análisis de TLC. El precipitado se secó a vacío para dar 0,60 g del producto **15** (62% de rendimiento). RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  1,35(3H, d,  $J = 7$ ), 1,41 (3H,d, $J = 7$ ), 1,94-2,03 (2H,m), 2,43(3H,s), 2,50-2,55 (2H,m), 2,83-2,93 (1H,m), 2,98 (3H,s), 5,14(1H, q,  $J = 7$ ). MS (M + Na $^+$ ) calc.: 288,1, encontrado: 288,1.

**N $^2$ -Desacetil-N $^2$ -(4-metilditio-1-oxopentil)maitansina (L-DM3-SMe, 4c):** Una solución de maitansinol (25 mg, 0,44 mmol) y el compuesto **15** (42,0, 0,177 mmol) en 3 ml de diclorometano se agitó con agitador magnético en una atmósfera de argón mientras se añadía una solución de dicitlohexilcarbodiimida (DCC, 57,1 mg, 0,277 mmol) en 0,67 ml de diclorometano. Después de 1 min, se añadió una solución de ZnCl $_2$  1 M en éter dietílico (0,03 ml, 0,03 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se añadieron 5 ml de acetato de etilo y la mezcla se filtró a vacío a través de un papel de filtro grueso. El filtrado se lavó con 2 ml de solución saturada de bicarbonato sódico, seguido de 1 ml de solución saturada de cloruro sódico. La capa orgánica se secó sobre 2 g de sulfato sódico anhidro, y después se separó el disolvente a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en sílice usando una mezcla de diclorometano y metanol para separar el maitansinol sin reaccionar. Se combinaron las fracciones que contenían el producto deseado y el disolvente se separó a vacío para dar una mezcla de los diastereoisómeros **4c** y **4d**. El residuo se recogió en un volumen mínimo de acetato de etilo y se purificó en una columna de 50 cm por 250 cm, 10 micrómetros Diazem $^{\text{TM}}$  CN usando como fase móvil una mezcla de hexano, 2-propanol y acetato de etilo 68:8:24. El caudal era 118 ml/min. El producto deseado **4c** eluía con un tiempo de retención de 11 min, el diastereoisómero no deseado **4d** tenía un tiempo de retención de 19 min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se separó el disolvente con vacío para dar 12,0 mg del producto **4c** (36% de rendimiento). RMN  $^1\text{H}$  (CDCl $_3$ ):  $\delta$  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 + Na $^+$ ) calc.: 834,3, encontrado: 834,3.

**N $^2$ -Desacetil-N $^2$ -(4-mercapto-1-oxopentil)maitansina (L-DM3, 4a):** Se disolvió L-DM3-SMe (**4c**, 12 mg, 0,015 mmol) en 1,0 ml de una mezcla de acetato de etilo y metanol 1:1. Después se añadió una solución de ditiotreitol (18 mg, 0,117 mmol) en 0,50 ml de tampón de fosfato 50 mM, pH 7,5. La solución de la reacción se agitó con agitador magnético en una atmósfera de argón durante 3 horas, después se añadió 1 ml de tampón de fosfato 200 mM, pH 6,0, y la mezcla se extrajo tres veces con porciones de 2 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con 1 ml de solución saturada de cloruro sódico, después se secaron sobre 1 g de sulfato sódico anhidro. El disolvente se separó a vacío y el residuo se recogió en una cantidad mínima de acetato de etilo y se purificó en una columna de 50 cm x 250 cm, 10 micrómetros Diazem $^{\text{TM}}$  CN usando como fase móvil una mezcla de hexano, 2-propanol y acetato de etilo 70:8:22. El caudal era 22 ml/min. El producto deseado eluía con un tiempo de retención de 10 min. Se combinaron las fracciones que contenían producto puro y el disolvente se separó a vacío para dar 11 mg del producto **4a** (97% de rendimiento). RMN  $^1\text{H}$  (CDCl $_3$ ):  $\delta$  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), 2,499-2,62 (2H, m), 2,88 (3H, s), 3,04 (1H, d,  $J=9$  Hz), 3,11 (H, 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<sup>+</sup>) calc.: 788,3, encontrado: 788,3.

### 5 EJEMPLO 3

#### Síntesis del maitansinoide 4g,h (FIG. 3c).

**R-1,3-Di-O-p-toluenosulfonil-butano (17):** Una solución de *R*-(-)-1,3-butanodiol (**16**, 2,00 g, 22,22 mmol) en una mezcla de piridina seca (40 ml) y tolueno seco (60 ml), se trató con cloruro de *p*-toluenosulfonilo (12,70 g, 66,84 mmol) en atmósfera de argón a 0°C. Después de agitar a 0°C durante 5 min, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 2 h, la mezcla se evaporó a vacío, se volvió a disolver en acetato de etilo y se lavó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, seguido de solución saturada de NaCl. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó el disolvente. La purificación por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano 1:2 (v/v) dio 6,51 g (74%) del producto del título **17**.  $R_f = 0,40$  (1:1 EtOAc/hexano); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 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); RMN <sup>13</sup>C 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)<sup>+</sup>, 421,93 (M+1+Na)<sup>+</sup>.

**S-4-O-Etilxántico-pentanitrilo (18):** Una solución de *R*-1,3-di-O-*p*-toluenosulfonil-butano (**17**, 4,80 g, 12,06 mmol) en DMSO seco (50 ml) se trató con NaCN (0,65). Después de agitar a t.a. en atmósfera de argón durante 18 h, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó sucesivamente con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 M frío a pH 7,5, agua y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 M a pH 4,0. La capa orgánica se separó y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó para dar 2,63 g de *R*-3-O-*p*-toluenosulfonil-pentanitrilo bruto. MS 275,80 (M + Na)<sup>+</sup>, 276,75 (M + 1 + Na)<sup>+</sup>. El producto se usó directamente sin más purificación.

A la solución de *R*-3-O-*p*-toluenosulfonil-pentanitrilo bruto (2,63 g) en etanol (15 ml) se añadió O-etilxantato de potasio (4,55 g) en etanol (50 ml). Después de agitar en atmósfera de argón durante la noche, la mezcla se concentró, se diluyó con acetato de etilo, y se filtró a través de una columna corta de sílice. El eluyente se concentró y se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con EtOAc/hexano 1:4 (v/v), para dar 1,54 g (63%, 2 etapas) del producto del título **18**.  $R_f = 0,40$  (EtAc/hexano 1:4). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 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); RMN <sup>13</sup>C 213,04, 119,16, 70,28, 44,57, 32,10, 20,20, 15,21, 13,93; MS: 226,51 (M + Na)<sup>+</sup>, 242,51 (M + K)<sup>+</sup>.

**Ácido S-(+)-4-metilditio-pentanoico (19):** A una solución de *S*-4-O-etilxántico-pentanitrilo (**18**, 1,95 g (9,61 mmol) en una mezcla de etanol (10 ml) y agua (150 ml) se añadieron 5,0 g de NaOH. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante la noche en atmósfera de argón. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua (150 ml) y se extrajo con EtOAc/hexano 1:1 (2 x 100 ml). La capa acuosa se acidificó con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> hasta pH 2,5 ~ 3,0 y se extrajo con EtOAc (6 x 75 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad para dar el ácido *S*-4-mercaptopentanoico bruto. Este producto bruto se usó directamente para la siguiente etapa sin más purificación.

A una solución del ácido *S*-4-mercaptopentanoico bruto (1,2 g) en una mezcla de etanol (50 ml) y NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> 0,5 M, pH 7,0 (75 ml), se añadió gota a gota metanotiol sulfonato de metilo (1,47 g, 11,65 mmol) en 5 de THF seco (5 ml) a lo largo de 45 min a 0°C. Después de agitar en atmósfera de argón a 0°C durante 30 min, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 2 h, la mezcla se concentró y se extrajo con diclorometano (2 x 50 ml). La capa acuosa se acidificó con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> hasta pH 2,5 ~ 3,0 y se extrajo con EtOAc (4 x 100 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con (HOAc/EtOAc/hexano 1:100:400) para dar 1,43 g (83%) del producto del título **19**.  $R_f = 0,32$  (HOAc/EtAc/hexano 1:100:400); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 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); RMN <sup>13</sup>C 179,18, 45,35, 31,58, 30,73, 24,70, 21,05; MS: 202,92 (M+Na)<sup>+</sup>, 203,91 (M+1+Na)<sup>+</sup>;  $[\alpha] = 41,35$  (c = 2, CH<sub>3</sub>OH).

**N-Metil-N-[4-(S)-metilditio-1-oxopentil]-S-alanina (15a):** El ácido *S*-(+)-4-(metilditio)-pentanoico (**19**) se convirtió en el éster de *N*-hidroxisuccinimido **20**, por el método descrito antes para el compuesto **14**. La reacción con *N*-metil-*L*-alanina por el procedimiento descrito antes para el compuesto **15** dio el compuesto **15a**, (62% de rendimiento). RMN <sup>1</sup>H  $\delta$  1,36 (3H, d,  $J = 7$ ), 1,42 (3H,d, $J = 7$ ), 1,93-1,98 (2H,m), 2,40(3H,s), 2,50-2,53 (2H,m), 2,90-2,95 (1H,m), 2,99 (3H,s), 5,14 (1H, q,  $J = 7$ ), MS: (M + Na) calc.: 288,1, encontrado: 288,1

**N<sup>2</sup>-Desacetil-N<sup>2</sup>-(4-(S)-metilditio-1-oxopentil)maitansina (DM3-SMe, 4g,h):** El maitansinol (**11**) se acopló con el compuesto **15a**, usando DCC y cloruro de cinc en diclorometano, como se ha descrito antes, para la síntesis del compuesto **4c**. Se obtuvo una mezcla de 2 diastereoisómeros que llevan el resto *N*-metil-*S*-alanilo (**4g**, *S,S*) y el resto *N*-metil-*R*-alanilo (**4h**,*R,S*). Los diastereoisómeros se separaron por HPLC con una columna ciano Kromasil (4,6 mm x 250 mm), usando una elución isocrática con un caudal de 1 ml/min, con hexano:acetato de etilo:2-propanol (68:24:8, v/v/v). En estas condiciones, el isómero **4g** (*S,S*) eluyó a 24,5 min. Espectro de masas: m/z 834,2 (M + Na)<sup>+</sup>. El pico para el otro isómero **4h** (*R,S*) se separó bien y eluyó a 34,6 min. MS: m/z 834,2 (M + Na)<sup>+</sup>.

## EJEMPLO 4

## Síntesis del maitansinoide 4k,I (FIG. 3d)

**S-1,3-Di-O-p-toluenosulfonil-butano 22:** Una solución de S-(-)-1,3-butanodiol (21,2,00 g, 22,22 mmol) en una mezcla de piridina seca (40 ml) y tolueno seco (60 ml) se trató con cloruro de p-toluenosulfonilo (12,70 g, 66,84 mmol) en atmósfera de argón a 0°C. Después de agitar a 0°C durante 5 min, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 2 h, la mezcla se evaporó a vacío. El residuo se volvió a disolver en acetato de etilo, se lavó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M y solución saturada de NaCl. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano 1:2 para dar 6,25 g (71%) del producto del título **22** R<sub>f</sub> = 0,40 (EtOAc/hexano 1:1); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 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); RMN <sup>13</sup>C 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)<sup>+</sup>.

**R-4-O-etilxántico-pentanonitrilo (23):** Una solución de S-1,3-di-O-p-toluenosulfonil-butano (**22**, 6,25 g, 15,70 mmol) en 60 de DMSO seco (50 ml) se trató con NaCN (0,85 g). La mezcla de reacción se agitó en atmósfera de argón durante 18 h a t.a. Después, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó secuencialmente con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 M frío a pH 7,5, agua, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 M a pH 4,0. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó para dar 3,62 g de S-3-O-p-toluenosulfonil-pentanonitrilo bruto. El producto se usó directamente sin más purificación.

A una solución de S-3-O-p-toluenosulfonil-pentanonitrilo bruto (3,62 g) en etanol (50 ml) se añadió O-etilxantato de potasio (5,72 g) en etanol (100 ml). Después de agitar en atmósfera de argón durante la noche, la mezcla se concentró, se diluyó con acetato de etilo, y se filtró a través de una columna corta de gel de sílice. El eluyente se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con EtOAc/hexano 1:4, para dar 2,0 g (62%, 2 etapas) del producto del título **23**. R<sub>f</sub> = 0,40 (EtAc/hexano1:4). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 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); RMN <sup>13</sup>C 213,04, 119,16, 70,28, 44,57, 32,10, 20,20, 15,21, 13,93; MS: 226,51 (M + Na)<sup>+</sup>, 242,51 (M + K)<sup>+</sup>.

**Ácido R-(-)-4-metilditio-pentanoico (24):** Una solución de R-4-O-etilxántico-pentanonitrilo (**23**, 2,0 g, 9,85 mmol) en una mezcla de etanol (10 ml) y 200 ml de agua se trató con NaOH (6,0 g). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante la noche en atmósfera de argón. La mezcla se diluyó con agua (150 ml) y se extrajo con EtOAc/hexano 1:1 (2 x 100 ml). La capa acuosa se acidificó con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> hasta pH 2,5 ~ 3,0 y se extrajo con EtOAc (6 x 75 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad para dar el ácido R-4-mercaptopentanoico bruto. Este producto bruto se usó directamente para la siguiente etapa sin más purificación.

A una solución de 1,60 g del ácido R-4-mercaptopentanoico bruto en una mezcla de etanol (50 ml) y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M, a pH 7,0 (75 ml), se añadió gota a gota metanotiol sulfonato de metilo (1,96 g, 15,53 mmol) en THF seco (7 ml) a lo largo de 45 min a 0°C. La mezcla de reacción se agitó en atmósfera de argón a 0°C durante 30 min y después a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se concentró y se extrajo con diclorometano (2 x 50 ml). La capa acuosa se acidificó con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> hasta pH 2,5 ~ 3,0 y se extrajo con EtOAc (4 x 100 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con HOAc/EtOAc/hexano 1:100:400 para dar 1,65 g (93%) del producto del título **24**. R<sub>f</sub> = 0,32 (HOAc/EtOAc/hexano 1:100:400); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 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); RMN <sup>13</sup>C 179,46, 45,67, 31,91, 31,07, 25,02, 21,36; MS: 202,9 (M+Na)<sup>+</sup>, 203,9 (M+1+Na)<sup>+</sup>; [α] = -39,16 (c = 2, CH<sub>3</sub>OH).

**N-Metil-N-[4-(R)-metilditio-1-oxopentil]-S-alanina (15b):** El ácido R-(+)-4-metilditio-pentanoico (**24**) se convirtió en el éster de N-hidroxisuccinimido **25**, por el método descrito antes para el compuesto **14**. La reacción con N-metil-L-alanina por el procedimiento descrito antes para el compuesto **15** dio el compuesto **15b**. MS: m/z (M + Na): calc.: 288,1, encontrado: 288,1

**N<sup>2</sup>-Desacetil-N<sup>2</sup>-(4-(R)-metilditio-1-oxopentil)maitansina (DM3-SMe, 4k,I):** El maitansinol (**11**) se acopló con el compuesto **15b**, usando DCC y cloruro de cinc en diclorometano, como se ha descrito antes para la síntesis del compuesto **4c**. Se obtuvo una mezcla de 2 diastereoisómeros que llevan el resto N-metil-S-alanilo (**4k**, S,R) y el resto N-metil-R-alanilo (41, R,R). Los diastereoisómeros se separaron por HPLC con una columna ciano Kromasil (4,6 mm x 250 mm), usando una elución isocrática con un caudal de 1 ml/min, con hexano:acetato de etilo:2-propanol (68:24:8, v/v/v). En estas condiciones, el isómero **4k** (S,R) eluyó a 23,9 min. Espectro de masas: m/z 834,2 (M + Na)<sup>+</sup>. El pico para el otro isómero **4l** (R,R) se separó bien y eluyó a 33,7 min. MS: m/z 834,2 (M + Na)<sup>+</sup>.

## EJEMPLO 5a

## Citotoxicidad in vitro de maitansinoides y conjugados de anticuerpo-maitansinoide

La línea celular KB (ATCC CCI-17) es de origen epitelial humano. La línea celular SK-BR-3 (ATCC HTB-30) se estableció a partir de un adenocarcinoma de mama 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 de células de linfoma de Burkitt Ramos (ATCC CRL-1596) y la línea celular de leucemia mieloide humana HL-60 (ATCC CCL-240) se obtuvieron todas de ATCC, Maryland. Las líneas celulares se desarrollaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Biowhittaker, Walkersville, MD) con L-glutamina complementado con suero bovino fetal al 10% (Hyclone, Logan, Utah) y sulfato de gentamicina 50 µg/ml (Life Technologies, Rockville, MD). Las células se mantuvieron a 36-37,5°C en una atmósfera humidificada que contenía CO<sub>2</sub> al 6%.

El estudio de citotoxicidad llevado a cabo usaba un ensayo clonogénico. Las líneas celulares de ensayo se sembraron en discos de cultivo de 6 pocillos con un número constante de 1000 células por pocillo. Las células se incubaron con diferentes concentraciones (de 0 a 3 nM) de diferentes maitansinoides (libres o conjugados con anticuerpos) durante 72 horas. Después el medio se aspiró de las placas y se reemplazó por medio de nueva aportación. Los cultivos se dejaron crecer y formar colonias, durante un total de 7-10 días después de la siembra. Después los cultivos se fijaron y tiñeron con violeta cristal al 0,2% en formalina/PBS al 10% y se contaron las colonias. La eficacia de la siembra de células no tratadas (medio solo) se determinó dividiendo el número de colonias contadas entre el número de células sembradas. La fracción de supervivencia de las células expuestas a los fármacos se determinó dividiendo el número de colonias en pocillos que se expusieron al fármaco entre el número de colonias en los pocillos 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,e** que llevan enlaces disulfuro impedidos son muy citotóxicos contra las líneas celulares ensayadas, SK-BR-3 y A-375, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo de  $7 \times 10^{-12}$  M a  $2,5 \times 10^{-11}$  M. Por lo tanto, la incorporación de los sustituyentes alquilo en el carbono que lleva el resto disulfuro ha conservado una alta potencia citotóxica. El maitansinoide que contiene tiol con impedimento estérico **4a** de la presente invención es de 30 a 50 veces más potente que el correspondiente maitansinoide no impedido **1** descrito previamente. Por lo tanto, la incorporación de sustituyentes alquilo en el átomo de carbono que lleva el resto tiol aumenta mucho la potencia.

Los resultados de los ensayos in vitro de los conjugados de anticuerpo de los maitansinoides de la presente invención se muestran en las figuras 4c y 4d. La unión de los dos nuevos maitansinoides, **4a** o **4b**, al anticuerpo huC242 dirigido contra tumores de colon humano, produjo la muerte específica de antígeno de las células diana. Por lo tanto, los conjugados son muy potentes frente a células COLO 205 positivas para el antígeno, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo de 1,1 a  $1,3 \times 10^{-11}$  M. En cambio, los conjugados son de 100 a 200 veces menos citotóxicos frente a células A-375 negativas para el antígeno, demostrando que los nuevos maitansinoides de la presente invención producen conjugados que tienen enlaces disulfuro con impedimento estérico, y presentan alta citotoxicidad específica de la diana.

#### EJEMPLO 5b

##### Preparación de conjugados citotóxicos del anticuerpo huC242 usando los maitansinoides **4a** o **4b** (Método A, FIG. 5 a,b)

Una solución del anticuerpo huC242 (8 mg/ml) en tampón acuoso (fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 50 mM, sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético 2 mM), pH 6,5, se incubó durante 2 h con un exceso molar de 7 a 10 veces de SPDP [3-(2-piridilditio)propionato de succinimidilo, **3a**], o con 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB, **3b**). La mezcla de reacción se purificó por paso a través de una columna de filtración de gel Sephadex G25. La concentración del anticuerpo se determinó por espectrofotometría usando los coeficientes de extinción conocidos para el anticuerpo  $\epsilon_{280\text{nm}} = 217.560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

El anticuerpo modificado se diluyó a 2,5 mg/ml en tampón acuoso (fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 50 mM, sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético 2 mM), pH 6,5, y después se trató con un exceso molar de 1,5 a 2,5 veces de DM3 o DM4 en dimetilacetamida (la concentración final de DMA era 3% en v/v). La mezcla de reacción se incubó durante 18 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó por paso a través de una columna de filtración de gel Sephadex G25. La concentración del conjugado se determinó por espectrofotometría usando los coeficientes de extinción conocidos para el anticuerpo  $\epsilon_{280\text{nm}} = 217.560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{252\text{nm}} = 80.062 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; para DM3 o DM4,  $\epsilon_{280\text{nm}} = 5.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{252\text{nm}} = 26.790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . El conjugado resultante era monómero y contenía, como media, 3,2-3,5 moléculas de DM3 o DM4 unidas por molécula de anticuerpo.

#### EJEMPLO 5c

##### Preparación de conjugados citotóxicos del anticuerpo huC242 usando los maitansinoides **4a** o **4b** (Método B, FIG. 5c)

Una solución del anticuerpo huC242 (8 mg/ml) en tampón acuoso (fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 50 mM, sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético 2 mM), pH 6,5, se incubó durante 2 h con un exceso molar de 7 a 10 veces de SMCC [4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, **26**]. La mezcla de reacción se purificó por paso a través de una columna de filtración de gel Sephadex G25. La concentración del anticuerpo se determinó por espectrofotometría usando los coeficientes de extinción conocidos para el anticuerpo  $\epsilon_{280\text{nm}} = 217.560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

El anticuerpo modificado se diluyó a 2,5 mg/ml en tampón acuoso (fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 50 mM, sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético 2 mM), pH 6,5, y después se trató con un exceso molar de 1,5 a 2,5 veces de DM3 o DM4 en dimetilacetamida (la concentración final de DMA era 3% en v/v). La mezcla de reacción se incubó durante 18 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó por paso a través de una columna de filtración de gel Sephadex G25. La concentración del conjugado se determinó por espectrofotometría usando los coeficientes de extinción conocidos (para el anticuerpo  $\epsilon_{280\text{nm}} = 217.560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{252\text{nm}} = 80.062 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; para DM3 o DM4,  $\epsilon_{280\text{nm}} = 5.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{252\text{nm}} = 26.790 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). El conjugado resultante era monómero y contenía, como media, 3,2-3,5 moléculas de DM3 o DM4 unidas por molécula de anticuerpo.

#### EJEMPLO 5d

#### 10 Preparación de conjugados citotóxicos del anticuerpo huC242 usando los maitansinoides 4a o 4b (Método C, FIG. 5d)

Una solución del anticuerpo huC242 (8 mg/ml) en tampón acuoso (fosfato potásico 50 mM, cloruro sódico 50 mM, sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético 2 mM), pH 6,5, se incubó durante 2 h con un exceso molar de 7 a 10 veces con SIAB [(4-yodoacetil)aminobenzoato de *N*-succinimidilo, **27**). La mezcla de reacción se purificó por paso a través de una columna de filtración de gel Sephadex G25. La concentración del anticuerpo se determinó por espectrofotometría usando los coeficientes de extinción conocidos para el anticuerpo  $\epsilon_{280\text{nm}} = 217.560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### EJEMPLO 6

#### Eficacia in vivo de conjugados de huC242-maitansinoide contra xenoinjertos de HT-29.

Se inoculó en ratones SCID hembra de 5 semanas de edad (20 animales) por vía subcutánea en el costado derecho, células de carcinoma de colon humano HT-29 ( $1,5 \times 10^6$  células/ratón) en 0,1 ml de medio exento de suero. Los tumores se desarrollaron durante 11 días hasta un tamaño medio de  $100 \text{ mm}^3$ . Los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (5 animales por grupo). El primer grupo recibió el conjugado huC242-DM1 (DM1 dosis de  $75 \mu\text{g}/\text{kg}$ , una vez al día x 5) administrado por vía intravenosa. El segundo grupo recibió el conjugado huC242-DM3 (DM3 dosis de  $75 \mu\text{g}/\text{kg}$ , una vez al día x 5) administrado por vía intravenosa. El tercero recibió el conjugado huC242-DM4 (DM4 dosis de  $75 \mu\text{g}/\text{kg}$ , una vez al día x 5), mientras que un cuarto grupo de animales servía como control y recibió PBS usando el mismo esquema de tratamiento que en los grupos 1-3.

Los tamaños de los tumores se midieron dos veces por semana y los volúmenes tumorales se calcularon con la siguiente fórmula: volumen tumoral =  $\frac{1}{2}(\text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{altura})$ . 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 cerca de  $1000 \text{ mm}^3$  en 35 días. El tratamiento con huC242-DM1 produjo un retraso del crecimiento tumoral de 18 días, mientras que los conjugados hechos con los maitansinoides **4a** y **4b** de la presente invención eran significativamente más eficaces y prolongaron el retraso del crecimiento tumoral a 28 días y 36 días, respectivamente.

#### EJEMPLO 7

#### 35 Eficacia in vivo de conjugados de huC242-maitansinoide contra xenoinjertos de COLO 205.

Se inoculó en ratones SCID hembra de 5 semanas de edad (20 animales) por vía subcutánea en el costado derecho, células de carcinoma de colon humano COLO 205 ( $1,5 \times 10^6$  células/ratón) en 0,1 ml de medio exento de suero. Los tumores se desarrollaron durante 11 días hasta un tamaño medio de  $100 \text{ mm}^3$ . Los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (5 animales por grupo). El primer grupo recibió el conjugado huC242-DM1 (DM1 dosis de  $75 \mu\text{g}/\text{kg}$ , una vez al día x 5) administrado por vía intravenosa. El segundo grupo recibió el conjugado huC242-DM3 (DM3 dosis de  $75 \mu\text{g}/\text{kg}$ , una vez al día x 5) administrado por vía intravenosa. El tercer grupo recibió el conjugado huC242-DM4 (DM4 dosis de  $75 \mu\text{g}/\text{kg}$ , una vez al día x 5), mientras que un cuarto grupo de animales servía como control y recibió PBS usando el mismo esquema de tratamiento que en los grupos 1-3.

Los tamaños de los tumores se midieron dos veces por semana y los volúmenes tumorales se calcularon con la siguiente fórmula: volumen tumoral =  $\frac{1}{2}(\text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{altura})$ . 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 cerca de  $900 \text{ mm}^3$  en 24 días. El tratamiento con huC242-DM1 produjo un retraso del crecimiento tumoral de 20 días, mientras que el conjugado hecho con el maitansinoide **4a** de la presente invención era considerablemente más eficaz y produjo remisiones tumorales completas que duraban 45 días. El tratamiento con el conjugado hecho con el maitansinoide **4b** de la presente invención era incluso más eficaz, produciendo curas de todos los animales tratados.



**EJEMPLO 8****Eficacia in vivo de conjugados de MY9-6-maitansinoide contra xenoinjertos de HL-60**

Se inoculó en ratones SCID hembra de 5 semanas de edad (20 animales) por vía subcutánea en el costado derecho, células de leucemia mieloide humana HL-60 ( $1,5 \times 10^6$  células/ratón) en 0,1 ml de medio exento de suero. Los tumores se desarrollaron durante 12 días hasta un tamaño medio de  $100 \text{ mm}^3$ . Los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (5 animales por grupo). El primer grupo recibió el conjugado MY9-6-DM1 (DM1 dosis de  $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ , una vez al día x 5) administrado por vía intravenosa. El segundo grupo recibió el conjugado MY9-6-DM3 (DM3 dosis de  $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ , una vez al día x 5) administrado por vía intravenosa. El tercer grupo recibió el conjugado MY9-6-DM4 (DM4 dosis de  $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ , una vez al día x 5) administrado por vía intravenosa, mientras que un cuarto grupo de animales servía como control y recibió PBS usando el mismo esquema de tratamiento que en los grupos 1-3.

Los tamaños de los tumores se midieron dos veces por semana y los volúmenes tumorales se calcularon con la siguiente fórmula: volumen tumoral =  $\frac{1}{2}(\text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{altura})$ . 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 cerca de  $1600 \text{ mm}^3$  en 21 días. El tratamiento con MY9-6-DM1 produjo un retraso del crecimiento tumoral de aproximadamente 5 días, mientras que los conjugados hechos con los maitansinoides **4a** y **4b** de la presente invención eran significativamente más eficaces prolongando el retraso del crecimiento tumoral a más de 20 días.

**EJEMPLO 9****Preparación de un conjugado citotóxico de anticuerpo huMy9-6 usando el maitansinoide DM4 (4b).**

Una solución del anticuerpo huMy9-6 en una concentración de  $8 \text{ mg}/\text{ml}$  se incubó durante 2 h con un exceso molar de 6,5 veces de SSNPB [4-(5'-nitro-2'-piridilditio)butirato de sulfosuccinimidilo] en tampón de fosfato potásico  $50 \text{ mM}$ , pH 6,5, que contenía ácido etilendiaminotetraacético  $2 \text{ mM}$  (tampón A) con 5% de etanol. El anticuerpo modificado se purificó por paso a través de una columna de filtración en gel Sephadex G25 equilibrada en tampón A y la concentración del anticuerpo purificado se determinó por espectrofotometría usando el coeficiente de extinción para el anticuerpo a  $280 \text{ nm}$ . El anticuerpo modificado se diluyó a  $4,9 \text{ mg}/\text{ml}$  con tampón A y se incubó durante 18 h a temperatura ambiente con un exceso molar de 1,7 veces de DM4, que se añadió a la mezcla de reacción como una solución madre en dimetilacetamida (la concentración final de la dimetilacetamida era 3% en v/v). El conjugado de anticuerpo-fármaco se purificó por paso a través de una columna Sephadex G25 equilibrada en PBS, a pH 6,5. La concentración del conjugado se determinó espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción conocidos para el anticuerpo y DM4 (para el anticuerpo,  $\epsilon_{280\text{nm}} = 206.460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{252\text{nm}} = 72.261 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; para DM4,  $\epsilon_{280\text{nm}} = 5.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{252\text{nm}} = 26.790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). El conjugado de anticuerpo-fármaco resultante contenía una media de 3,6 moléculas de DM4 por molécula de anticuerpo. El análisis bioquímico demostró que el anticuerpo permanecía más de 94% monomérico después de conjugación y tenía una afinidad de unión comparable al anticuerpo no modificado, determinado por citometría de flujo. La cantidad de fármaco asociada con el anticuerpo que no se había unido de forma covalente (fármaco libre) se determinó por análisis de HPLC y se encontró que era menos de 1% del fármaco total unido.

**EJEMPLO 10****Selectividad y eficacia in vitro del conjugado huMy9-6-DM4**

La citotoxicidad de huMy9-6-DM4 contra células que expresan CD33 (HL-60) y células Namalwa negativas para CD33 se ensayó usando un ensayo clonogénico, donde la actividad citolítica se determina cuantificando el número de colonias que pueden crecer después de tratamiento. huMy9-6-DM4 presenta potente actividad citolítica contra células tumorales humanas HL-60 positivas para CD33 (figura 10). No se observó toxicidad significativa contra células Namalwa humanas negativas para CD33, indicando que la citotoxicidad dependiente de CD33 era debida a la localización específica por el anticuerpo anti-CD33, huMy9-6 del conjugado.

**EJEMPLO 11****Eficacia in vivo de conjugados huMy9-6-DM4 contra xenoinjertos de tumor humano HL60 en ratones SCID**

La eficacia de huMy9-6-DM4 in vivo se determinó en ratones SCID que llevaban xenoinjertos de tumor HL-60 humano. Se inyectaron células HL-60 por vía subcutánea y se dejó que los tumores crecieran hasta un tamaño medio de  $100 \text{ mm}^3$ . El conjugado huMy9-6-DM4 se suministró por vía i.v. una vez al día durante 5 días con la dosis indicada en la figura 11. La dosis se expresa como  $\mu\text{g}$  de DM4 en el conjugado, que corresponde a una dosis de anticuerpo de aproximadamente  $67 \mu\text{g}$  por  $\mu\text{g}$  de DM4. El volumen tumoral se midió como una indicación de la eficacia del tratamiento y se vigiló el peso corporal de los ratones para indicar la toxicidad debida al tratamiento. huMy9-6-DM4 induce retraso del crecimiento tumoral prolongado de xenoinjertos de células HL-60 humanas con dosis que producen poca toxicidad (figura 11). La eficacia de huMy9-6-DM4 también se comparó con la de huMy9-6-DM1. Inesperadamente se encontró que huMy9-6-DM4 era más eficaz que huMy9-6-DM1. huMy9-6-DM4 mantuvo a

los animales en remisión completa (RC) durante casi sesenta días, mientras que los animales tratados con huMy9-6-DM1 recayeron después de aproximadamente 20 días en RC.

#### EJEMPLO 12

##### Preparación de un conjugado citotóxico de anticuerpo huB4 usando el maitansinoide DM4 (4b).

5 Una solución del anticuerpo huB4 en una concentración de 20 mg/ml se incubó durante 1,5 h con un exceso molar de 8 veces de SSNPB [4-(5'-nitro-2'-piridilditio)butirato de sulfosuccinimidilo] en tampón de fosfato potásico 50 mM, a pH 6,5, que contenía ácido etilendiaminotetraacético 2 mM (tampón A) con 5% de dimetilacetamida. El anticuerpo modificado se purificó por paso a través de una columna de filtración en gel Sephadex G25 equilibrada en tampón A y la concentración del anticuerpo purificado se determinó por espectrofotometría usando el coeficiente de extinción para el anticuerpo a 280 nm ( $199.560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). El anticuerpo modificado se diluyó a 8 mg/ml con tampón A y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente con un exceso molar de 1,7 veces de DM4, que se añadió a la mezcla de reacción como una solución madre en dimetilacetamida (la concentración final de la dimetilacetamida era 3% en v/v). El conjugado de anticuerpo-fármaco se purificó por paso a través de una columna Sephadex G25 y una columna Sephadex S300, ambas equilibradas en tampón de PBS, pH 6,5. La concentración del conjugado se determinó por espectrofotometría usando los coeficientes de extinción conocidos para el anticuerpo ( $\epsilon_{280\text{nm}}: 199.560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{252\text{nm}}: 67.850 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y DM4 ( $\epsilon_{280\text{nm}} = 5.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{252\text{nm}} = 26.790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). El conjugado de anticuerpo-fármaco resultante contenía una media de 4,0 moléculas de DM4 por molécula de anticuerpo. El análisis bioquímico demostró que el anticuerpo permanecía más de 98% monomérico después de conjugación y tenía una afinidad de unión comparable al anticuerpo no modificado, determinado por citometría de flujo. La cantidad de fármaco asociada con el anticuerpo que no se había unido de forma covalente (fármaco libre) se determinó por análisis de HPLC y era aproximadamente 2% del fármaco total unido.

#### EJEMPLO 13

##### Selectividad y eficacia del conjugado huB4-DM4 in vitro

25 La citotoxicidad de huB4-DM4 contra células que expresan CD19 (Ramos) comparado con una línea celular negativa para CD19 (Colo 205) se ensayó usando un ensayo basado en MTT, donde la actividad citolítica se determina cuantificando el número de células viables que permanecen después de tratamiento con conjugado. El número de células viables se determina por cuantificación espectrofotométrica después de incubación de las células con colorante vital MTT. HuB4-DM4 presenta una potente actividad citolítica contra células tumorales humanas Ramos positivas para CD19 in vitro (figura 12). No se observó una toxicidad significativa contra células negativas para CD19, indicando que la citotoxicidad dependiente de CD19 se debía a la localización específica por el anticuerpo anti-CD19, huB4.

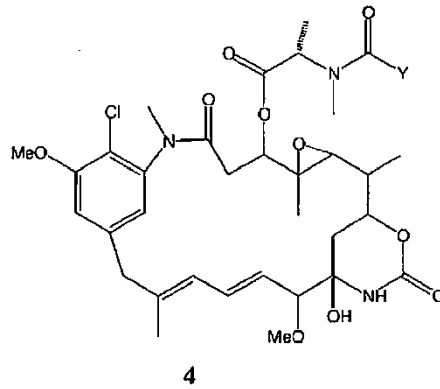
#### EJEMPLO 14

##### Eficacia in vivo del conjugado huB4-DM4 contra xenoinjertos de tumores humanos Ramos en ratones SCID

35 La eficacia de huB4-DM4 in vivo se determinó usando ratones SCID que llevaban xenoinjertos de tumores Ramos humanos establecidos. Se inyectaron células Ramos por vía subcutánea y se dejó que los tumores crecieran hasta un tamaño medio de  $100 \text{ mm}^3$ . El conjugado HuB4-DM4 se suministró por vía i.v. como una sola inyección con la dosis indicada en la figura 13a. La dosis se expresa como  $\mu\text{g}$  de DM4 en el conjugado, que corresponde a una dosis de anticuerpo de aproximadamente  $44 \mu\text{g}$  por  $\mu\text{g}$  de DM4. El volumen tumoral se midió como una indicación de la eficacia del tratamiento y se vigiló el peso corporal para indicar toxicidad debida al tratamiento. Con dosis superiores a  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ , HuB4-DM4 produce remisión completa de los tumores en todos los animales. Los animales permanecieron sin enfermedad medible durante aproximadamente 35 días en el grupo de tratamiento de  $100 \text{ mg}/\text{kg}$ , y durante más de 55 días en los dos grupos de dosis mayores. Estos tratamientos produjeron muy poca toxicidad, si produjeron alguna (figura 13b) considerado por cambios en el peso corporal de los animales tratados.

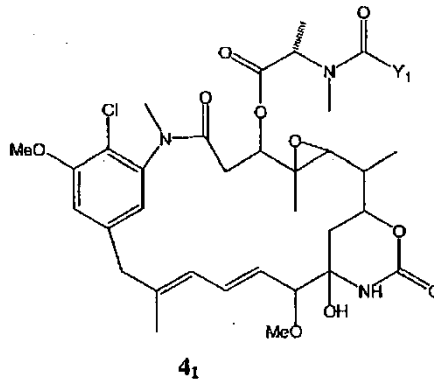
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula 4:



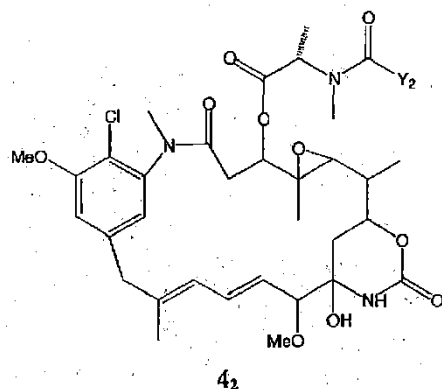
en donde Y es  $(CH_2)_2CR_1R_2SZ$ , en donde:

- 5  $R_1$  es metilo y  $R_2$  es H o  $R_1$  y  $R_2$  son metilo; y Z es H o  $-SCH_3$ .
- 2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde  $R_1$  es metilo,  $R_2$  es H y Z es H.
- 3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde  $R_1$  y  $R_2$  son metilo y Z es H.
- 4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde  $R_1$  es metilo,  $R_2$  es H y Z es  $-SCH_3$ .
- 10 **5.** El compuesto de la reivindicación 1, en donde  $R_1$  y  $R_2$  son metilo y Z es  $-SCH_3$ .
- 6. Un conjugado de maitansinoide-agente de unión a células, en donde el maitansinoide se representa por la fórmula **4<sub>1</sub>**:

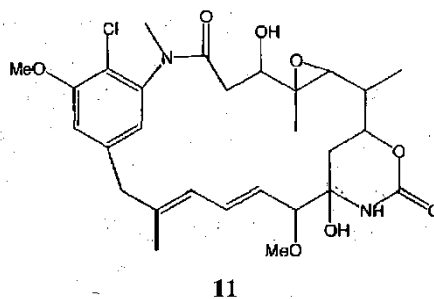


en donde:

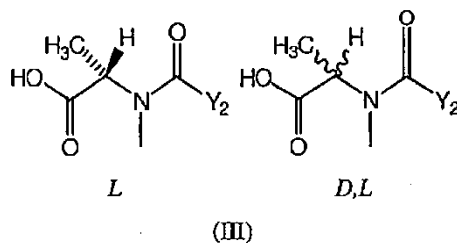
- 15  $Y_1$  representa  $(CH_2)_2CR_1R_2S-$ , en donde  $R_1$  y  $R_2$  son como se definen en la reivindicación 1.
- 7. El conjugado de maitansinoide-agente de unión a células de la reivindicación 6, en donde  $R_1$  es metilo y  $R_2$  es H.
- 8. El conjugado de maitansinoide-agente de unión a células de la reivindicación 6, en donde  $R_1$  y  $R_2$  son metilo.
- 9. Un método de esterificación de maitansinol para dar un maitansinoide de fórmula **4<sub>2</sub>**:



comprendiendo dicho método hacer reaccionar el maitansinol de la estructura **11** en el C-3:



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



5

en donde:

$Y_2$  representa  $(CH_2)_2CR_1R_2SZ_2$ ,  
en donde:

10

$R_1$  es metilo y  $R_2$  es H o  $R_1$  y  $R_2$  son metilo; y  
 $Z_2$  es SR o -COR, en donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o radical aromático heterocíclico o heterocicloalquilo.

10. El método de la reivindicación 9, en donde el compuesto de fórmula (III) se representa por la fórmula (III-L).

11. El método de la reivindicación 9, en donde  $R_1$  es metilo y  $R_2$  es H.

15

12. El método de la reivindicación 9, en donde dicho compuesto de fórmula (III-L) es *N*-metil-*N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxo-pentil]-*S*-alanina (**15a**(*S,S*)), *N*-metil-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxo-pentil]-*S*-alanina (**15b**(*S,R*)) o una mezcla de **15a**(*S,S*) y **15b**(*S,R*).

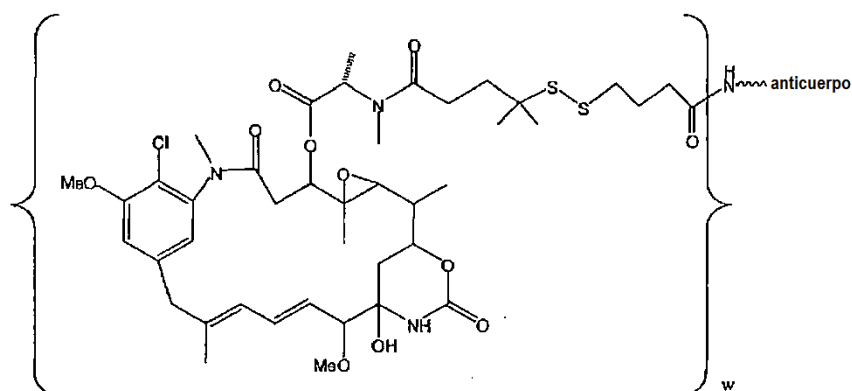
20

13. El método de la reivindicación 9, en donde el compuesto de fórmula (III-D,L) es la *N*-metil-*N*-[4-metilditio-1-oxo-pentil]-alanina (**15**), en donde la *N*-metilalanina es racémica y en donde el centro de carbono que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S.

14. El método de la reivindicación 12, en donde dicha mezcla de compuestos **15a**(*S,S*) y **15b**(*S,R*) se hace por un procedimiento que comprende:

- (1) hacer reaccionar el ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotolsulfonato de metilo para dar el ácido 4-metilditio-pentanoico (compuesto **13**);  
 (2) convertir el compuesto **13** en 4-metilditio-pentanoato de N-hidroxisuccinimidilo (compuesto **14**); y  
 (3) hacer reaccionar el compuesto **14** con *N*-metil-L-alanina para dar dicha mezcla de compuestos **15a**(S,S) y **15b**(S,R).
- 5
15. El método de la reivindicación 12, en donde dicho compuesto **15a**(S,S) se hace por un método que comprende:
- (1) convertir el (R)-1,3-butanodiol en ácido (S)-4-(metilditio)pentanoico **19**;  
 (2) convertir el compuesto **19** en (S)-4-(metilditio)pentanoato de N-hidroxisuccinimidilo (compuesto **20**); y  
 (3) hacer reaccionar el compuesto **20** con *N*-metil-L-alanina para dar dicho compuesto **15a**(S,S).
- 10
16. El método de la reivindicación 12, en donde dicho compuesto **15b**(S,R) se hace por un método que comprende:
- (1) convertir el (S)-1,3-butanodiol en ácido (R)-4-(metilditio)pentanoico **24**;  
 (2) convertir el compuesto **24** en (R)-4-(metilditio)pentanoato de N-hidroxisuccinimidilo (compuesto **25**); y  
 (3) hacer reaccionar el compuesto **25** con *N*-metil-L-alanina para dar dicho compuesto **15b**(S,R).
- 15
17. El método de la reivindicación 13, en donde dicho compuesto de fórmula (III-D,L) se hace por un procedimiento que comprende:
- (1) hacer reaccionar el ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotolsulfonato de metilo para dar el ácido 4-metilditio-pentanoico (compuesto **13**);  
 (2) convertir el compuesto **13** en 4-metilditio-pentanoato de N-hidroxisuccinimidilo (compuesto **14**);  
 (3) hacer reaccionar el compuesto **14** con *N*-metilalanina racémica para dar dicho compuesto de fórmula (III-D,L).
- 20
18. El método de la reivindicación 9, en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son metilo.
19. El método de la reivindicación 9, en donde dicho compuesto de fórmula (III-L) es la *N*-metil-*N*-(4-metil-4-metilditio-1-oxo-pentil)-L-alanina (compuesto **10** que contiene *N*-metil-L-alanina).
20. El método de la reivindicación 9, en donde dicho compuesto de fórmula (III-D,L) es la *N*-metil-*N*-(4-metil-4-metilditio-1-oxo-pentil)-D,L-alanina (compuesto **10** que contiene *N*-metil-alanina racémica).
- 25
21. El método de una cualquiera de la reivindicación 19 o reivindicación 20, en donde dicho compuesto **10** que contiene *N*-metil-L-alanina o *N*-metilalanina racémica se hace por un procedimiento que comprende:
- (1) hacer reaccionar el sulfuro de isobutileno (**5**) con el anión del acetonitrilo para dar el 4-mercapto-4-metil-pentanonitrilo (compuesto **6**);  
 (2) hidrolizar el compuesto **6** para dar el ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (compuesto **7**);  
 (3) convertir el compuesto **7** en ácido 4-metil-4-(metilditio)pentanoico (compuesto **8**) por reacción con metanotolsulfonato de metilo;  
 (4) convertir el compuesto **8** en 4-metil-4-(metilditio)pentanoato de *N*-hidroxisuccinimidilo (compuesto **9**); y  
 (5) hacer reaccionar el compuesto **9** con *N*-metil-L-alanina o *N*-metilalanina racémica para dar dicho compuesto **10** que contiene *N*-metil-L-alanina o *N*-metilalanina racémica.
- 30
22. El método para hacer un maitansinoide de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 20, que además comprende separar los diastereoisómeros, si están presentes, y purificar el maitansinoide por HPLC en sílice con ciano unido.
- 35
23. Un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para usar en un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que necesite tratamiento, una cantidad eficaz de dicho conjugado, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.
- 40
24. Un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para usar en un método para tratar un tumor maligno, una enfermedad autoinmunitaria, un rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, una infección vírica o una infección parasitaria.
25. El conjugado para usar de la reivindicación 24, en donde el método es de tratamiento de un tumor.
- 45
26. El conjugado para usar de la reivindicación 24, en donde el método es de tratamiento de cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario u órganos linfáticos.
27. Uso de un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la fabricación de un medicamento para usar en un método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26.
28. Un compuesto de fórmula (III-L) o (III-D,L) como se define en la reivindicación 9.

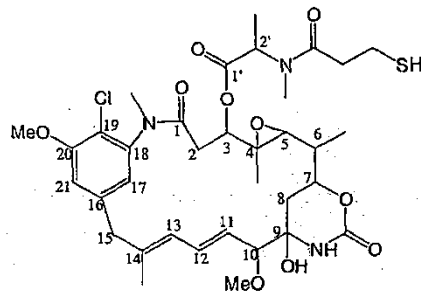
29. El compuesto de la reivindicación 28, que es la *N*-metil-*N*-(4-metil-4-metilditio-1-oxo-pentil)-*L*-alanina (**10** (S)) o *N*-metil-*N*-(4-metil-4-metilditio-1-oxo-pentil)-*D,L*-alanina (racémica **10**).
30. El compuesto de la reivindicación 28, que es una mezcla de *N*-metil-*N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxo-pentil]-*S*-alanina y *N*-metil-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxo-pentil]-*S*-alanina (compuestos **15a**(S,S) y **15b**(S,R)).
- 5 31. El compuesto de la reivindicación 28, que es la *N*-metil-*N*-[4-metilditio-1-oxo-pentil]-alanina (**15**), en donde la *N*-metilalanina es racémica y en donde el centro de carbono que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S.
32. El compuesto de la reivindicación 28, que es la *N*-metil-*N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxo-pentil]-*S*-alanina (**15a**(S,S)).
33. El compuesto de la reivindicación 28, que es la *N*-metil-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxo-pentil]-*S*-alanina (**15b**(S,R)).
- 10 34. Un método para hacer el compuesto **10** que contiene *N*-metil-*L*-alanina o *N*-metilalanina racémica, como se define en la reivindicación 19 o reivindicación 20, por un procedimiento como se define en la reivindicación 21.
35. Un método para hacer una mezcla de compuestos **15a**(S,S) y **15b**(S,R), como se define en la reivindicación 12, por un procedimiento como se define en la reivindicación 14.
- 15 36. Un método para hacer la *N*-metil-*N*-[4-metilditio-1-oxo-pentil]-alanina (**15**), en donde la *N*-metilalanina es racémica y en donde el centro de carbono que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S, por un procedimiento como se define en la reivindicación 17.
37. Un método para hacer la *N*-metil-*N*-[4-(*S*)-metilditio-1-oxo-pentil]-*S*-alanina (**15a**(S,S)) por un procedimiento como se define en la reivindicación 15.
- 20 38. Un método para hacer la *N*-metil-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxo-pentil]-*S*-alanina (**15b**(S,R)) por un procedimiento como se define en la reivindicación 16.
39. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el conjugado de maitansinoide-agente de unión a células de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 40. La composición farmacéutica de la reivindicación 39, que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende un anticuerpo.
41. Un método para inducir la muerte celular en poblaciones de células seleccionadas in vitro o ex vivo, que comprende poner en contacto células diana o tejido que contiene células diana con una cantidad eficaz del conjugado de maitansinoide-agente de unión a células de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
- 30 42. El método de la reivindicación 41, en donde el conjugado se representa por la siguiente fórmula:



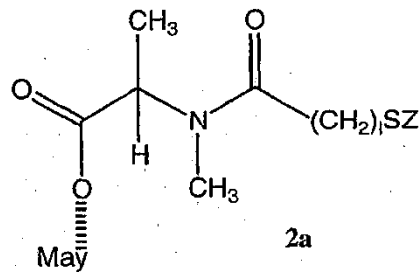
en donde w es una media de 1-10.

- 35 43. Un método para hacer un conjugado de maitansinoide-agente de unión a células, comprendiendo dicho método hacer reaccionar un maitansinoide purificado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, con un agente de unión a células, en donde dicho agente de unión a células comprende un grupo ditio reactivo.

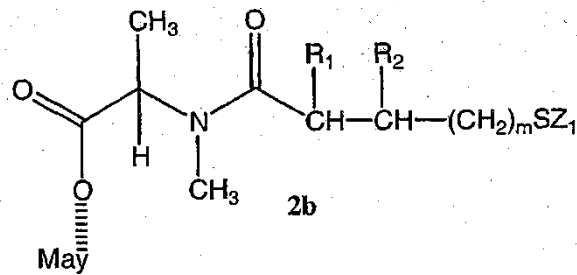
FIG. 1 (técnica anterior)



DM1 (1)



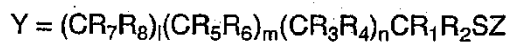
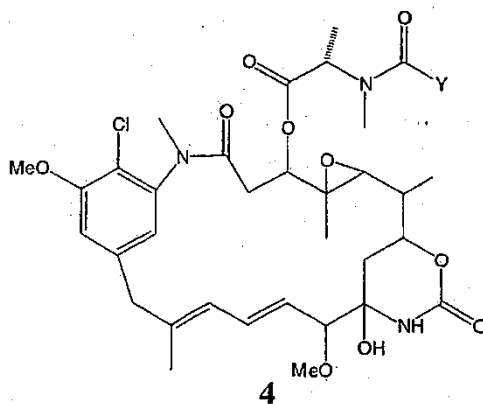
2a



2b

(May = maitansinoide)

FIG. 2



DM3 (4a):  $R_1, R_5, R_6, R_7, R_8 = H; R_2 = CH_3$   
 $l = 1, m = 1, n = 0$   
 $Z = H$

DM3-SMe (4c):  $R_1, R_5, R_6, R_7, R_8 = H; R_2 = CH_3$   
 $l = 1, m = 1, n = 0$   
 $Z = SCH_3$

DM4 (4b):  $R_5, R_6, R_7, R_8 = H; R_1, R_2 = CH_3$   
 $l = 1, m = 1, n = 0$   
 $Z = H$

DM4-SMe (4e):  $R_5, R_6, R_7, R_8 = H; R_1, R_2 = CH_3$   
 $l = 1, m = 1, n = 0$   
 $Z = SCH_3$



FIG. 3a

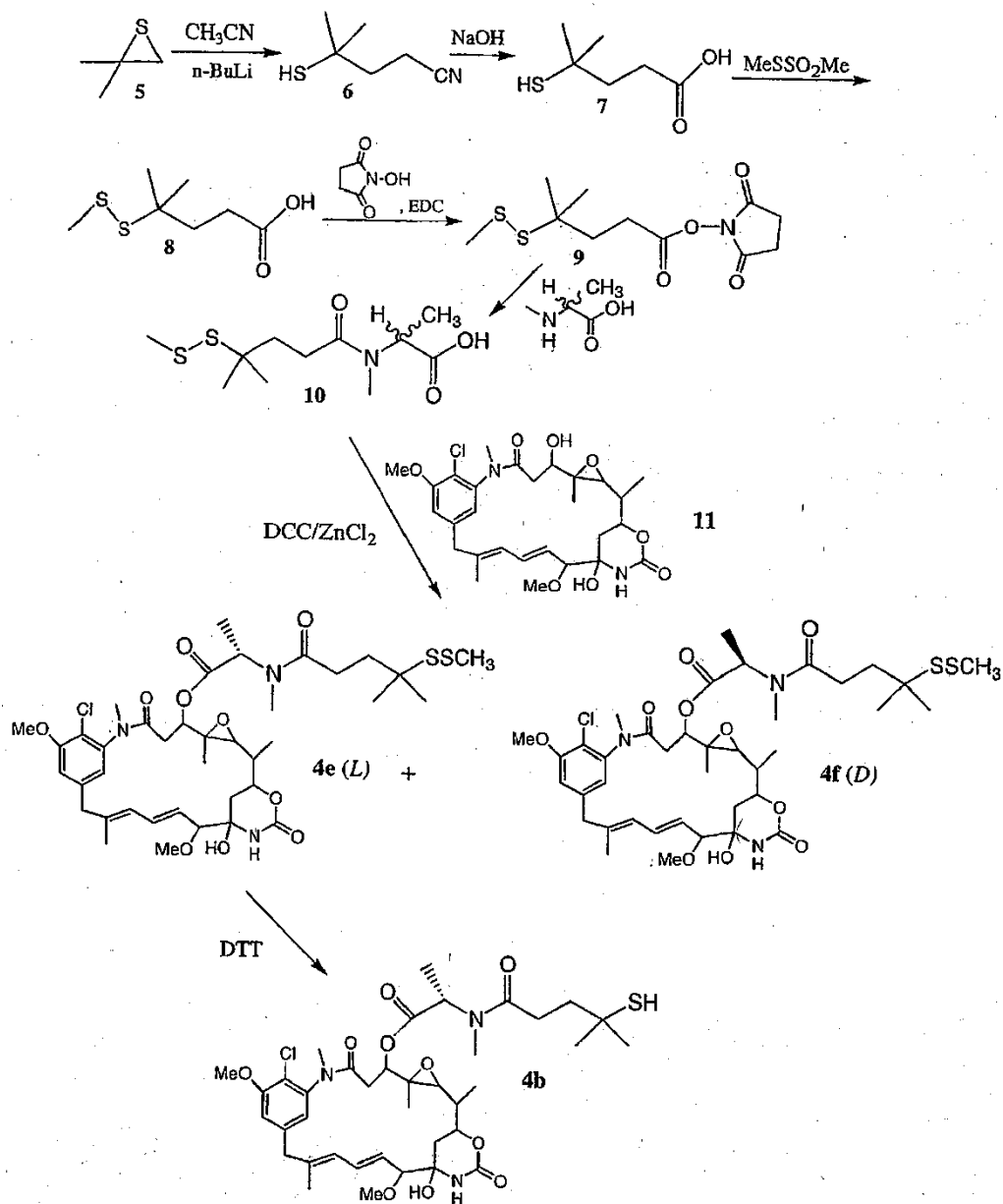


FIG. 3b

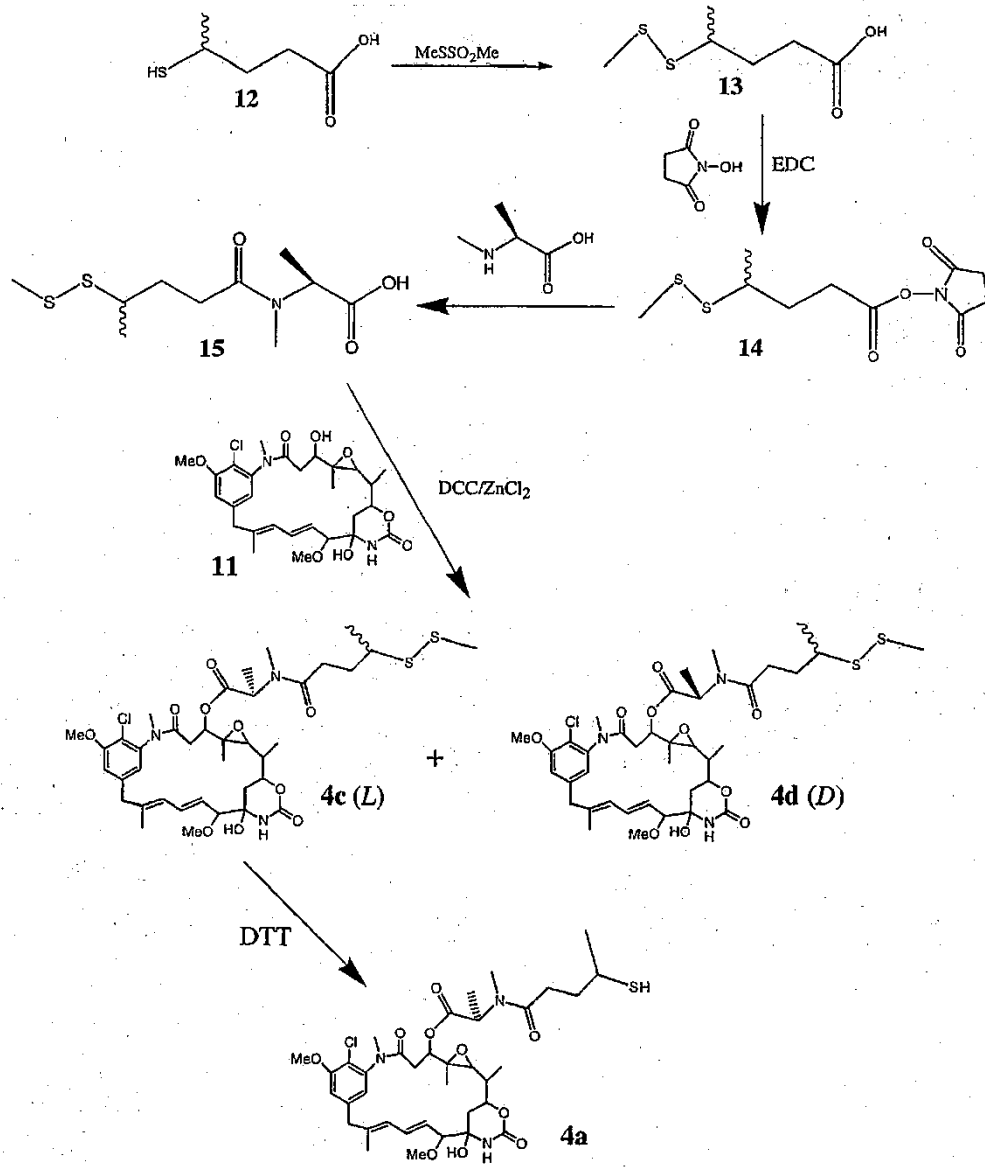
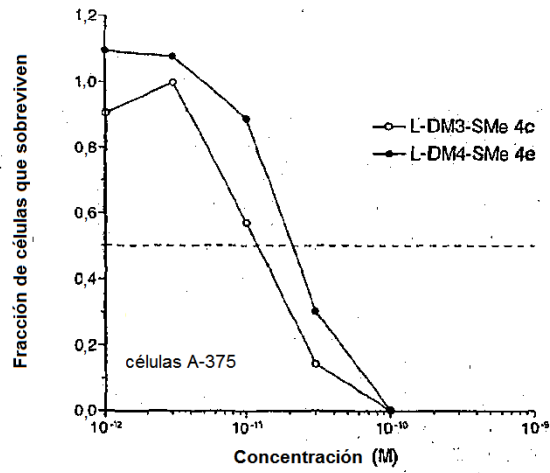






FIG. 4

a) Citotoxicidad in vitro contra células A-375



b) Citotoxicidad in vitro contra células SK-Br-3

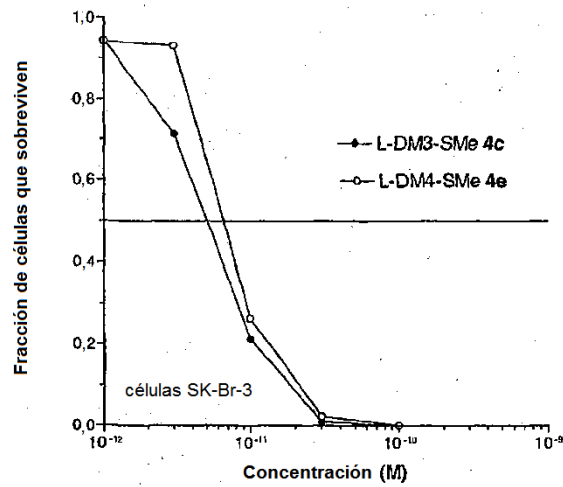
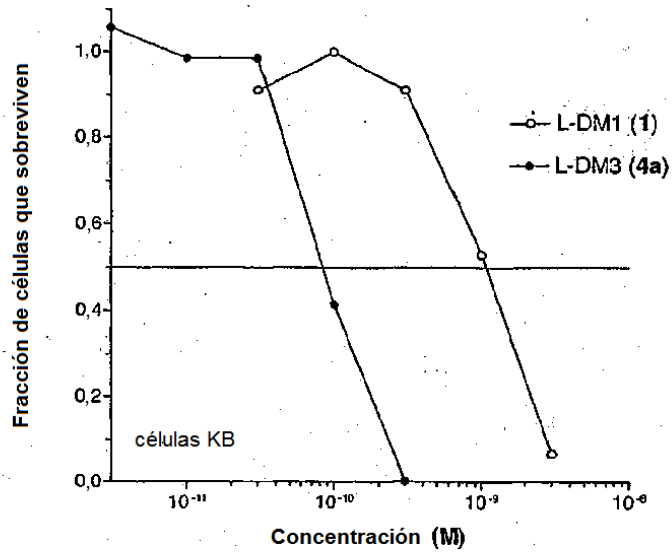


FIG. 4

c) Citotoxicidad in vitro contra células KB



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

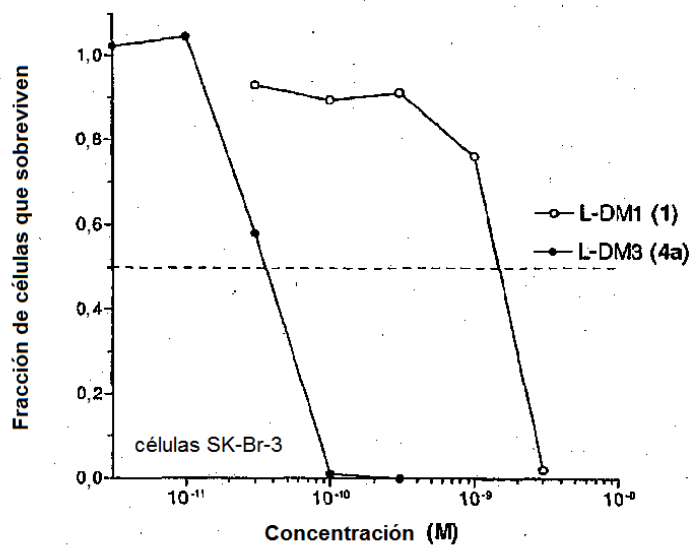


FIG. 5a

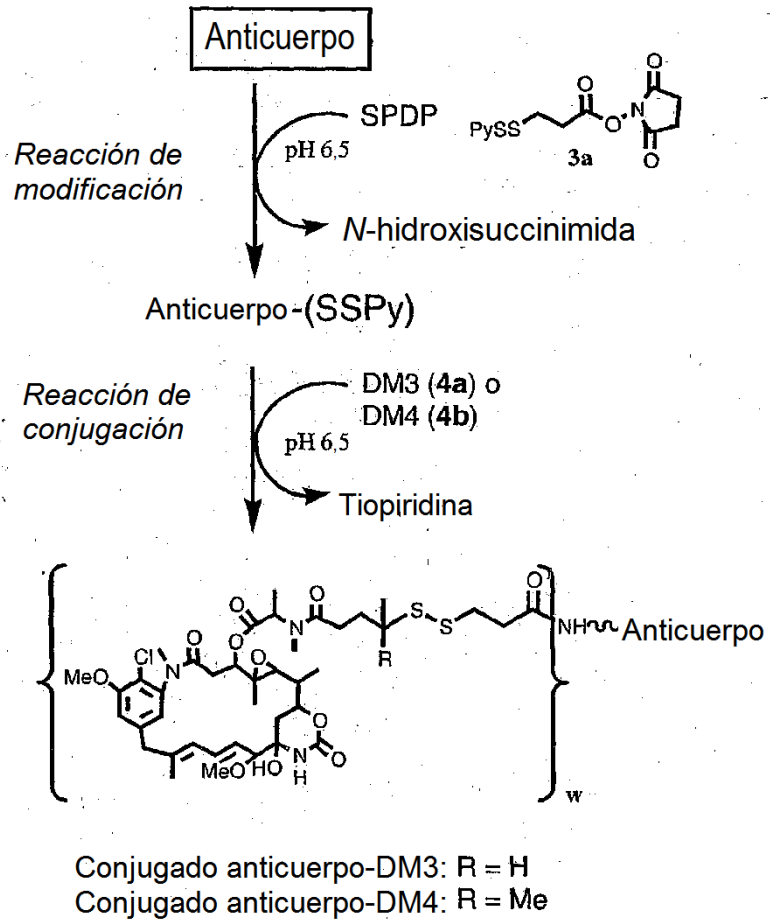


FIG. 5b

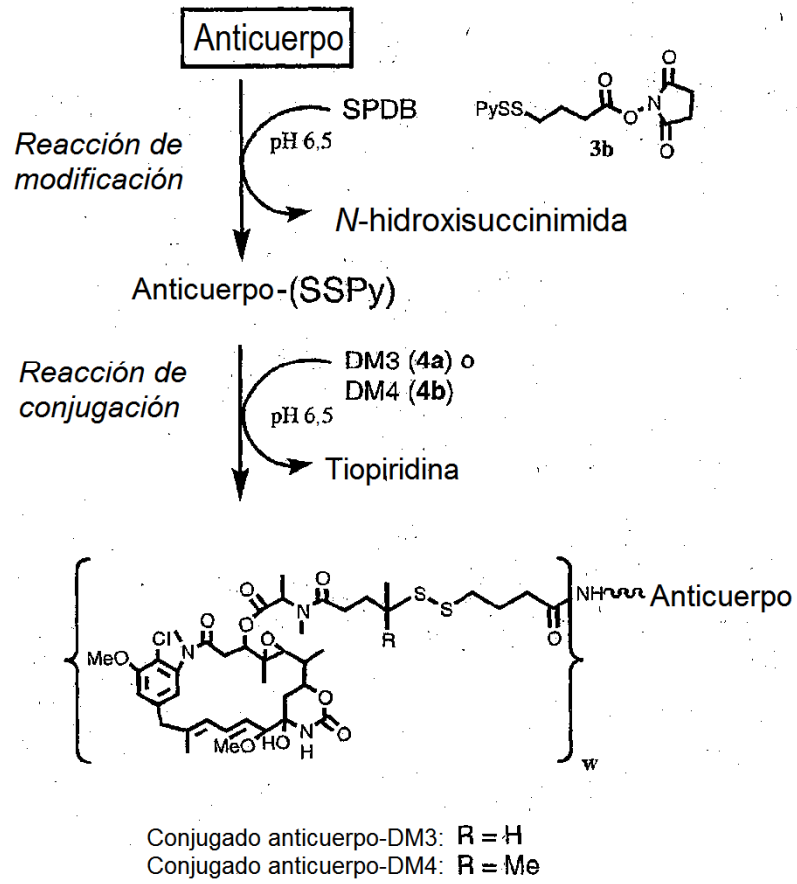




FIG. 5c

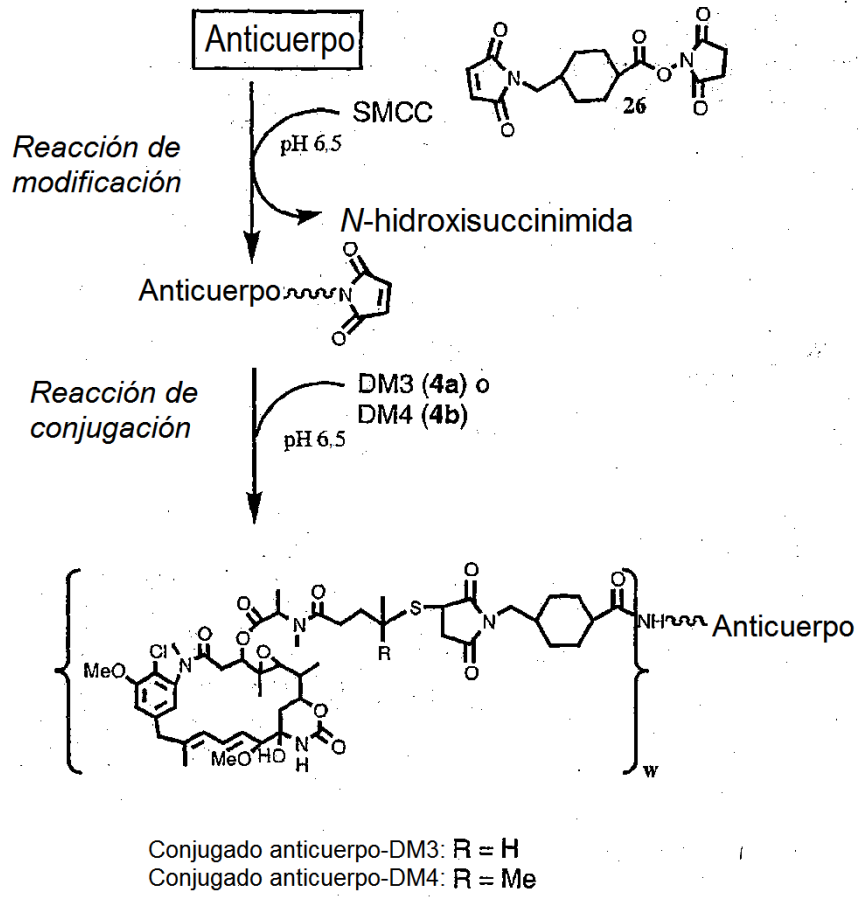
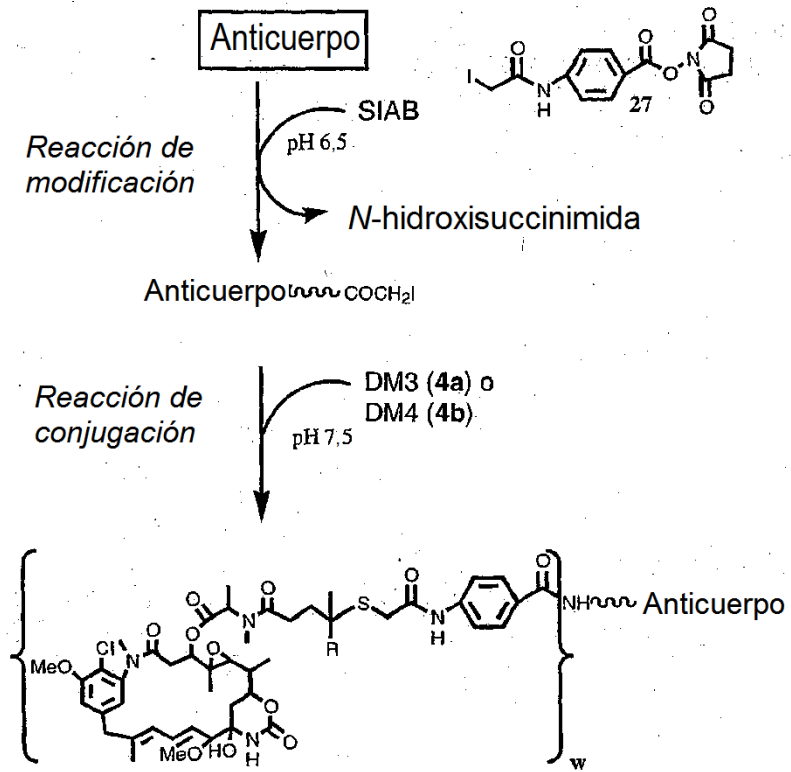
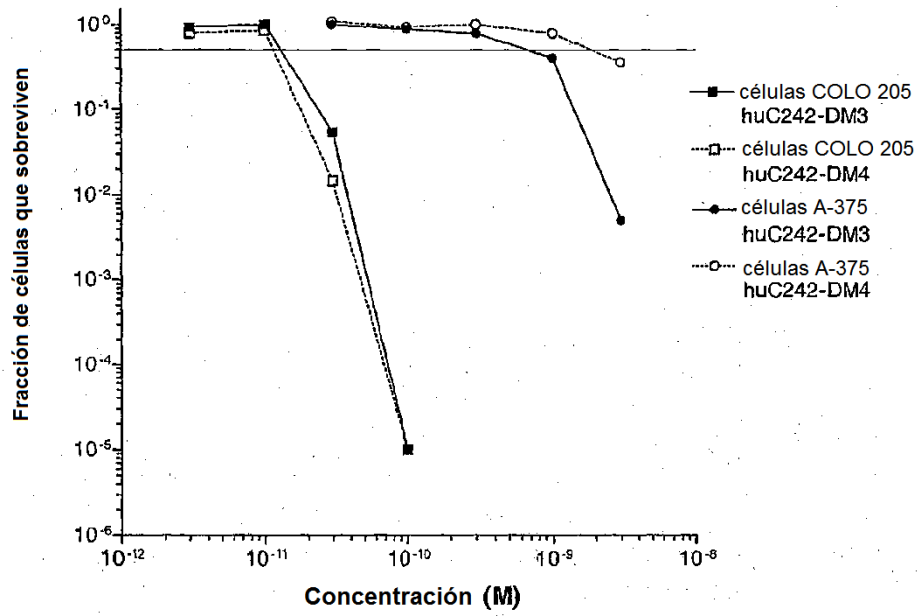


FIG. 5d



Conjugado anticuerpo-DM3: R = H  
 Conjugado anticuerpo-DM4: R = Me

FIG. 6 Citotoxicidad in vitro y especificidad de conjugados huC242-DM3 y huC242-DM4



**FIG. 7** Eficacia in vivo de conjugados de huC242-maitansinoide (xenoinjertos de HT-29)

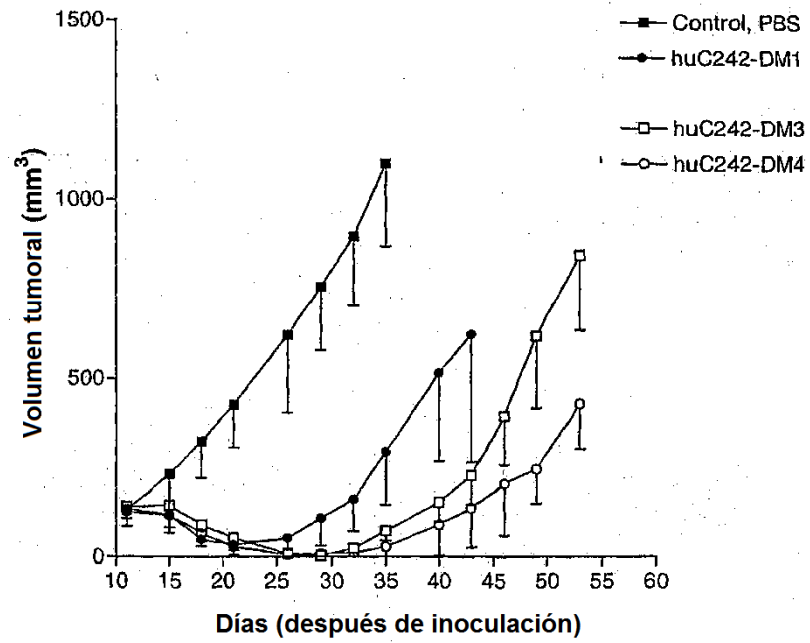


FIG. 8 Eficacia in vivo de conjugados de huC242-maitansinoide (xenoinjertos de COLO-205)

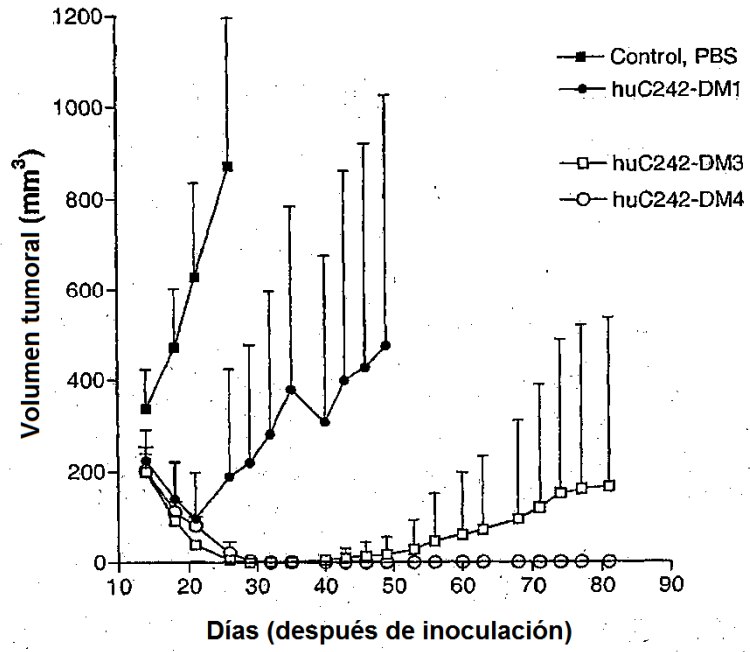
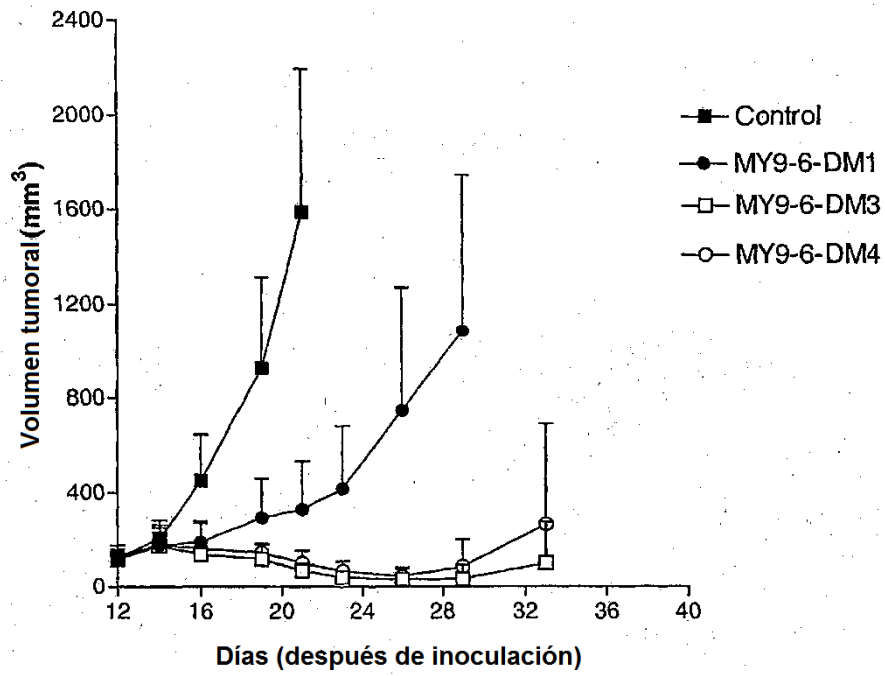


FIG. 9 Eficacia de conjugados de MY-9-6-maitansinoide (xenoinjertos de HL60)



**FIG. 10** Análisis de citotoxicidad in vitro: Actividad de HuMy9-6-DM4 contra células HL-60 positivas para el antígeno y células Namalwa negativas para el antígeno

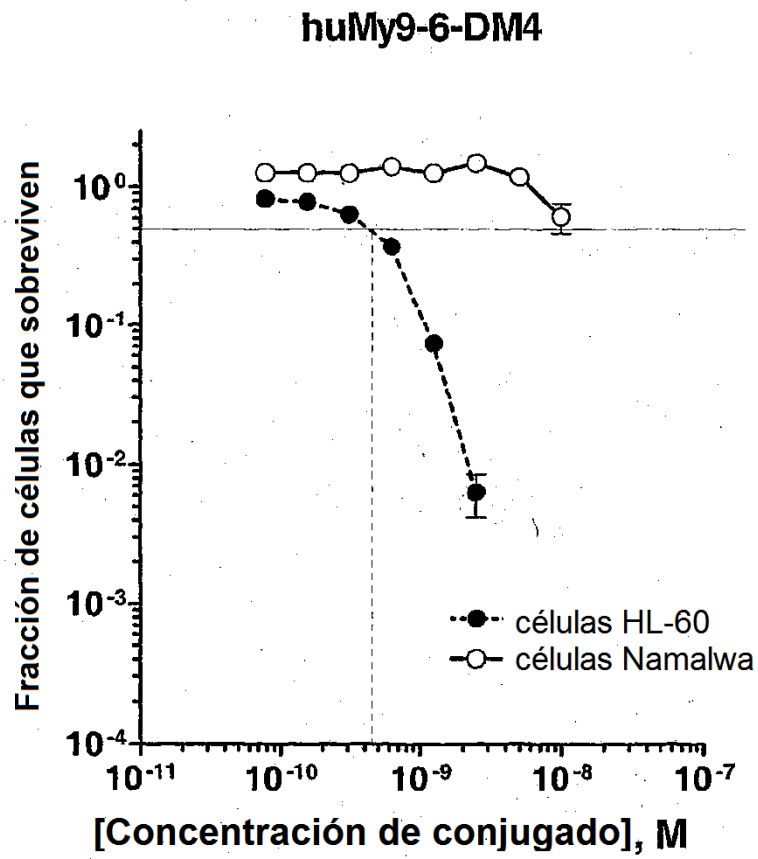


FIG. 11 Comparación de la eficacia in vivo de los conjugados HuMy9-6-DM4 y HuMy9-6-DM1 contra xenoinjertos de tumor humano de HL-60 en ratones SCID

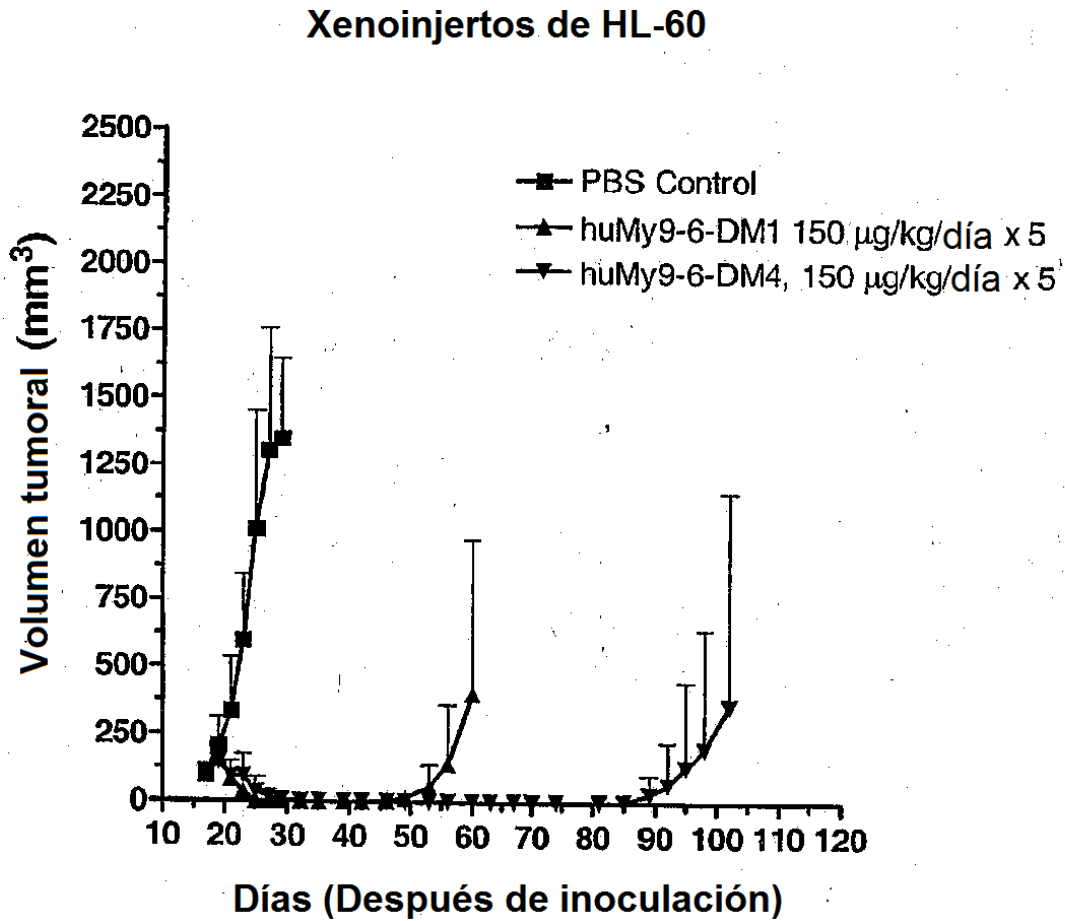




FIG. 12. Análisis de citotoxicidad in vitro de huB4-DM4

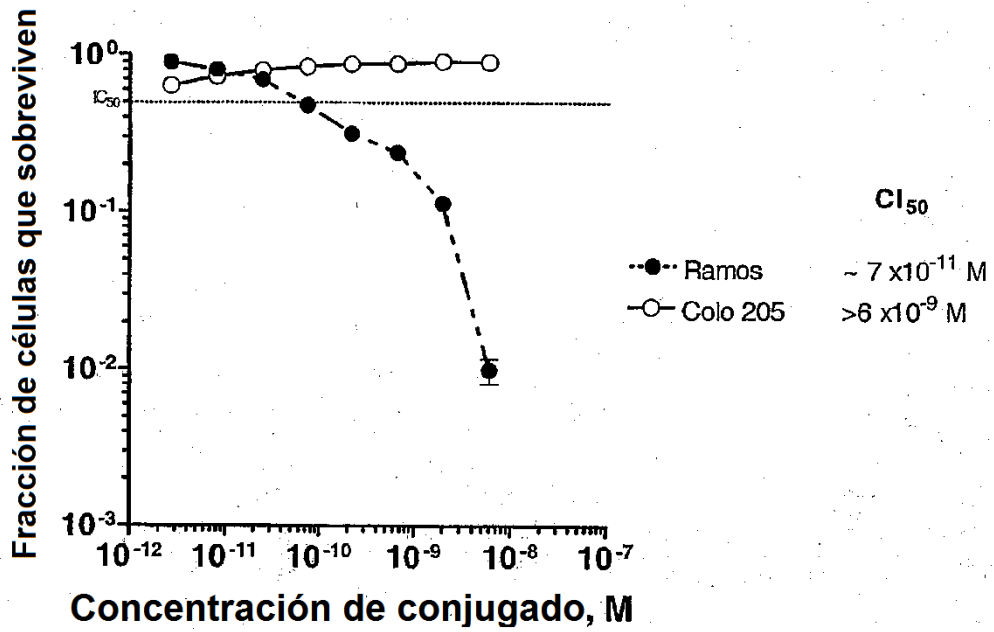


Figura 13a. Eficacia in vivo del conjugado huB4-DM4 contra xenoinjertos Ramos en ratones SCID

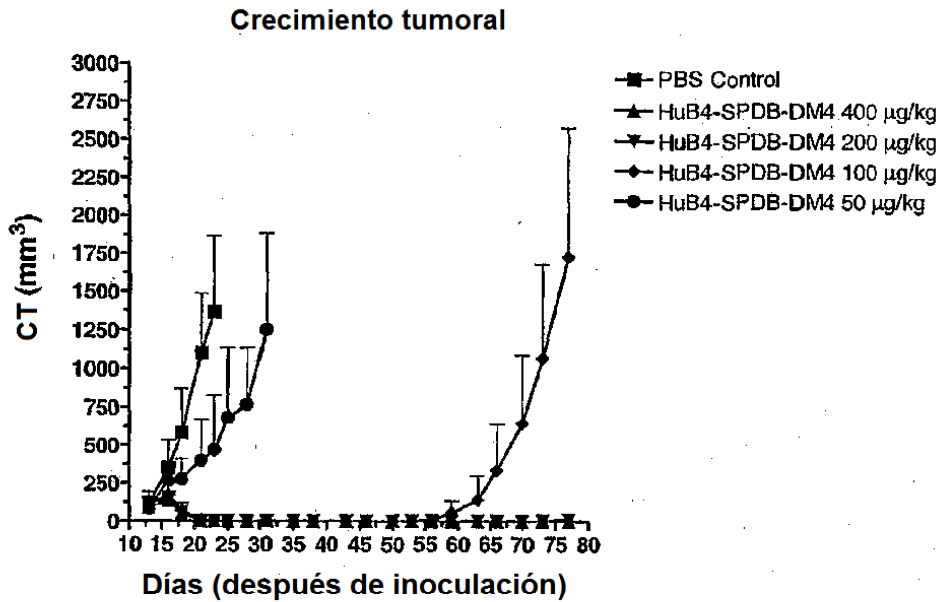


Figura 13b. Eficacia in vivo del conjugado huB4-DM4 contra xenoinjertos Ramos en ratones SCID: cambios de peso corporal en animales tratados

