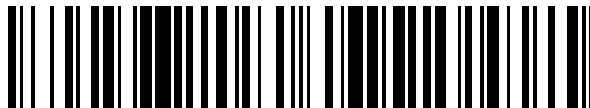


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 640**

51 Int. Cl.:

**C07D 491/12** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2002 E 02720913 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 1390370**

54 Título: **Métodos para la preparación de conjugados citotóxicos de maitansinoides y agentes que se fijan a las células**

30 Prioridad:

**31.05.2001 US 867598**

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

**21.06.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 574 640 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

Métodos para la preparación de conjugados citotóxicos de maitansinoides y agentes que se fijan a las células

## Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para preparar conjugados citotóxicos que comprenden maitansinoides y agentes que se fijan a las células. Estos conjugados tienen un uso terapéutico ya que se dispensan a una población celular específica de una forma dirigida. La presente invención se refiere a un método para preparar maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo que se puede utilizar para la preparación de conjugados citotóxicos según se define en las reivindicaciones.

## Antecedentes de la invención

Han aparecido muchos artículos sobre intentos de actuar selectivamente sobre las células tumorales con conjugados de anticuerpo monoclonal y fármaco (Sela et al. en *Immunoconjugates* 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al., en *Targeted Drugs* 1-22 (E. Goldberg, ed. 1983); Diener et al., en *Antibody Mediated Delivery Systems* 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al., en *Antibody Mediated Delivery Systems* 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol et al., en *Antibody Mediated Delivery Systems* 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988)). Los fármacos citotóxicos, tales como metotrexato, daunorrubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C y clorambucilo, se han conjugado a una serie de anticuerpos monoclonales murinos. En algunos casos, la molécula de fármaco se conectó a la molécula de anticuerpo a través de una molécula vehicular intermedia, tal como seroalbúmina (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)).

Se ha empleado un amplio abanico de tecnologías de conectores para preparar tales inmunoconjugados y se han estudiado tanto los conectores escindibles como los no escindibles. En la mayoría de los casos, sin embargo, sólo se pudo observar el potencial citotóxico completo de los fármacos si las moléculas de fármaco se podían liberar intactas de los conjugados en el sitio deseado.

Uno de los conectores escindibles que se ha empleado para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco es un conector inestable en ácido a base de ácido *cis*-aconítico y que se aprovecha de que el medio de diferentes compartimentos intracelulares, tales como los endosomas que aparecen durante la endocitosis mediada por receptor y los lisosomas, es ácido. Shen y Ryser presentaron este procedimiento para preparar conjugados de daunorrubicina con vehículos macromoleculares (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 1048-1054 (1981)). Yang y Reisfield utilizaron la misma técnica para conjugar la daunorrubicina a un anticuerpo antimelanoma (*J. Natl. Canc. Inst.* 80: 1154-1159 (1988)). Recientemente, Dillman et al. también utilizaron un conector inestable en ácido de un modo similar para preparar conjugados de daunorrubicina con un anticuerpo antilinfocitos T (*Cancer Res.* 48: 6097-6102 (1988)).

Una estrategia alternativa, explorada por Trouet et al., implica conectar la daunorrubicina a un anticuerpo mediante un brazo espaciador de naturaleza peptídica (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 626-629 (1982)). Esto se hizo bajo la premisa de que el fármaco libre se podía liberar de tal conjugado mediante la acción de peptidasas lisosómicas.

Sin embargo, las pruebas de citotoxicidad *in vitro* han revelado que los anticuerpos conjugados a fármaco raramente consiguen la misma potencia citotóxica que los fármacos sin conjugar, libres. Esto sugería que los mecanismos mediante los que las moléculas de los fármacos se liberan de los anticuerpos eran muy ineficaces. En el área de las inmunotoxinas, se demostró que los conjugados formados mediante puentes disulfuro entre los anticuerpos monoclonales y las toxinas proteicas catalíticamente activas eran más citotóxicos que los conjugados que contienen otros conectores. Véanse Lambert et al. *J. Biol. Chem.* 260: 12035-12041 (1985); Lambert et al., en *Immunotoxins* 175-209 (A. Frankel, ed. 1988); Ghetie et al. *Cancer Res.* 48: 2610-2617 (1988). Esto se atribuyó a la elevada concentración intracelular de glutatión, que contribuye a la escisión eficaz del puente disulfuro entre una molécula de anticuerpo y una toxina. A pesar de esto, se han publicado sólo unos pocos ejemplos del uso de los puentes disulfuro para la preparación de los conjugados entre fármacos y macromoléculas. Shen et al. describieron la conversión del metotrexato en un derivado de mercaptoetilamida y luego la conjugación con poli-D-lisina mediante un puente disulfuro (*J. Biol. Chem.* 260: 10905-10908 (1985)). Además, en un artículo se describió la preparación de un conjugado de la calicheamicina, fármaco tóxico que contienen trisulfuro, con un anticuerpo (Menendez et al. «Fourth International Conference on Monoclonal Antibody Immunoconjugates for Cancer», San Diego, resumen 81 (1989)). Otro artículo describió la preparación de un conjugado del fármaco tóxico que contiene trisulfuro, la calicheamicina, con un anticuerpo (Hinman et al., 53 *Cancer Res.* 3336-3342 (1993)).

Una razón para la falta de conjugados entre anticuerpo y fármaco mediante disulfuro es que los fármacos citotóxicos carecen de grupo funcional con un átomo de azufre que se pueda utilizar con facilidad para conectar el fármaco a un anticuerpo a través de un puente disulfuro. Además, resulta difícil modificar químicamente los fármacos ya existentes sin disminuir su potencial citotóxico.

Otro inconveniente importante con los conjugados entre anticuerpo y fármaco existentes es que no son capaces de aportar una concentración suficiente del fármaco en el sitio deseado debido a que el número de antígenos sobre los que actuar selectivamente es escaso y a que la citotoxicidad de los fármacos cancerostáticos como el metotrexato, la daunorrubicina y la vincristina, es relativamente moderada. Para conseguir una citotoxicidad significativa, se hace  
5 necesaria la conexión de un gran número de moléculas de fármacos de forma directa a un anticuerpo, o bien a través de una molécula vehicular polimérica. Sin embargo, tales anticuerpos fuertemente modificados a menudo se fijan peor al antígeno diana y se eliminan *in vivo* del torrente circulatorio con rapidez.

Los maitansinoides son fármacos muy citotóxicos. La maitansina fue aislada primero por Kupchan et al. del arbusto del África oriental *Maytenus serrata* y se demostró que era de 100 a 1000 veces más citotóxica que los  
10 quimioterápicos contra el cáncer convencionales, como el metotrexato, la daunorrubicina y la vincristina (patente de los EE. UU. n.º 3.896.111). Posteriormente se descubrió que algunos microorganismos también producen maitansinoides, tal como el maitansinol y los ésteres del maitansinol en C-3 (patente de los EE. UU. n.º 4.151.042). También se han descrito ésteres sintéticos del maitansinol en C-3 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-  
15 3451 (1984)). Ejemplos de análogos del maitansinol a partir del cual se han preparado los ésteres en C-3 incluyen el 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 que se producen de forma natural y sintética se pueden clasificar en dos grupos:

(a) Ésteres en C-3 con ácidos carboxílicos simples (patentes de los EE. UU. n.ºs 4.248.870; 4.265.814; 4.308.268;  
20 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 los EE. UU. n.ºs 4.137.230; 4.260.608; 5.208.020 y *Chem. Pharm. Bull.* 12: 3441 (1984)).

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

La maitansina es un inhibidor mitótico. El tratamiento de las células L1210 *in vivo* con la maitansina se ha descrito  
25 que da lugar a que el 67% de las células se acumulen en mitosis. Se han descrito células de control sin tratar para demostrar que el índice mitótico oscila de entre el 3,2 al 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 al interferir con la formación de los microtúbulos a través de la inhibición de la polimerización de la proteína del microtúbulo, la tubulina (Remillard et al. *Science* 189: 1002-1005 (1975)).

30 *In vitro*, las suspensiones de células leucémicas murinas P388, L1210 y LY5178 se ha visto que se inhiben por la maitansina a dosis de  $10^{-3}$  a  $10^{-1}$  µg/µl, de las que la línea P388 es la más sensible. También se ha mostrado que la maitansina es un inhibidor activo del crecimiento *in vitro* de las células de carcinoma nasofaríngeo de humano y se describió que la línea CEM de leucemia linfoblástica aguda de humano se inhibía por concentraciones de tan solo  $10^{-7}$  mg/ml (Wolpert-DeFillippes et al. *Biochem. Pharmacol.* 24: 1735-1738 (1975)).

35 También se ha demostrado que la maitansina es activa *in vivo*. El crecimiento tumoral en el sistema de leucemia linfocítica P388 se mostró que se inhibía a lo largo de un margen de dosis de 50 a 100 veces, lo que sugería un índice terapéutico elevado; también se pudo demostrar una actividad inhibidora significativa con el sistema de leucemia de ratón L1210, el sistema de carcinoma de pulmón de Lewis de humano y el sistema de melanocarcinoma B-16 de humano (Kupchan, *Ped. Proc.* 33: 2288-2295 (1974)).

40 Los procedimientos actuales para la conjugación de maitansinoides con los agentes que se fijan a las células (tales como los anticuerpos) implican dos etapas de reacción. Un agente que se fija a las células, por ejemplo un anticuerpo, se modifica primero con un reactivo de entrecruzamiento, tal como piridilditiopropionato de *N*-succinimidilo (SPDP, por su nombre en inglés) para introducir grupos ditiopiridilo en el anticuerpo (Carlsson et al. *Biochem. J.* 173: 723-737 (1978); patente de los EE. UU. n.º 5.208.020). En una segunda etapa, un maitansinoide  
45 reactivo con un grupo tiólico, tal como DM1, se añade al anticuerpo modificado, lo que da lugar al desplazamiento de los grupos tiopiridilo en los anticuerpos modificados y la producción de conjugados citotóxicos entre el anticuerpo y el maitansinoide unidos por un disulfuro (patente de los EE. UU. n.º 5.208.020).

Los procedimientos actuales para la conjugación de maitansinoides con anticuerpos presenta los inconvenientes de someter los anticuerpos a dos etapas de reacción, lo que requiere dos etapas de purificación de proteínas por  
50 filtración en gel para separar las proteínas de las moléculas orgánicas pequeñas sin conjugar, tales como el SPDP y los maitansinoides. Esto hace que los procedimientos sean caros y largos, y también tiene por resultado un rendimiento bajo del producto.

De acuerdo con esto, se necesita encarecidamente un procedimiento para conjugar los maitansinoides con los agentes que se fijan a las células, en el que se reduzca el número de etapas de reacción, con una reducción  
55 concomitante de tiempo y de costes, y en el que se incremente el rendimiento.

### Compendio de la invención

En una realización de la invención se describe un procedimiento en una etapa para la producción de conjugados citotóxicos de maitansinoides y agentes que se fijan a las células. Los maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo están unidos a agentes que se fijan a las células, tales como anticuerpos, sin una modificación previa del agente de fijación a las células. Este procedimiento de conjugación disminuye al mínimo el tiempo de reacción y el tiempo de procesamiento para las moléculas proteicas sensibles de anticuerpos, y también disminuye al mínimo las etapas de purificación de la proteína, lo que mejora el rendimiento global. Estos conjugados son útiles como agentes terapéuticos que se suministran específicamente a las células deseadas y son citotóxicos.

En una segunda realización, la presente invención describe procedimientos nuevos para la síntesis de maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo. Los maitansinoides son moléculas orgánicas que son sensibles a las condiciones acuosas de pH bajo (pH 5 o inferior) o pH alto (pH 8 y más elevado), y son poco solubles en las soluciones acuosas. El nuevo procedimiento descrito aquí supera estos problemas al convertir los maitansinoides en maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo, en solventes orgánicos o mezclas de solventes acuosos y orgánicos. Los derivados reactivos resultantes de maitansinoides son más solubles en las soluciones acuosas y se pueden conjugar a agentes que se fijan a las células en una sola etapa de reacción en tampones acuosos en condiciones suaves (pH 6-8). Una ventaja adicional es que todos los maitansinoides intermedios del procedimiento se pueden analizar completamente antes de conjugarlos. Se describe la síntesis de los maitansinoides adecuados que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo, tal como los compuestos 2 y 3a que se explican a continuación.

En una tercera realización de la invención, se describe un procedimiento para producir otros derivados de maitansinoides, tales como los compuestos 6 y 10, que se pueden utilizar para la producción de los maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo, tales como los compuestos 2 y 3a.

En una cuarta realización se describen varios maitansinoides nuevos, los compuestos 2, 3a, 6 y 10, cuyos usos incluyen la producción de nuevos conjugados citotóxicos.

### 25 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra los resultados de un experimento que analiza la capacidad de los conjugados huN901-maitansinoide preparados con 2 mediante el procedimiento de la presente invención, seguido de la purificación por cromatografía con Sephacryl S300 (●) o bien con Sephadex G25 (○), y el anticuerpo huN901 sin conjugar (▲) para destruir las células que expresan el antígeno.

La figura 2 muestra la vía de síntesis de los maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo.

La figura 3 muestra una vía alternativa de la síntesis de maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo.

La figura 4 muestra la vía de síntesis de los conjugados citotóxicos.

La figura 5 muestra una vía alternativa para la producción de L-DM1-TPA (compuesto 6).

### 35 Descripción detallada de la invención

Esta invención describe un procedimiento en una etapa para la síntesis de conjugados citotóxicos que comprenden maitansinoides y agentes que se fijan a las células. También se describe en la presente memoria un procedimiento para la síntesis de maitansinoides nuevos que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo, tal como los compuestos 2 y 3a. Además, en esta invención se describe un procedimiento para la síntesis de nuevos derivados de maitansinoides, tales como los compuestos 6 y 10. En esta invención se describen otros nuevos derivados de maitansinoides, tales como los compuestos 6 y 10, que son útiles para la producción de maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo. En esta invención también se describen otros nuevos maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo, tal como los compuestos 2 y 3a, que son útiles para la síntesis de nuevos conjugados citotóxicos.

La técnica revela que es muy difícil modificar los fármacos actuales sin disminuir su capacidad citotóxica. Como se enseña en la presente memoria, este problema se supera mediante un método de modificación de las moléculas de maitansinoides con restos químicos reactivos, en particular las moléculas de maitansinoides que contienen un resto disulfuro y un grupo reactivo, lo que permite la conexión a los agentes adecuados que se fijan a las células. Como resultado, los maitansinoides nuevos descritos que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo protegen y, en algunos casos incluso realzan, la capacidad citotóxica de los maitansinoides que se producen de forma natural.

Los conjugados citotóxicos entre el maitansinoide y el agente que se fija a las células permite medir completamente la acción citotóxica de los derivados de maitansinoides al ser aplicados de forma dirigida sólo contra las células indeseadas, lo que evita los efectos secundarios debidos daños en las células sanas por una acción no selectiva. Así pues, la invención da a conocer agentes útiles y nuevos métodos para fabricar tales agentes para la eliminación

de células enfermas o anormales que se tienen que destruir o lisar, tales como células tumorales (en concreto células tumorales sólidas), células infectadas por virus, células infectadas por microorganismos, células infectadas por parásitos, células autoinmunitarias (células que producen autoanticuerpos), células activadas (las implicadas en el rechazo del injerto o en la enfermedad del injerto contra el huésped), o cualquier otro tipo de células enfermas o  
5 anormales, al mismo tiempo que muestra un mínimo de efectos secundarios.

Así pues, esta invención enseña un método en una etapa para la producción de conjugados citotóxicos que comprenden maitansinoides y agentes que se fijan a las células. La invención también enseña un método para la síntesis de los derivados de maitansinoides y los maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo que permite la unión química a un agente que se fija a las células al mismo tiempo que conserva una  
10 citotoxicidad elevada en la forma unida o bien en la forma liberada o en ambos estados. Finalmente, la invención describe derivados de maitansinoides útiles para la producción de maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo, y maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo útil para la síntesis de nuevos conjugados citotóxicos.

El conjugado citotóxico de acuerdo con la presente invención comprende uno o varios maitansinoides conectados a un agente que se fija a las células. Para conectar el maitansinoide a un agente que se fija a las células, se debe modificar primero el maitansinoide.

Los maitansinoides que se pueden utilizar en la presente invención para producir los derivados reactivos de maitansinoides capaces de ser unidos a un agente que se fija a las células se conocen bien en la técnica y se pueden aislar de fuentes naturales de acuerdo con los métodos conocidos o se pueden preparar por síntesis de  
20 acuerdo con los métodos conocidos.

Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen el maitansinol y los análogos del maitansinol. Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen los que tienen un anillo aromático modificado y los que tienen modificaciones en otras posiciones.

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

- 25 (1) C-19-descloro (patente de los EE. UU. n.º 4.256.746) (preparado mediante la reducción de ansamitocina P2 con tetrahidruro de aluminio y litio);
- (2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/-C-19-descloro (patentes de los EE. UU. n.ºs 4.361.650 y 4.307.016) (preparado mediante la desmetilación con *Streptomyces* o *Actinomyces* o descloración con tetrahidruro de aluminio y litio); y
- 30 (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (patente de los EE. UU. n.º 4.294.757) (preparados por acilación con cloruros de acilo).

Los ejemplos específicos de análogos adecuados del maitansinol que tienen modificaciones de otras posiciones incluyen:

- 35 (1) C-9-SH (patente de los EE. UU. n.º 4.424.219) (preparado mediante la reacción del maitansinol con H<sub>2</sub>S o P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>);
- (2) C-14-alcoximetil (desmetoxi/CH<sub>2</sub>OR) (patente de los EE. UU. n.º 4.331.598);
- (3) C-14-hidroximetil o aciloximetil (CH<sub>2</sub>OH o CH<sub>2</sub>OAc) (patente de los EE. UU. n.º 4.450.254) (preparados a partir de *Nocardia*);
- 40 (4) C-15-hidroxi/aciloxi (patente de los EE. UU. n.º 4.364.866) (preparados mediante la conversión del maitansinol por *Streptomyces*);
- (5) C-15-metoxi (patentes de los EE. UU. n.ºs 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*);
- (6) C-18-N-desmetil (patentes de los EE. UU. n.ºs 4.362.663 y 4.322.348) (preparado mediante la desmetilación del maitansinol por *Streptomyces*); y
- 45 (7) 4,5-desoxi (patente de los EE. UU. n.º 4.371.533) (preparado mediante la reducción del maitansinol con tricloruro de titanio/tetrahidruro de aluminio y litio).

Para unir el maitansinoide al agente que se fija a las células, el maitansinoide comprende un resto conector. El resto conector contiene un enlace químico que permite la liberación de los maitansinoides totalmente activos en un sitio concreto. Los enlaces químicos adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen puentes disulfuro, enlaces inestables en ácido, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles a peptidasas y enlaces lábiles a esterasas. Se prefieren los  
50 puentes disulfuro.

De acuerdo con la presente invención, el resto conector comprende un grupo químico reactivo. En una realización

preferida, el grupo químico reactivo se puede unir covalentemente al maitansinoide mediante un resto conector que es un puente disulfuro.

Grupos químicos reactivos particularmente preferidos son los ésteres de *N*-succinimidilo y los ésteres de *N*-sulfosuccinimidilo.

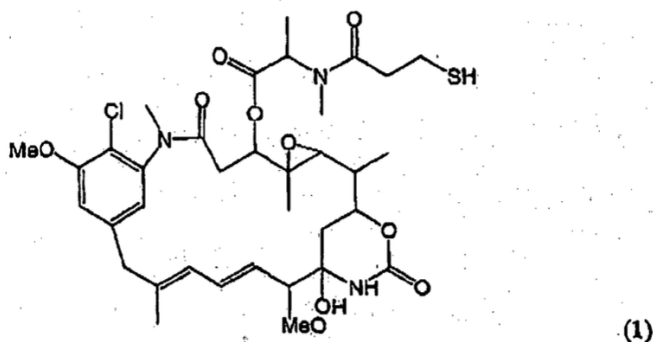
- 5 Los maitansinoides particularmente preferidos que comprenden un resto conector que contiene un grupo químico reactivo son los ésteres en C-3 del maitansinol y sus análogos, en donde el resto conector contiene un puente disulfuro y el grupo reactivo químico comprende un éster de *N*-succinimidilo o de *N*-sulfosuccinimidilo.

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

- Aunque la síntesis de los ésteres del maitansinol que tienen un resto conector se describe a continuación en términos de restos conectores que contienen enlace disulfuro, el experto en la técnica sabrá que los restos conectores con otros enlaces químicos (como se describe más arriba) también se pueden utilizar con la presente invención, como pueden ser otros maitansinoides. Los ejemplos específicos de otros enlaces químicos incluyen enlaces inestables en ácido, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles a las peptidasas y enlaces lábiles a las esterasas. La descripción de la patente de los EE. UU. n.º 5.208.020 enseña la producción de maitansinoides que llevan tales enlaces.

- La síntesis de los derivados de maitansinoides y los maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo se pueden describir por referencia a las figuras 1 a 4, en donde se preparan los ésteres de maitansinoides que contienen disulfuro.

La mayoría de los métodos de la presente invención utilizan el maitansinoide que contiene tiol (DM1), denominado formalmente *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, como el reactivo de partida. La DM1 se representa mediante la siguiente fórmula estructural (1):



25

#### Producción de conjugados citotóxicos

- Los conjugados citotóxicos representativos de la invención son anticuerpo/maitansinoide, fragmento de anticuerpo/maitansinoide, factor de crecimiento epidérmico (EGF)/maitansinoide, melanotropina (MSH)/maitansinoide, tirotrópina (TSH)/maitansinoide, estrógeno/maitansinoide, análogo de estrógeno/maitansinoide, andrógeno/maitansinoide y análogo de andrógeno/maitansinoide.

- El maitansinoide que contiene el grupo reactivo se hace reaccionar con un agente que se fija a las células para producir conjugados citotóxicos. Estos conjugados se pueden purificar por HPLC o por filtración en gel.

- Esquema 1: Más específicamente, una solución de un anticuerpo en tampón acuoso se puede incubar con un exceso molar de maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo. La mezcla de reacción se puede parar por la adición de una amina en exceso (tal como etanolamina, taurina, etc.). A continuación, el conjugado de maitansinoide y anticuerpo se puede purificar por filtración en gel.

El número de moléculas de maitansinoide unidas por molécula de anticuerpo se puede determinar con la medición al espectrofotómetro de la proporción de la absorbancia a 252 nm y a 280 nm. Con este procedimiento se pueden unir un promedio de 1 a 10 moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo.

- 40 Los conjugados de los agentes que se fijan a las células con los fármacos maitansinoides de la invención se pueden evaluar por su capacidad para suprimir la proliferación de diferentes líneas de células indeseadas *in vitro*. Por ejemplo, para la valoración de la citotoxicidad de estos compuestos se pueden utilizar con facilidad las líneas celulares tales como la línea de carcinoma epidermoide de humano A-431, la línea celular de cáncer de pulmón

microcítico de humano SW2, la línea de tumor de mama de humano SKBR3 y la línea de linfoma de Burkitt Namalwa. Las células a evaluar se pueden exponer a los compuestos durante 24 horas y las fracciones supervivientes de células se pueden medir en ensayos directos mediante los métodos conocidos. A continuación se pueden calcular los valores de  $CI_{50}$  a partir de los resultados de los ensayos.

5 Producción de los maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo

Los nuevos maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo descritos en la presente memoria son los compuestos representados por la fórmula 11:



en donde  $R_1$  y  $R_2$  son cada uno independientemente H,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , alquilo superior lineal o ramificado,

10 en donde n es de 1 a 5, y

en donde X es una parte de un éster activo y puede ser *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo o 3-carboxi-4-nitrofenilo.

Ejemplos de alquilos lineales incluyen propilo, butilo, pentilo y hexilo.

Ejemplos de alquilos ramificados incluyen isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, isopentilo y 1-etilpropilo.

15 Las realizaciones preferidas de la fórmula 11 incluyen los maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un éster  $CO_2-X$  reactivo, en donde X es *N*-succinimidilo o *N*-sulfosuccinimidilo. La realizaciones más preferidas de la fórmula 11 incluyen los maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo, en donde  $R_1$  es H,  $R_2$  es  $CH_3$ , n es 2 y  $CO_2-X$  es un éster activo de *N*-succinimidilo (compuesto 2) o  $CO_2-X$  es un éster activo de *N*-sulfosuccinimidilo (compuesto 3a).

20 Se pueden preparar nuevos maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo mediante los métodos novedosos que se describen a continuación.

Esquema 2a: El maitansinoide que tiene un resto disulfuro que lleva un éster reactivo de *N*-succinimidilo (compuesto 2) se puede preparar al hacer reaccionar la *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (compuesto 6) con la *N*-hidroxisuccinimida en un solvente orgánico seco en presencia del 1-[3-(dimetilamino)propil]-

25 3-etilcarbodiimida.HCl (EDC.HCl) a la temperatura ambiente durante aproximadamente 1 a 12 h. La compleción de la reacción se puede monitorizar con técnicas químicas estándares, tales como cromatografía en capa fina (TLC, por su nombre en inglés) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por su nombre en inglés). Después de terminar la reacción, el derivado de maitansinoide que tiene un resto disulfuro que lleva un éster reactivo de *N*-succinimidilo (compuesto 2) se puede purificar por cromatografía en gel de sílice o HPLC. También se pueden  
30 emplear agentes de condensación diferentes al EDC.HCl para la reacción, tales como *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC).

Esquema 2b: El maitansinoide que tiene un resto disulfuro que lleva un éster reactivo de *N*-succinimidilo (compuesto 2) se puede preparar mediante un procedimiento alternativo. Una solución de 4-(2-piridilditio)-pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP, por su nombre en inglés) (compuesto 7) en metanol se trata con una solución de DM1 en  
35 metanol. Se añade el tampón de acetato de sodio (pH de 3 a 5) y la mezcla de reacción se agita en una atmósfera de argón a la temperatura ambiente. El progreso de la reacción se puede monitorizar por HPLC con una columna Vydac C-18. El producto 2 se puede purificar por HPLC.

40 Esquema 3a: El maitansinoide que tiene un resto disulfuro que lleva un éster reactivo de *N*-sulfosuccinimidilo (compuesto 3a) se puede preparar al hacer reaccionar la *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (compuesto 6) con la sal sódica de la *N*-hidroxisulfosuccinimida (exceso molar de 1 a 2 veces sobre el ácido (6)) en un solvente orgánico seco (tal como cloruro de metileno, dimetilformamida, tetrahidrofurano, dioxano, dietiléter) en presencia de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida.HCl (EDC.HCl) (exceso molar de 1 a 2 veces sobre el ácido (6)). La compleción de la reacción se puede monitorizar con las técnicas químicas estándares, tales como TLC o HPLC. Después de terminar la reacción, el derivado de maitansinoide que tiene un resto disulfuro  
45 que lleva un éster reactivo de *N*-sulfosuccinimidilo (compuesto 3a) se puede purificar por cromatografía en gel de sílice o por HPLC, o por precipitación mediante la adición de grandes volúmenes de acetato de etilo (similar al método general de preparación de ésteres de *N*-sulfosuccinimidilo, tal y como se describe en Staros, *Biochemistry*, 1982, 21: 3950-3955). Para la reacción se pueden emplear agentes de condensación diferentes al EDC.HCl.

50 Esquema 3b: El maitansinoide que tiene un resto disulfuro que lleva un éster reactivo de *N*-sulfosuccinimidilo (compuesto 3a) se puede preparar mediante un procedimiento alternativo. Una solución del 4-(2-piridilditio)-pentanoato de *N*-sulfosuccinimidilo (sulfo-SPP) (compuesto 8) en metanol se trata con una solución de DM1 en metanol. Se añade tampón de acetato de sodio (pH de 3 a 5) y la mezcla de reacción se agita en una atmósfera de argón a la temperatura ambiente. El progreso de la reacción se puede monitorizar por HPLC. El producto 3a se puede purificar por HPLC.

## Producción de derivados de maitansinoides

Los esquemas 4a y 4b describen nuevos procedimientos para la producción de un derivado de maitansinoide de la DM1 (1). Este derivado de maitansinoide 6 se denomina formalmente  $N^2$ -desacetil- $N^2$ -[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina y se representa mediante la fórmula:



$\text{R}_1 = \text{H}$ ,  $\text{R}_2 = \text{CH}_3$ ,  $n = 2$ .

El derivado de maitansinoide 6 se podría utilizar directamente en la preparación de una serie de conjugados citotóxicos de maitansinoide con agente que se fija a las células. Preferiblemente, el derivado de maitansinoide 6 se utiliza en la producción de nuevos maitansinoides que tienen un resto disulfuro que lleva un grupo reactivo, mediante el uso de los nuevos métodos presentados más arriba en los esquemas 2a y 3a.

Esquema 4a: El derivado de maitansinoide 6 se puede sintetizar mediante intercambio de disulfuros entre la DM1 y el ácido 4-(2-piridilditio)-pentanoico (compuesto 5). Una solución de ácido 4-(2-piridilditio)-pentanoico en metanol se trata con una solución de DM1 en metanol. Se le añade tampón de fosfato de potasio y la mezcla de reacción se agita en una atmósfera de argón a la temperatura ambiente. El progreso de la reacción se puede monitorizar por HPLC. El producto 6 se puede purificar por HPLC. El producto purificado se puede volver a analizar por HPLC. La identidad del producto se puede determinar por espectrometría de masas de alta resolución de la sal sódica de 6.

Esquema 4b: El derivado de maitansinoide 6 se puede preparar mediante un método alternativo, en donde el maitansinol se conjuga con la mezcla de disulfuros de la  $N$ -metil- $N$ -(3-mercaptopropanoíl)- $L$ -alanina y el 4-mercaptopentanoato de trimetilsililetilo (compuesto 9) para producir el éster de maitansinoide (compuesto 10), que a continuación se desprotege para producir el compuesto 6.

## Preparación de los agentes que se fijan a las células

La eficacia de los compuestos de la invención como agentes terapéuticos depende de la selección cuidadosa de un agente que se fija a las células apropiado. Los agentes que se fijan a las células pueden ser de cualquier clase conocida en la actualidad o que se pueda llegar a conocer, e incluye péptidos y no péptidos. Por lo general, pueden ser anticuerpos (en concreto anticuerpos monoclonales), lincocinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas transportadoras de nutrientes (tales como la transferrina) o cualquier otra molécula o sustancia que se fije a las células.

Los ejemplos más específicos de agentes que se fijan a las células que se pueden utilizar incluyen:

anticuerpos policlonales;

30 anticuerpos monoclonales;

fragmentos de anticuerpos, tales como Fab, Fab' y  $\text{F(ab)}_2$ , 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.,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ );

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

35 hormonas tales como insulina, TRH (tirotropina), MSH (melanotropina); hormonas esteroideas, tales como andrógenos y estrógenos;

factores de crecimiento y factores estimuladores de colonias, tales como EGF, TGF- $\alpha$ , 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

40 vitaminas, tales como folato.

Las técnicas de anticuerpos monoclonales permiten la producción de agentes que se fijan a las células muy específicos en forma de anticuerpos monoclonales específicos. Se conocen particularmente bien en la técnica la metodología para crear anticuerpos monoclonales sintetizados tras la inmunización de ratones, ratas, hámsters o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés, tal como la célula diana intacta, antígenos aislados de la célula diana, virus completo, virus completo atenuado y proteínas víricas, tales como proteínas de la cubierta vírica. También se pueden utilizar células humanas sensibilizadas. Otro procedimiento para crear anticuerpos monoclonales es el uso de genotecas de scFv (región variable de cadena única) en fagos, en concreto de scFv de humano (véase, p. ej., Griffiths et al., patentes de los EE. UU. n.ºs 5.885.793 y 5.969.108; McCafferty et al., solicitud de patente internacional WO 92/01047; Liming et al., solicitud de patente internacional WO 99/06587). Además, los anticuerpos con su superficie recodificada descritos en la patente de los EE. UU. n.º 5.639.641 también se pueden



utilizar al igual que los anticuerpos humanizados.

La selección del agente adecuado que se fija a las células es una cuestión de elección que depende de la población concreta de células sobre la cual se desea actuar selectivamente, pero en general se prefieren los anticuerpos monoclonales de humano si se dispone de uno adecuado.

- 5 Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal J5 es un anticuerpo murino IgG<sub>2a</sub> que es específico del antígeno de la leucemia linfoblástica aguda común (CALLA, por su nombre en inglés) (Ritz et al., *Nature*. 283: 583-585 (1980)) y se puede utilizar si las células diana expresan el CALLA, tal como en la enfermedad de la leucemia linfoblástica aguda. De igual forma, el anticuerpo monoclonal anti-B4 es una IgG<sub>1</sub> murina, que se fija al antígeno CD19 de los linfocitos B (Nadler et al., *J. Immunol.* 131: 244-250 (1983)) y se puede utilizar si las células diana son los linfocitos B o las células enfermas que expresan este antígeno, tal como en el linfoma de no Hodgkin o en la leucemia linfoblástica crónica.

- 10 Adicionalmente, el GM-CSF que se fija a las células mieloides se puede utilizar como un agente que se fija a las células enfermas de la leucemia mielógena aguda. La IL-2 que se fija a los linfocitos T activados se puede utilizar para la prevención del rechazo del injerto trasplantado, para el tratamiento y la prevención de la enfermedad del injerto contra el huésped, y para el tratamiento de la leucemia aguda de linfocitos T. La MSH que se fija a los melanocitos se puede utilizar para el tratamiento del melanoma.

Se puede actuar selectivamente y con éxito sobre los cánceres de mama y de testículo mediante el uso de un estrógeno (o análogos de estrógenos) o un andrógeno (o análogos de andrógenos), respectivamente, como agentes de fijación a las células.

## 20 Ejemplos

La invención se ilustrará ahora mediante referencia a los ejemplos. A menos que se diga otra cosa, todos los porcentajes, proporciones, partes, etc., son en peso. Los ejemplos que se describen a continuación son moléculas en las que R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es CH<sub>3</sub> y n es 2. Se puede llevar a cabo una síntesis parecida para otras moléculas en las que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno independientemente H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> o un alquilo superior; y en donde n es de 1 a 5.

## 25 Ejemplo 1a

Preparación de conjugados citotóxicos con el maitansinoide 2:

- Una solución del anticuerpo huN901 (2,5 mg/ml) en tampón acuoso (fosfato de potasio a 50 mM, cloruro de sodio a 50 mM, sal disódica de ácido etilendiaminatetraacético a 2 mM), pH 6,5, se incubó con un exceso molar de 6 veces de maitansinoide 2 en dimetilacetamida (DMA) para dar una concentración de DMA final del 20%. La reacción se dejó continuar durante 13 h a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se dividió en dos porciones. Una porción se purificó al hacerla pasar por una columna de filtración en gel Sephadex G25 y la segunda porción se purificó en una columna de filtración en gel Sephacryl S300. En cada caso se agruparon las fracciones que contienen el conjugado monomérico. La concentración del conjugado se determinó en un espectrofotómetro con los coeficientes de extinción conocidos para los componentes anticuerpo y DM1 a 280 y 252 nm (para huN901,  $\epsilon_{280\text{nm}} = 217.560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{252\text{nm}} = 80.062 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; para DM1,  $\epsilon_{280\text{nm}} = 5.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{252\text{nm}} = 26.790 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

La purificación por cromatografía en Sephadex G25 da un conjugado que contiene conectadas, de promedio, 2,08 moléculas de DM1 por molécula de anticuerpo (rendimiento basado en el anticuerpo de partida = 60%). La purificación por cromatografía en Sephacryl S300 da un conjugado que contiene conectadas, de promedio, 1,61 moléculas de DM1 por molécula de anticuerpo (rendimiento basado en el anticuerpo de partida = 64%).

## 40 Ejemplo 1b

Preparación de conjugados citotóxicos con el maitansinoide 3a:

- Una solución del anticuerpo huN901 (2,5 mg/ml) en tampón acuoso (fosfato de potasio a 50 mM, cloruro de sodio a 50 mM, sal disódica del ácido etilendiaminatetraacético a 2 mM), pH 6,5, se incubó con un exceso molar de 12 veces del maitansinoide 3a en dimetilacetamida (DMA) para dar una concentración final de DMA del 20%. La reacción se dejó continuar durante 11 h a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se dividió en dos porciones. Una porción se purificó al hacerla pasar por una columna de filtración en gel de Sephadex G25 y la segunda porción se purificó en una columna de filtración en gel de Sephacryl S300. En cada caso se agruparon las fracciones que contenían el conjugado monomérico. La concentración del conjugado se determinó en un espectrofotómetro con los coeficientes de extinción conocidos para los componentes de anticuerpo y DM1 a 280 y 252 nm (para huN901,  $\epsilon_{280\text{nm}} = 217.560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{252\text{nm}} = 80.062 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , y para DM1,  $\epsilon_{280\text{nm}} = 5.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{252\text{nm}} = 26.790 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

La purificación por cromatografía en Sephadex G25 dio un conjugado que contenía conectadas, de promedio, 4,89 moléculas de DM1 por molécula de anticuerpo (rendimiento basado en el anticuerpo de partida = 59%). La purificación por cromatografía en Sephacryl S300 dio un conjugado que contenía conectadas, de promedio, 4,16

moléculas de DM1 por molécula de anticuerpo (rendimiento basado en el anticuerpo de partida = 58%).

#### Ejemplo 2a

Síntesis del derivado de maitansinoide (2) que lleva un éster reactivo de *N*-succinimidilo

5 Todas las reacciones se llevaron a cabo en una atmósfera de argón. Todos los reactivos se compraron a Aldrich Chemical Co., New Jersey. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN <sup>1</sup>H) se adquirieron en un instrumento Bruker a 400 MHz y los espectros de masas se adquirieron en un instrumento Daltonics Esquire 3000 de Bruker mediante ionización por electropulverización.

Se han descrito anteriormente (patente de los EE. UU. n.º 5.208.020) las síntesis del maitansinoide que contiene tiol (L-DM1,1).

- 10 Preparación del ácido 4-(2-piridilditio)-pentanoico (PPA, 5): un matraz de 1 l con dos cuellos se equipó con una barra de agitación, un embudo de adición y un termómetro. El matraz se cargó con 150 g de 1,3-dibromobutano (0,74 mol) y 700 ml de sulfóxido de dimetilo. Se le añadió gota a gota una solución de cianuro de sodio (37,5 g, 0,76 mol) en agua desionizada (79 ml) a un ritmo que no permitió que la temperatura de la reacción superase los 65 °C. Después de añadirlo todo, la reacción se agitó durante una noche. La mezcla se diluyó con 700 ml de agua desionizada y se extrajo con una solución 1:1 de acetato de etilo:hexanos (2 × 1,4 l). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron secuencialmente con 700 ml de agua desionizada y 700 ml de cloruro de sodio acuoso saturado. El solvente se evaporó a baja presión (aproximadamente a 15 Torr). El residuo se disolvió en 210 ml de etanol de calidad para reactivo y se transfirió a un matraz de 1 l. A continuación se le añadieron al matraz agua desionizada (210 ml) y tiourea (66,4 g, 0,87 mol). El matraz se equipó con un condensador de reflujo y se calentó en un baño de aceite con agitación para dar un reflujo suave. Al cabo de 4 horas, se retiró el baño de aceite y el matraz se dejó enfriar a la temperatura ambiente. Se le añadió una solución de hidróxido de sodio a 10 M (500 mL) y la mezcla se calentó en un baño de aceite a un reflujo suave con agitación durante una noche. El baño de aceite se retiró y el matraz se dejó enfriar a la temperatura ambiente. La solución se transfirió a un embudo separador y se lavó dos veces con porciones de 500 ml de acetato de etilo. La capa acuosa se transfirió a un matraz de 2 l y se enfrió en un baño con hielo y agua. Se le añadió acetato de etilo (1 l) y el contenido se agitó rápidamente a medida que se añadía HCl concentrado hasta que la capa acuosa se comprobó que estaba a aproximadamente pH 2. Se separó la capa de acetato de etilo y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 × 1 l). Las capas orgánicas se agruparon y se concentraron por evaporación rotatoria a temperatura ambiente para dar el ácido 4-mercapto-pentanoico, que se utilizó en la siguiente etapa sin más purificación.
- 20
- 25
- 30 Un matraz de 2 l con una barra de agitación magnética se cargó con 2-2'-ditiopiridina (300 g, 1,36 mol), etanol de calidad para reactivo (1 l) y ácido acético glacial (42 ml). Se añadió gota a gota una solución del ácido 4-mercaptopentanoico bruto en acetato de etilo (400 ml) a lo largo de 15 minutos y la reacción se agitó en argón otras 2 horas más. Se retiró el solvente por evaporación rotatoria y el residuo se recuperó en la menor cantidad posible de acetato de etilo y se purificó mediante cromatografía en columna con una columna de gel de sílice (6,25 × 27 cm). La columna se eluyó con hexanos:acetato de etilo a 4:1 hasta que se retiró toda la 2-2'-ditiopiridina (aldriol-2). A continuación se eluyó la columna con 4:1 de hexanos:acetato de etilo que contiene ácido acético al 2%. La elución se monitorizó mediante TLC y se reunieron las fracciones. Luego se retiró el solvente por evaporación rotatoria a baja presión para dar el ácido 4-(2-piridilditio)-pentanoico (PPA, 5) puro como un sólido blanco (40 g, rendimiento total del 23%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 1,39 (d, 3H), 2,0 (t, 2H), 2,56 (t, 2H), 2,8-3,3 (m, 1H), 6,8-7,2 (m, 1H), 7,6-7,8 (m, 2H), 8,4-8,6 (m, 1H), 11,68 (s, 1H).
- 35
- 40

Preparación de la *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (L-DM1-TPA, 6): Se agitó vigorosamente una solución de ácido 4-(2-piridilditio)-pentanoico (5, 24 mg, 0,10 mmol) y L-DM1 (1, 30 mg, 0,041 mmol) en metanol destilado anhidro (5 ml) y se le añadió gota a gota 3 ml de un tampón acuoso (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 200 mM, EDTA a 2 mM, pH 7,6). Se dejó reposar la reacción durante una noche y el producto se purificó por HPLC con una columna Vydac C-18 de 10 × 250 mm, a 30 °C, a la velocidad de flujo de 4,75 ml/min con un gradiente lineal de acetonitrilo (del 15% al 85% durante 30 min) en tampón de acetato de amonio a 40 mM, pH 7,2. La L-DM1-TPA (6) se eluyó con un tiempo de retención de 12 min. El producto se recogió como la sal de amonio y se retomó en 15 ml de acetato de etilo. La solución se lavó sucesivamente con 4 ml de HCl a 1 M seguido de 3 ml de cloruro de sodio saturado. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el solvente se retiró al vacío para dar 15 mg (rendimiento del 37%) del producto 6. La identidad del producto se estableció mediante espectrometría de masas de alta resolución: calculada para el ion molecular con sodio = 892,2891, hallada = 892,2955. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6,84 (d, 1H, *J* = 1 Hz), 6,76 (dd, 1H, *J* = 7,1 Hz), 6,59 (dd, 1H, *J* = 14,11 Hz), 6,32-6,64 (m, 2H), 5,6-5,7 (m, 1H), 5,13-5,23 (m, 1H), 4,83 (dt, 1H, *J* = 9,3 Hz), 4,31 (dd, 1H, *J* = 12,1 Hz), 3,99 (s, 3H), 3,63 (dd, 1H, *J* = 13,1 Hz), 3,49 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 3,36 (s, 3H), 3,22 (d, 3H, *J* = 1 Hz), 3,12 (dd, 1H, *J* = 12,1 Hz), 2,75-2,91 (m, 5H) 2,54-2,72 (m, 4H), 2,34-2,52 (m, 2H), 2,20 (dd, 3H, *J* = 13,1 Hz), 1,7-1,9 (m, 4H), 1,66 (s, 3H), 1,42-1,5 (m, 2H), 1,37 (dd, 3H, *J* = 9,1 Hz), 1,2-1,3 (m, 7H), 0,81 (s, 3H).

45

50

55

Preparación del éster *N*-succinimidílico de la *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (éster *N*-succinimidílico de L-DM1-TPA, 2): Una solución de L-DM1-TPA (6) (10 mg, 0,011 mmol) en cloruro de metileno (1,5 ml) se trató con *N*-hidroxisuccinimida (10 mg, 0,086 mmol) y 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-

etilcarbodiimida.HCl (21 mg, 0,11 mmol) con agitación enérgica. Se dejó transcurrir la reacción durante 2 horas, tras lo cual se retiró al vacío aproximadamente la mitad del solvente. La solución restante se sometió a una cromatografía preparativa en capa fina (dos placas de sílice de 2000 µm de grosor) con una fase móvil de (cloruro de metileno:metanol 95:5). La banda para el producto deseado (2) se rascó de la placa y se agitó con 20 ml de (cloruro de metileno:metanol 80:20) y se filtró con vacío a través de un embudo de vidrio sinterizado. El filtrado se concentró al vacío para dar (8 mg, 0,0083 mmol, rendimiento del 75%) del producto. El análisis espectral de masas dio un pico basal con ion compatible con  $M^+ + Na$  989,4. La fragmentación del ion de 989,4 dio iones hijo, que también eran compatibles con la estructura de 2. RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6,96 (d, 1H,  $J = 1,8$  Hz), 6,81 (d, 1H,  $J = 1,8$  Hz), 6,48 (dd, 1H,  $J = 15,11$  Hz), 6,27 (s, 1H), 6,14 (d, 1H,  $J = 11$  Hz), 5,53 (dd, 1H,  $J = 15, 9,3$  Hz), 5,41 (q, 1H,  $J = 6,9$  Hz), 4,36 (dd, 1H,  $J = 12,1$  Hz), 3,99 (s, 3H), 3,66 (s, 1H), 3,54 (d, 1H,  $J = 9,3$  Hz), 3,4-3,54 (m, 5H), 3,36 (s, 3H), 3,35 (s, 3H), 3,21 (s, 3H), 3,12 (d, 1H,  $J = 12,7$  Hz), 2,88 (d, 1H,  $J = 5,4$  Hz), 2,7 (s, 4H), 2,5-2,65 (m, 5H), 2,1 (d, 1H,  $J = 9,4$  Hz), 1,69 (s, 3H), 1,45-1,55 (m, 2H), 1,1-1,3 (M, 10H), 0,83 (s, 3H).

## Ejemplo 2b

Procedimiento alternativo para la síntesis del derivado de maitansinoide (2) que lleva un éster reactivo de *N*-succinimidilo

Preparación del éster *N*-succinimidílico del ácido 4-(2-piridilditio)-pentanoico (SSP, 7): Una solución de ácido 4-(2-piridilditio)-pentanoico (5, 30 g, 123 mmol) en cloruro de metileno (525 ml) se trató con *N*-hidroxisuccinimida (14,3 g, 124 mmol) y 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida.HCl (31,8 g, 165 mmol). El contenido se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas después de lo cual se le añadieron 750 ml de acetato de etilo. La solución se lavó con ácido acético acuoso al 0,5% (3 × 350 ml) y una vez con 150 ml de cloruro de sodio acuoso saturado. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se retiró al vacío el solvente por evaporación rotatoria. El residuo se recogió en un volumen mínimo de acetato de etilo y se cargó en una columna de 6,25 × 20 cm de mezcla lechosa de sílice empaquetada en hexanos:acetato de etilo a 1:1. La columna se eluyó con hexanos:acetato de etilo a 1:1. Las fracciones que contienen el producto se combinaron y el solvente se retiró mediante evaporación rotatoria. El aceite resultante (31 g) se recogió en un volumen mínimo de etanol caliente de calidad para reactivo y, con agitación magnética, se le añadieron 350 ml de éter etílico, seguido de 100 ml de hexanos. El precipitado resultante se recogió por filtración con vacío y se secó en un horno al vacío a 30 °C durante 12 horas, lo que da 18,7 g de SPP (7) como un sólido blanco (18,7 g, rendimiento del 45%. RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  1,39 (d, 3H), 2,0 (t, 3H), 2,56-3,4 (m, 7H), 6,8-7,2 (m, 1H), 7,6-7,8 (m, 2H), 8,4-8,6 (d, 1H). Análisis elemental: Calculado: % C 49,4, % H 4,70, % N 8,20, % S 18,80. Hallado: % C 49,3, % H 4,68, % N 8,18, % S 18,94.

Preparación del éster *N*-succinimidílico de la *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (éster succinimidílico de L-DM1-TPA, 2): Una solución del éster *N*-succinimidílico del ácido 4-(2-piridilditio)-pentanoico (SPP, 7, 3 mg, 15 µmol) en metanol (15 ml) se hizo reaccionar con DM1 (1, 0,58 mg, 0,8 µmol) en dimetilacetamida (0,1 ml). Se le añadió tampón de fosfato de potasio (0,5 ml de una solución a 0,2 M, pH 6, EDTA a 2 mM), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de argón a la temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitorizó por TLC en gel de sílice y el producto se purificó por TLC preparativa en gel de sílice como se describe más arriba.

## Ejemplo 3a

Síntesis del derivado de maitansinoide (3a) que lleva un éster reactivo de *N*-sulfosuccinimidilo

Preparación del éster *N*-sulfosuccinimidílico de la *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (éster sulfosuccinimidílico de L-DM1-TPA, 3a): la L-DM1-TPA (6,2 mg, 0,002 mmol) se disolvió en dimetilacetamida (0,25 ml), a lo cual se le añadió la sal sódica de *N*-hidroxisulfosuccinimida (1,0 mg, 0,0048 mmol) y dicitohexilcarbodiimida (1,0 mg, 0,0048 mmol). Después de 3 horas se le añadieron 0,5 ml de alcohol diisopropílico y el precipitado resultante se retiró por filtración. Análisis por HPLC (columna Vydac C-18, columna C18 de 10 × 250, a 30 °C, velocidad de flujo de 4,75 ml/min, tampón de formiato de trietilamonio a 50 mM a pH 3,8, con un gradiente de metanol lineal (del 30% al 90% durante 30 minutos) del filtrado mostró dos picos principales, una para la L-DM1-TPA sin reaccionar a 22 min y otro para el éster sulfosuccinimidílico de L-DM1-TPA a 19 min. Se aisló el compuesto que eluyó a los 19 min y se analizó por espectrometría de masas, lo que mostró que tenía el pico esperado congruente con el ion molecular con dos átomos de sodio ( $M^+ + 2Na$ ) de 3a, m/e 1091,4. La fragmentación adicional del ion de 1091,4 dio iones hijo predecibles, m/e 1073,4 ( $M^+ + 2Na - H_2O$ ), 874,4 ( $M^+ + 2Na - N$ -hidroxisulfosuccinimida con sodio).

La preparación de la *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (L-DM1-TPA, 6) y el ácido 4-(2-piridilditio)-pentanoico (PPA, 5) fueron como se presenta en el ejemplo 2a más arriba.

## Ejemplo 3b

Procedimiento alternativo para la síntesis del derivado de maitansinoide (3a) que lleva un éster reactivo de *N*-sulfosuccinimidilo

El maitansinoide 3a también se puede preparar directamente al hacer reaccionar la DM1 (1) con la sal de sodio del

- 5 sulfoSPP (éster *N*-sulfosuccinimidílico del ácido 4-(2-piridilditio)-pentanoico, 8). La sal de sodio del sulfoSPP (8a) se puede preparar mediante la conjugación del PPA (5) con la sal de sodio de la *N*-hidroxisulfosuccinimida en presencia de EDC.HCl, mediante el procedimiento descrito para el SPP (7) (véase el ejemplo 2a más arriba). La reacción de DM1 con un exceso molar de 20 veces de 8a en dimetilacetamida y tampón de fosfato de potasio a pH 6, que contiene EDTA a 2 mM a la temperatura ambiente da el maitansinoide 3a, que se puede purificar por HPLC según se describe en el ejemplo 3a.

#### Ejemplo 4

##### Procedimiento alternativo para la síntesis del derivado de maitansinoide (6)

- 10 El maitansinoide 6 también se puede preparar directamente a partir del maitansinol como se ilustra en la figura 5. El compuesto 9 se prepara mediante el intercambio de disulfuros entre el éster (2-trimetilsilil)etílico del PPA (5) y *N*-metil-*N*-(3-mercapto-1-oxopropil)-L-alanina. El producto se puede purificar mediante cromatografía en columna en gel de sílice. La esterificación del maitansinol con 6 equivalentes de 9 en presencia de DCC (7,2 eq) y dimetilaminopiridina (DMAP) o cloruro de cinc (1 eq) en diclorometano, como se describió previamente (patente de los EE. UU. n.º 5.208.020) da el maitansinoide 10, que se puede purificar por los medios químicos estándares, tales como cromatografía en gel de sílice o HPLC. El tratamiento de 10 con 5 equivalentes de fluoruro de tetrabutilamonio en tetrahydrofurano durante 30 min a la temperatura ambiente da lugar a la escisión del grupo protector (trimetilsilil)etílico para producir 6, que se puede purificar por HPLC como se describe en el ejemplo 2a.

#### Ejemplo 5

##### Evaluación de los conjugados entre huN901 y DM1 por su potencia *in vitro*

- 20 Los conjugados entre huN901 y DM1 preparados mediante este nuevo procedimiento en una etapa se evaluaron por su citotoxicidad *in vitro* contra las células que expresan el antígeno como sigue. En este ensayo se utilizó un clon de células A431 que expresa constitutivamente el antígeno del huN901 (NCAM/CD56). Las células se sembraron en placas tratadas de 6 pocillos para cultivo de tejidos a una densidad de  $2 \times 10^3$  células/pocillo en 2 ml del medio DMEM complementado con suero de ternero fetal al 10% y penicilina + estreptomicina. Se añadió a los pocillos un conjugado huN901-DM1 o el anticuerpo huN901 de control en el momento de la siembra en las placas, y los cultivos se incubaron en un incubador para cultivo de tejidos a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 6%, durante 5 a 7, días para formar colonias de más de 25 células/colonia. A continuación, las placas se lavaron con PBS y después se fijaron/tiñeron durante 30 min a la temperatura ambiente con formaldehído al 10%/violeta de genciana al 0,2% (p/v) en PBS. Los pocillos se enjuagaron 3 veces con agua, se secaron al aire y las colonias se contaron con un microscopio disector con pocos aumentos. Las fracciones supervivientes se calcularon como el número de colonias en el pocillo tratado con el fármaco/número de colonias en el pocillo no tratado.

- 35 Los resultados (figura 1) indican que los conjugados huN901-DM1 preparados mediante el procedimiento en una etapa con el maitansinoide 2, seguido de la purificación mediante cromatografía en Sephadex G25 o bien en Sephacryl S300 eran potentes a la hora de destruir las células que expresaban del antígeno, con un valor de CI<sub>50</sub> de  $1 \times 10^{-10}$  M. En cambio, el anticuerpo huN901 sin conjugar no era tóxico.

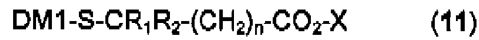
## REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un maitansinoide que tiene un resto disulfuro que lleva un éster reactivo que comprende hacer reaccionar la *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(carboxialquilditio)-1-oxopropil]-maitansina con un compuesto hidroxilado para producir un maitansinoide que tiene un grupo disulfuro que lleva un éster reactivo.
- 5 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(carboxialquilditio)-1-oxopropil]-maitansina es la *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (6).
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende una etapa de aislamiento del producto de la reacción, el éster del maitansinoide.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto hidroxilado se selecciona del grupo que consiste en *N*-hidroxisuccinimida, *N*-hidroxisulfosuccinimida, *N*-hidroxifalimida, *N*-hidroxisulfofalimida, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, 3-sulfonil-4-nitrofenol y 3-carboxi-4-nitrofenol.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto hidroxilado es *N*-hidroxisuccinimida.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto hidroxilado es *N*-hidroxisulfosuccinimida.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto hidroxilado es *N*-hidroxisuccinimida y dicho maitansinoide que tiene un grupo disulfuro que lleva un éster reactivo es el éster *N*-succinimidílico de *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (2).
- 15 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto hidroxilado es *N*-hidroxisulfosuccinimida y dicho maitansinoide que tiene un grupo disulfuro que lleva un éster reactivo es el éster *N*-sulfosuccinimidílico de *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (3a).
- 20 9. Un método para producir un maitansinoide que tiene un grupo disulfuro que lleva un éster reactivo que comprende hacer reaccionar un maitansinoide que contiene tiol con un éster de ácido carboxílico reactivo que contiene un disulfuro reactivo.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, que además comprende la etapa de aislamiento del maitansinoide que tiene un grupo disulfuro que lleva un éster reactivo.
- 25 11. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el éster reactivo de ácido carboxílico que contiene un disulfuro reactivo es el 4-(2-piridilditio)-pentanoato de *N*-succinimidilo (7).
12. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho maitansinoide que tiene un grupo disulfuro que lleva un éster reactivo es el éster *N*-succinimidílico de *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (2)..
- 30 13. Un método para producir un maitansinoide que tiene un resto disulfuro que lleva un éster reactivo que comprende hacer reaccionar un maitansinoide que contiene tiol con un éster reactivo e hidrosoluble de ácido carboxílico que contiene un disulfuro reactivo.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, que además comprende la etapa de aislamiento del maitansinoide que tiene un resto disulfuro que lleva un éster reactivo.
- 35 15. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el éster reactivo e hidrosoluble de ácido carboxílico que contiene un disulfuro reactivo es el 4-(2-piridilditio)-pentanoato de sulfosuccinimidilo (8).
16. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho maitansinoide que tiene un grupo disulfuro que lleva un éster reactivo es el éster *N*-sulfosuccinimidílico de *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (3).
- 40 17. Un método para producir la *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina (6) que comprende hacer reaccionar un maitansinoide que contiene tiol con el ácido 4-(2-piridilditio)-pentanoico (5).
18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, que además comprende la etapa de aislar la *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (6)..
19. Un método para producir la *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (6) que
- 45 comprende las etapas de
  - (a) combinar la *N*-metil-*N*-(3-mercaptopropanoíl)-L-alanina y el 4-mercaptopentanoato de trimetilsilileto (9) para formar un compuesto disulfuro mezclado
  - (b) conjugar el maitansinol al producto de (a) para producir un éster de maitansinoide 10, y

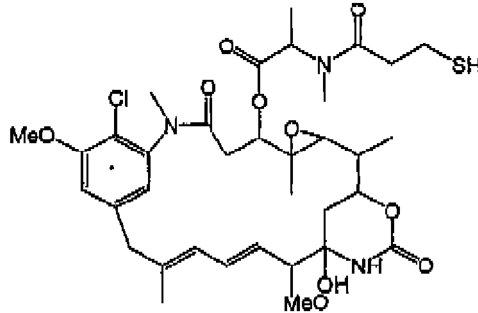
(c) desproteger el éster de maitansinoide 10.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, que además comprende la etapa de aislar la *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (6).

21. Un maitansinoide que tiene un resto disulfuro que lleva un éster reactivo que comprende la siguiente fórmula 11:



en donde DM1 es



10 en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada una independientemente H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, un alquilo superior lineal o un alquilo superior ramificado,

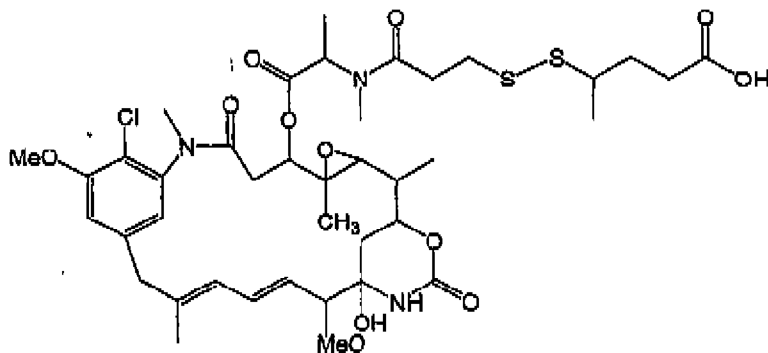
en donde n es de 1 a 5, y

en donde X es una parte de un éster activo, y puede ser *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo o 3-carboxi-4-nitrofenilo.

15 22. El derivado de maitansinoide reactivo de acuerdo con la reivindicación 21, en donde R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es CH<sub>3</sub>, n es 2 y X es *N*-succinimidilo.

23. El derivado de maitansinoide reactivo de acuerdo con la reivindicación 21, en donde R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es CH<sub>3</sub>, n es 2 y X es *N*-sulfosuccinimidilo.

24. La *N*<sup>2</sup>-desacetil-*N*<sup>2</sup>-[3-(3-carboxi-1-metilpropilditio)-1-oxopropil]-maitansina (6) que comprende la siguiente fórmula:



20

25. Un éster de maitansinoide (10) que comprende la siguiente fórmula:

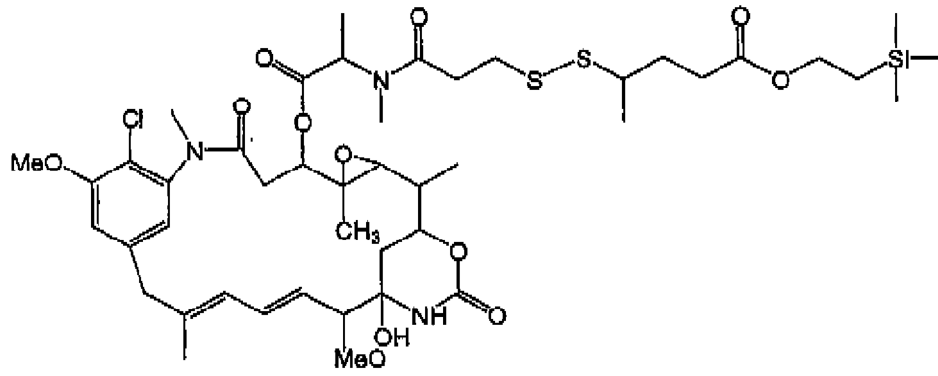
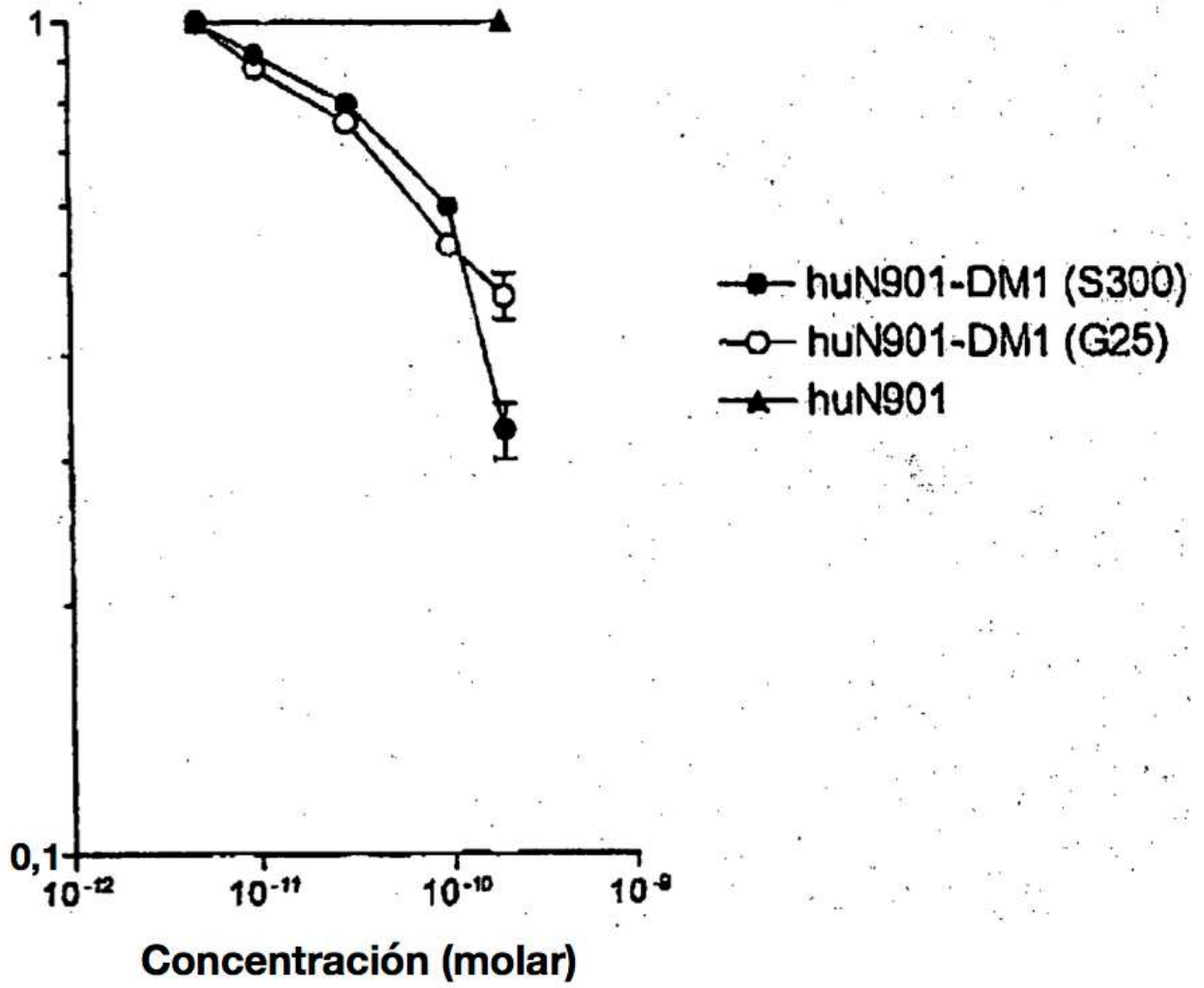
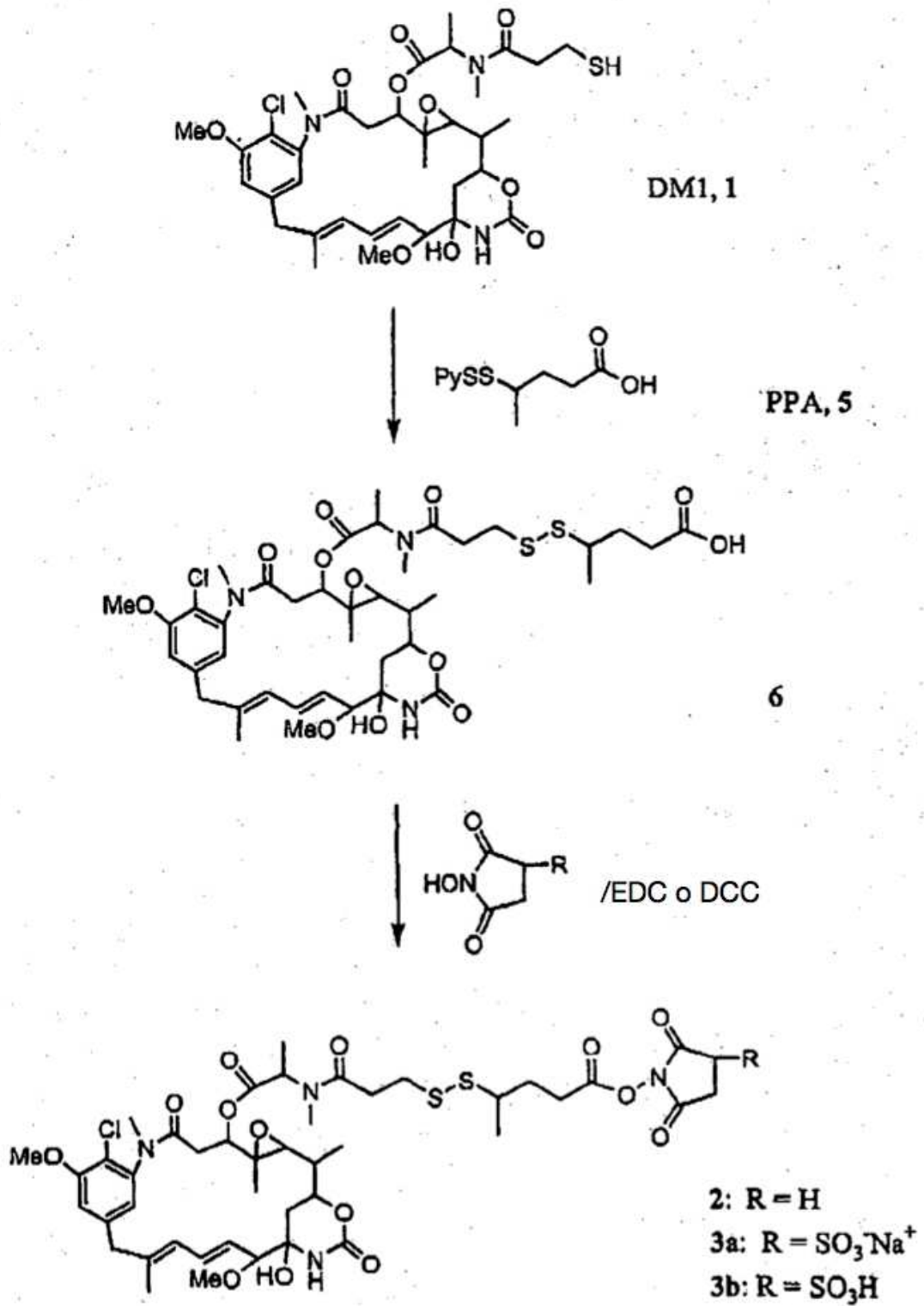


Figura 1

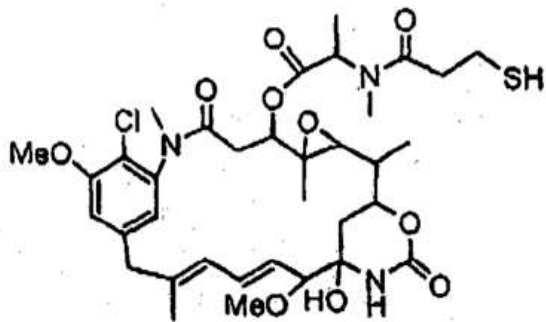




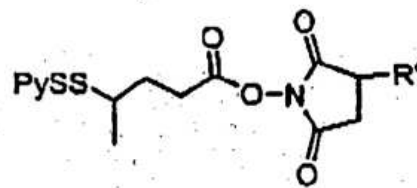
## Figura 2



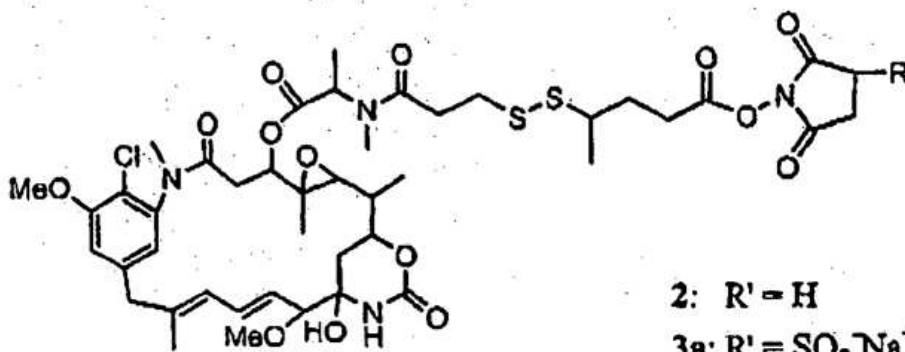
### Figura 3



DM1, 1

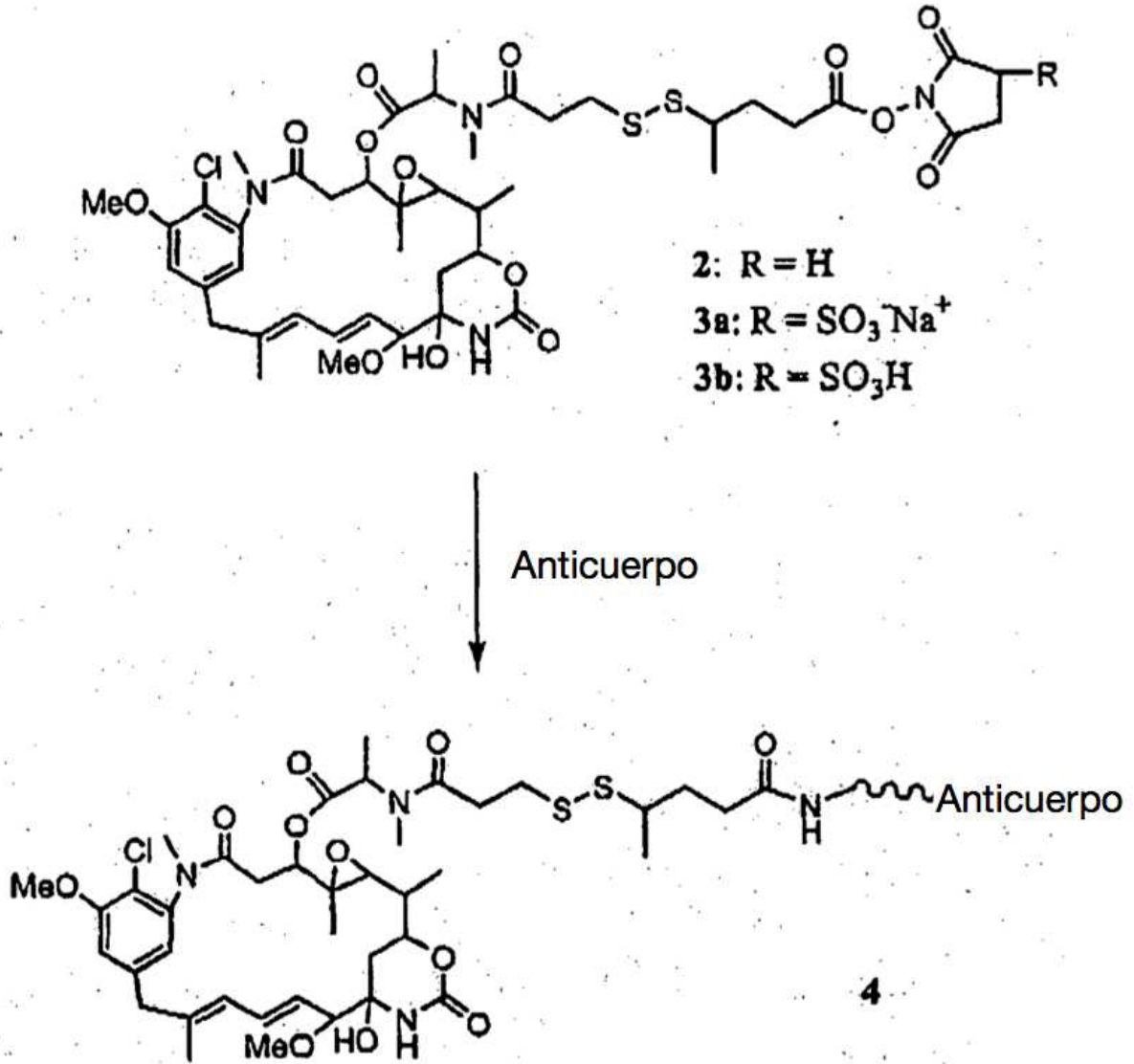


- 7: R' = H
- 8a: R' = SO<sub>3</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>
- 8b: R' = SO<sub>3</sub>H



- 2: R' = H
- 3a: R' = SO<sub>3</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>
- 3b: R' = SO<sub>3</sub>H

**Figura 4**



## Figura 5

