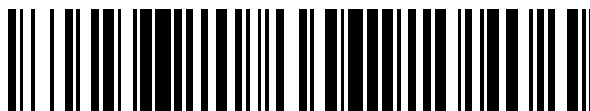


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 863 498**

51 Int. Cl.:

C07D 498/16 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

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 19160750 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020 EP 3524611**

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

30 Prioridad:

20.05.2003 US 47173903 P

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

11.10.2021

73 Titular/es:

**IMMUNOGEN, INC. (100.0%)
830 Winter Street
Waltham, MA 02451-1477, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 863 498 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 divulgación 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 divulgación 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 divulgación 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* y 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)).

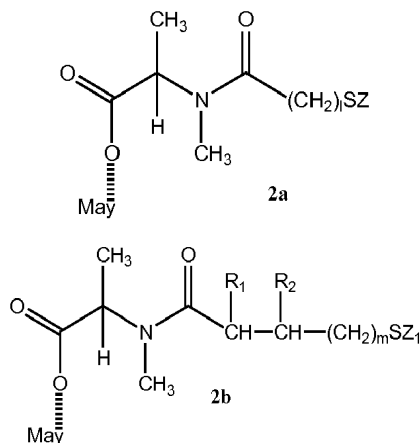
Se encontró que los ésteres del grupo (b) eran mucho más citotóxicos que los ésteres del grupo (a).

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} µg/µl, 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 inhibidora 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*²-desacetil-*N*-²-(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 acilada tiene la fórmula **2a,b**:



En la fórmula **2a**, *l* 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 (-CH₂-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 α 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 R₂=CH₃ o CH₂CH₃. 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 β 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 β .

Compendio de la invención y la divulgación adicional

La presente divulgación 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 α 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 α 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 α 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 divulgación 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 α 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 presente divulgación, 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.

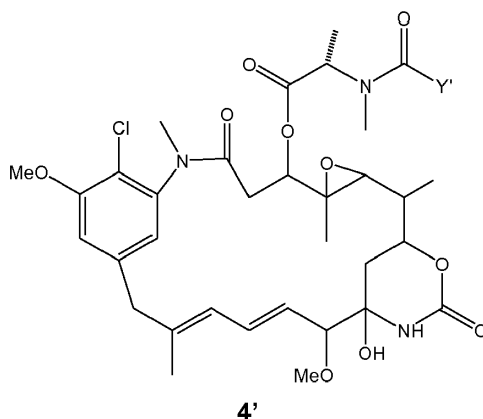
En una segunda realización, la presente divulgación describe métodos para la síntesis de estos nuevos maitansinoides.

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 divulgación proporciona:

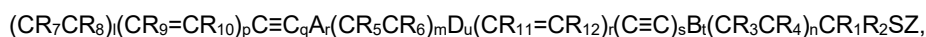
Un maitansinoide que tiene, en C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15, o desmetilo C-20, una cadena lateral amino acilada con un grupo acilo que lleva un grupo sulfhidrilo impedido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que lleva la funcionalidad tiol tiene uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre;

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



en donde:

Y' representa



5 en donde:

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

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

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

15 l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento.

Z es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o 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 un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático.

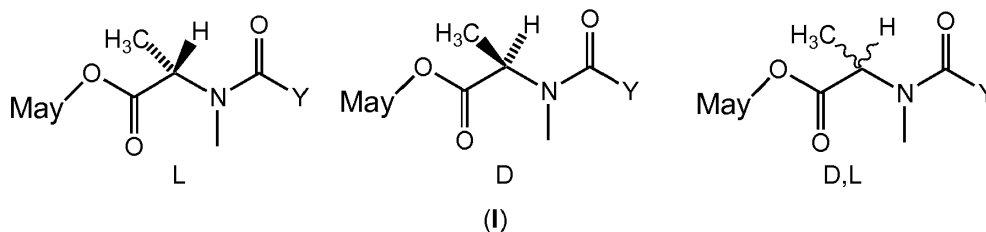
Un compuesto representado por la fórmula 4', en donde R₁ es H, R₂ es metilo y Z es H.

20 Un compuesto representado por la fórmula 4', en donde R₁ y R₂ son metilo y Z es H.

Un compuesto representado por la fórmula 4', en donde R₁ es H, R₂ es metilo, y Z es -SCH₃.

Un compuesto representado por la fórmula 4', en donde R₁ y R₂ son metilo, y Z es -SCH₃.

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



25

en donde:

Y representa (CR₇CR₈)(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂SZ, en donde:

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

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

l , m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

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

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

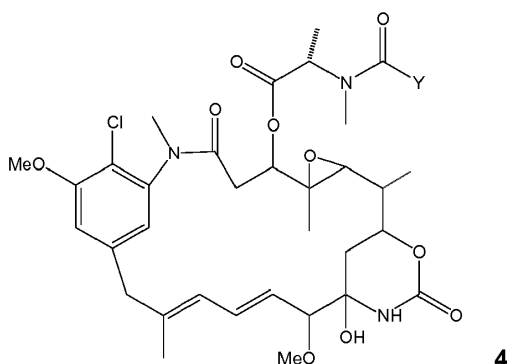
El compuesto anteriormente descrito, en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es H;

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

El compuesto anteriormente descrito, en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es $-\text{SCH}_3$;

20 El compuesto anteriormente descrito, en donde R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es $-\text{SCH}_3$;

Un compuesto representado por la fórmula 4:



en donde

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

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

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

l , m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

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

35 El compuesto 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 H;

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

El compuesto de 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 $-SCH_3$;

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

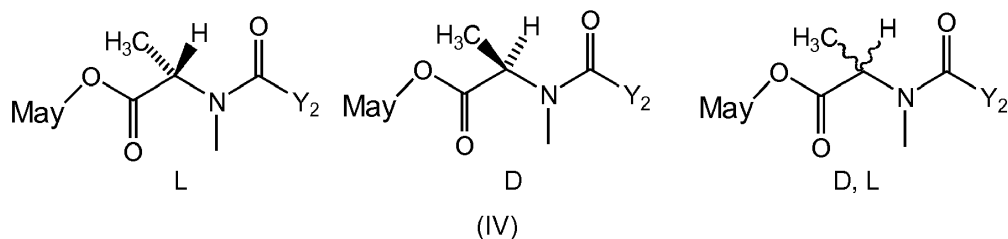
Un conjugado de maitansinoide-agente de unión a células que comprende al menos un maitansinoide unido al agente de unión a células, en donde el maitansinoide es cualquiera de los compuestos descritos antes;

- 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;

- 15 Un método de esterificación de un maitansinoide en C-3, Hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15, o desmetilo C-20, con una cadena lateral de aminoácido acilada donde el grupo acilo lleva una funcionalidad sulfhidrido protegida, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que lleva la funcionalidad tiol protegida tiene uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH_3 , C_2H_5 , 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre, comprendiendo dicho método hacer reaccional un maitansinoide en C-3, Hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15, o desmetilo C-20, con el aminoácido acilado donde el grupo acilo lleva un grupo sulfhidrido protegido;

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



en donde:

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

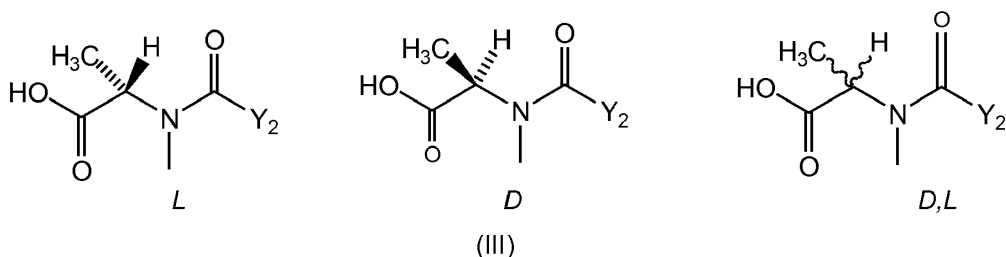
- 30 R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R_2 puede ser H;

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

- 35 l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

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 un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático; y

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



en donde:

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

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

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

10 l , m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

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

15 El método descrito 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; y n es 0;

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

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

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

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

25 El método anteriormente descrito, en donde la mezcla de **15a**(S,S) y **15b**(S,R) se realiza mediante un proceso que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotioisulfonato 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*-metil-L-alanina para dar dicha mezcla de los compuestos **15a**(S,S) y **15b**(S,R);

30 El método anteriormente descrito, en donde compuesto **15a**(S,S) se obtiene mediante un método que comprende:

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

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

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

El método anteriormente descrito, en donde el compuesto **15b**(S,R) se obtiene mediante un método que comprende:

35 (1) convertir (S)-1,3-butanodiol en (R)-4-(metiditio)pentanoico **24**;

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

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

El método anteriormente descrito, en donde la mezcla de compuestos **15**(R,S) y **15**(R,R) se obtiene mediante un método que comprende:

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

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

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

10 El método anteriormente descrito, en donde *N*-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva una funcionalidad tiol protegida, en la que el carbono centro que lleva el átomo de azufre es o bien racémico o de la quiralidad R o S, para dar compuestos de la estructura de **15** se obtiene mediante un proceso que comprende:

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

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

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

El método anteriormente descrito, en donde R₁ y R₂ son metilo; R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H; l y m son cada uno 1; y n es 0;

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

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

El método anteriormente descrito, en donde el compuesto de fórmula (III-D,L) es el compuesto **10**(S,R) que contiene *N*-metilalanina racémica;

25 El método anteriormente descrito, en donde el compuesto **10** que contiene *N*-metil-L-alanina, *N*-metil-D-alanina o *N*-metilalanina racémica se obtiene mediante un proceso que comprende:

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

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

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

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

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

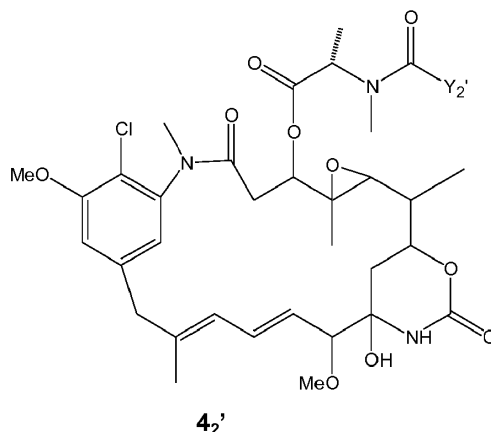
Un método para obtener un maitansinoide mediante el método de uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente, separar los diaestereoisómeros, si están presentes, y purificar el maitansinoide mediante HPLC en sílice unida con ciano;

35 Un método para obtener un conjugado de maitansinoide-agente de unión a célula que comprende obtener un maitansinoide purificado mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente y hacer reaccionar el maitansinoide purificado con un agente de unión a célula que comprende un grupo ditio o un grupo sulfhidrilo reactivo.

40 El método anteriormente descrito para obtener un conjugado de maitansinoide-agente de unión a célula, en donde el grupo ditio reactivo es un grupo ditiopiridilo o un grupo ditiopiridilo sustituido;

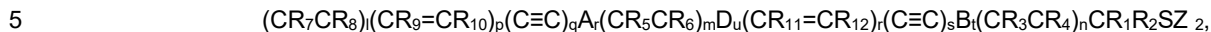
Un método para obtener un conjugado de maitansinoide-agente de unión a célula que comprende obtener un maitansinoide purificado mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente y hacer reaccionar el maitansinoide purificado con un agente de unión a célula que comprende un grupo maleimido o un grupo haloacetilo;

Un método de esterificación de maitansinol para proporcionar un maitansinoide de la fórmula **4₂'**:



en donde:

Y₂' representa



en donde:

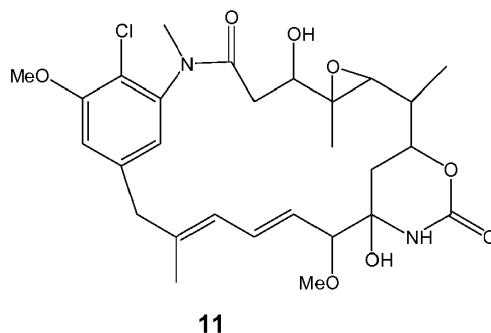
R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R₂ puede ser H;

10 A, B, y D cada uno independientemente es cicloalquilo o cicloalqueno que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

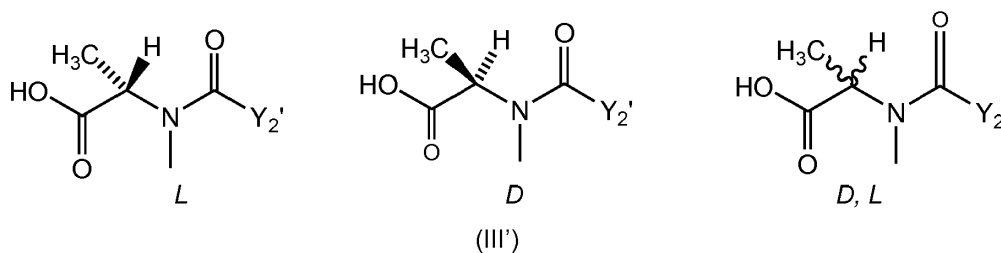
15 l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento; y

Z₂ 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 3-10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, comprendiendo dicho método hacer reaccionar maitansinol de la estructura **11** en la C-3:



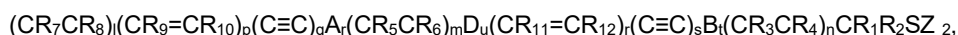
20

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



en donde:

Y_2 representa



5 en donde:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R_2 puede ser H;

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

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{11} , y R_{12} son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

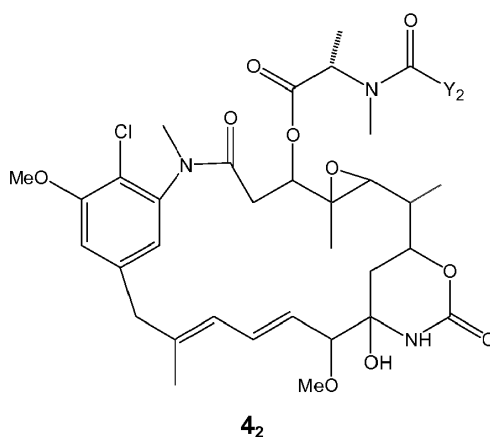
15 l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento; y

Z_2 es SR o -COR, en donde R es alquilo 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 un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático.

20 El método de esterificación de maitansinol para proporcionar un maitansinoide de la fórmula **42'**, en donde el compuesto de fórmula (I) se representa mediante la fórmula (I-L).

El método de esterificación de maitansinol para proporcionar un maitansinoide de la fórmula **42'**, en donde R_1 es H y R_2 es metilo.

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



25 en donde:

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

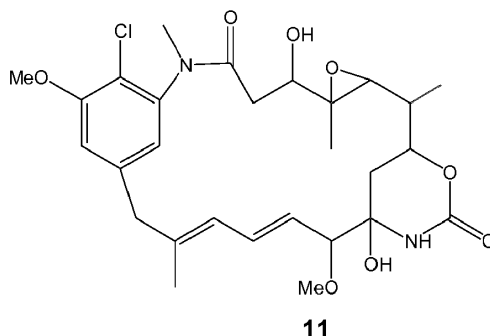
R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un radical

heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R_2 puede ser H;

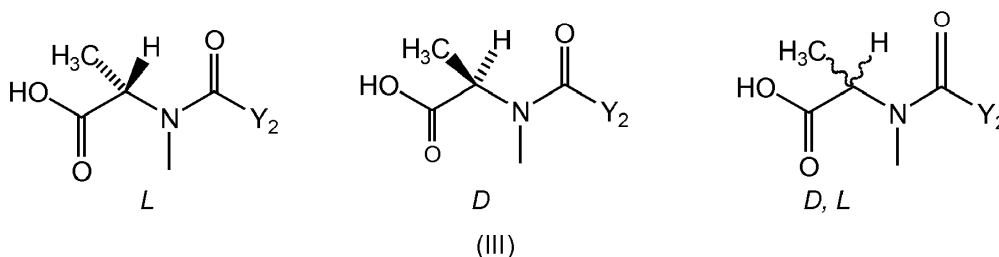
R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico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

5 I, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

Z_2 es SR o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, comprendiendo dicho método hacer reaccionar maitansinol de la estructura **11**:



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



en donde:

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

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

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

20 I, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

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

25 El método descrito anteriormente de esterificación de maitansinol para proporcionar el maitansinoide de fórmula **4a**, en donde El compuesto de fórmula (III) se representa mediante la fórmula (III-L);

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);

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

30 El método descrito antes de esterificación del maitansinol para dar maitansinoides de fórmula **4a**, en donde dicho compuesto de fórmula (III-D,L) es N-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva una

funcionalidad tiol protegida, en la que el carbono central que lleva el átomo de azufre es o bien racémico o de quiralidad R o S para dar los compuestos de la estructura de **15**;

El método descrito anteriormente de esterificación de maitansinol para proporcionar maitansinoides de fórmula **4a**, en donde la mezcla de **15a**(S,S) y **15b**(S,R) se obtiene mediante un proceso que comprende:

5 (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*-metil-L-alanina para dar la mezcla de compuestos **15a**(S,S) y **15b**(S,R);

10 El método descrito antes de esterificación del maitansinol, en donde dicho compuesto **15a**(S,S) se obtiene mediante un método 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 el compuesto **15a**(S,S).

15 El método descrito antes de esterificación del maitansinol, en donde dicho compuesto **15b**(S,R) se obtiene mediante un método 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 el compuesto **15b**(S,R);

20 El método descrito antes de esterificación del maitansinol para dar maitansinoides de fórmula **4a**, en donde la mezcla de compuestos **15**(R,S) y **15**(R,R) puede obtenerse mediante un proceso que comprende:

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

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

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

25 El método descrito anteriormente de esterificación de maitansinol para proporcionar 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 carbono central que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S, para dar los compuestos de estructura **15**, se obtiene mediante un procedimiento que comprende:

30 (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 carbono central que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad R o S para dar los compuestos de estructura **15**.

35 El método descrito antes de esterificación del maitansinol para dar maitansinoides de fórmula **4b**, en donde R₁ y R₂ son metilo; R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H; l y m son 1; y n es 0;

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*-metilalanina-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) es el compuesto **10** que contiene *N*-metil-D-alanina;

El método descrito anteriormente de esterificación de maitansinol para proporcionar 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 anteriormente de esterificación de maitansinol para proporcionar maitansinoides de fórmula **4b**, en donde el compuesto **10** contiene *N*-metil-L-alanina, *N*-metil-D-alanina o la *N*-metilalanina racémica, se obtiene mediante un procedimiento que comprende:

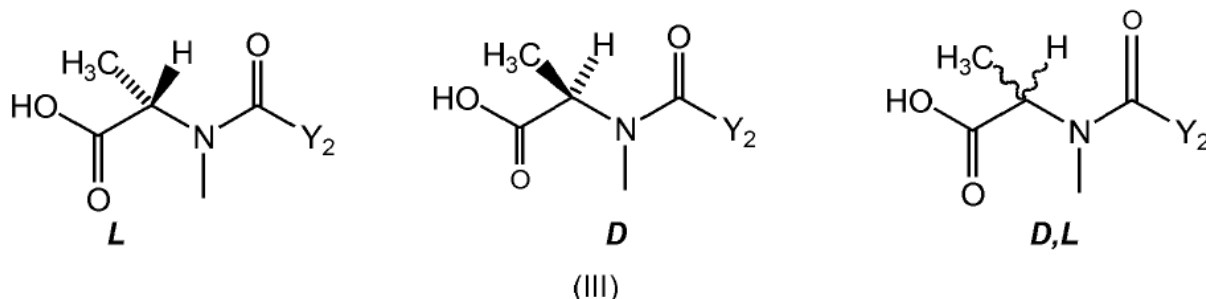
- (1) hacer reaccionar sulfuro de isobutileno (**5**) con el anión de acetonitrilo para dar el compuesto **6**;
- 5 (2) hidrolizar el compuesto **6** para dar el ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (**7**);
- (3) convertir el compuesto **7** en el disulfuro **8** por reacción con metanotiol-sulfonato 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, *N*-metil-D-alanina o *N*-metilalanina racémica para dar el compuesto **10** que contiene *N*-metil-L-alanina, *N*-metil-D-alanina o *N*-metilalanina racémica;
- 10 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 unida a ciano, que además comprende la reducción del enlace disulfuro, para dar maitansinoides de fórmula **4b**;

- 15 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 maitansinoides de fórmula **4b**, y hacer reaccionar el maitansinoide con un agente de unión a células que comprende un grupo sulfhidrilo o un grupo ditio reactivo, preferiblemente un grupo ditiopiridilo o un grupo ditiopiridilo sustituido;

- 20 Un método para obtener un conjugado de maitansinoide-agente de unión a célula que comprende obtener un maitansinoide purificado mediante cualquiera de los métodos anteriormente descritos de esterificación de maitansinol para proporcionar maitansinoides de fórmula **4b**, y hacer reaccionar el maitansinoide con un agente de unión a célula que comprende un grupo maleimido o un grupo haloacetilo.

Métodos de terapia que usan los conjugados anteriormente descritos

Compuestos de fórmula (III):



- 25 en donde:

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

R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , 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, fenilo, fenilo sustituido, o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R_2 puede ser H;

- 30 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

l , m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

- 35 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 un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático.

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

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

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

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

5 (3) convertir el compuesto **7** en el disulfuro **8** por 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, *N*-metil-D-alanina o *N*-metilalanina racémica para dar dicho compuesto **10** que contiene *N*-metil-L-alanina, *N*-metil-D-alanina o *N*-metilalanina racémica;

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

10 Un método para hacer una mezcla de compuestos **15a**(S,S) y **15b**(S,R), 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**); y

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

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

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

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

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

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

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

25 Un método para hacer la *N*-metilalanina acilada racémica con un grupo carboxílico que lleva un grupo funcional tiol protegido, en el que el carbono central 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**;

30 (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 carbono central 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);

35 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);

40 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);

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;

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

Un método para inducir la muerte celular en poblaciones de células seleccionadas, 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.

- 10 La invención para la que se busca protección se refiere a solo una parte de la presente divulgación, es decir uno conjugados de maitansinoide-agente de unión a célula como se define en las reivindicaciones 1-7, a composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados de maitansinoide-agente de unión a célula como se definen en la reivindicación 8, y los conjugados maitansinoide-agente de unión a célula para uso médico como se define en las reivindicaciones 9-14.

15 **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 divulgación.

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

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

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

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

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

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

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

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

- 35 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-DM1).

- 40 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.

45 **Descripción detallada de la invención y la divulgación adicional**

Esta divulgación describe nuevos maitansinoides que contienen disulfuro y tiol con impedimento estérico, en los que el átomo de carbono α que lleva el átomo de azufre lleva uno o dos sustituyentes alquilo. La divulgación 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 divulgación describe la preparación de conjugados de estos nuevos maitansinoides con agentes de unión a células.

La técnica pone de manifiesto que es extremadamente difícil modificar fármacos existentes sin disminuir su potencial citotóxico. La presente divulgación 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.

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 presente divulgación 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.

Por lo tanto, esta divulgación 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 presente divulgación 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 divulgación, 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.

Los maitansinoides que se pueden usar en la presente divulgación 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 y análogos del maitansinol. Ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones.

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

(1) decloro-C-19 (patente de EE.UU. No. 4,256,746) (preparado mediante reducción LAH de ansamitocina P2);

(2) hidroxí-C-20 (o demetilo-C-20) +/-decloro-C-19 (patentes de EE.UU. Nos. 4,361,650 y 4,307,016) (preparado mediante desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o decloración usando LAH); y

(3) demetoxi-C-20, aciloxi-C-20 (-OCOR), +/-decloro (patente de EE.UU. No. 4,294,757) (preparado mediante acilación usando cloruros de acilo).

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

(1) SH-C-9 (patente de EE.UU. No. 4,424,219) (preparado mediante la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅);

(2) alcóximetilo-C-14 (demetoxi/CH₂OR) (patente de EE.UU. No. 4,331,598);

(3) hidroximetilo-C-14 o aciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (patente de EE.UU. No. 4,450,254) (preparado a partir de *Nocardia*);

(4) hidroxí/aciloxi-C-15/(patente de EE.UU. No. 4,364,866) (preparado mediante la conversión de maitansinol mediante *Streptomyces*);

(5) metoxi-C-15 (patentes de EE.UU. Nos. 4,313,946 y 4,315,929) (aislado de *Trewia nudiflora*);

(6) N-demetilo-C-18 (patentes de EE.UU. Nos. 4,362,663 y 4,322,348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y

(7) 4,5-deoxi (patente de EE.UU. No. 4,371,533) (preparado mediante la reducción LAH /triclóruo de titanio de maitansinol).

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 esterasas. Son preferidos los enlaces disulfuro.

La descripción de la patente de EE.UU. n° 5.208.020 enseña la producción de maitansinoides que llevan dichos enlaces.

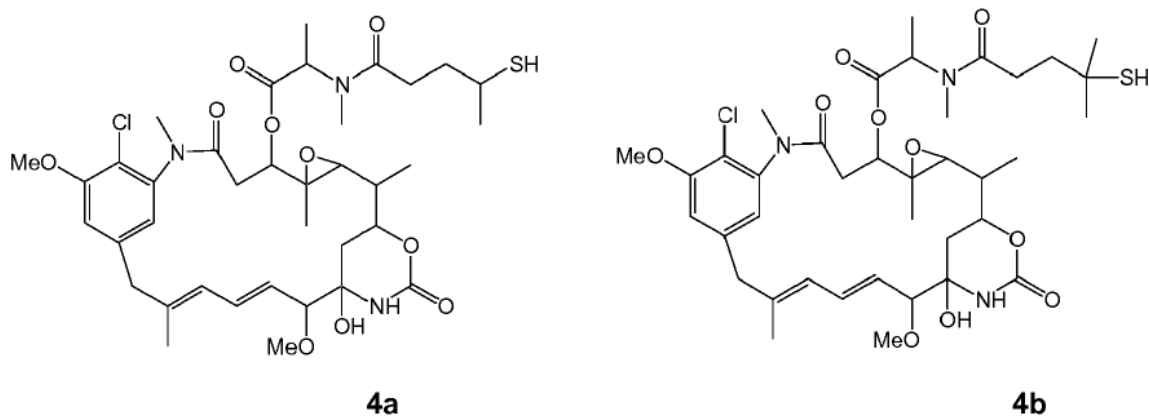
De acuerdo con la presente divulgación, el resto conector comprende un resto tiol o disulfuro con impedimento estérico.

Los maitansinoides particularmente preferidos que comprende un resto conector que contiene un grupo químico reactivo, son ésteres en C-3 del maitansinol y sus análogos donde el resto conector contiene un enlace tiol o disulfuro con impedimento estérico.

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

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 divulgación, así como pueden otros maitansinoides y otras posiciones de unión, como se ha descrito anteriormente.

Las estructuras de los diferentes maitansinoides de la presente divulgación 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*²-desacetil-*N*²-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (denominado DM3) y *N*²-desacetil-*N*²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (denominado DM4). DM3 (4a) y DM4 (4b) se representan mediante las siguientes fórmulas estructurales:



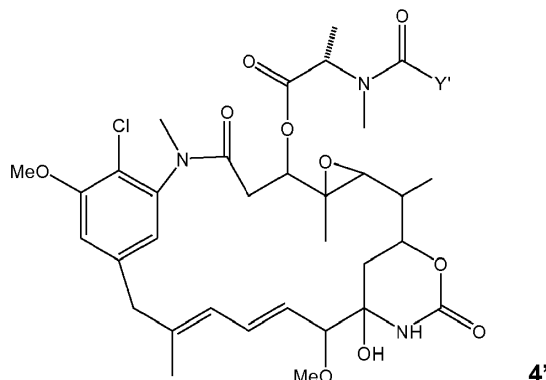
La citotoxicidad in vitro de los nuevos maitansinoides que contienen tiol y disulfuro con impedimento estérico de la presente divulgación, se pueden evaluar por su capacidad de suprimir la proliferación de diferentes líneas celulares no deseadas in vitro (figura 4). Por ejemplo, líneas celulares tales 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 CI₅₀ a partir de los resultados de los ensayos.

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

Los nuevos maitansinoides de la presente divulgación son aquellos que tienen, en C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15, o desmetilo C-20, una cadena lateral de aminoácido acilado con un grupo acilo que lleva un grupo sulfhidrido estéricamente impedido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que lleva el tiol tienen uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH₃, C₂H₅, 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

- 5 Preferiblemente, los compuestos maitansinoides se representan por la fórmula 4':



en donde:

Y' representa



- 10 en donde:

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

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

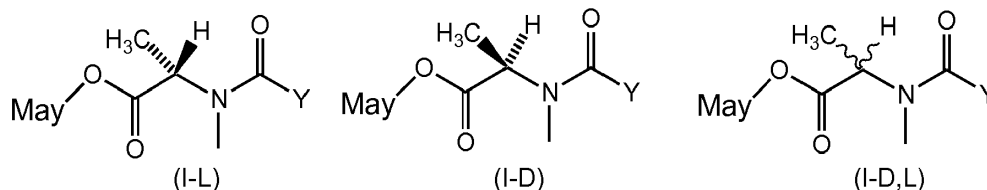
R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico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

- 20 l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento;

Z es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o 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 un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático.

- 25 En unas realizaciones preferidas del compuesto representado mediante la fórmula 4', R₁ es H, R₂ es metilo y Z es H; R₁ y R₂ son metilo y Z es H; R₁ es H, R₂ es metilo, y Z es -SCH₃; o R₁ y R₂ son metilo, y Z es -SCH₃.

Más preferiblemente, los maitansinoides son compuestos representados por la fórmula (I-L), (I-D), o (I-D,L):



en donde:

Y representa (CR₇CR₈)(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂SZ, en donde:

- 30 R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un radical

heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R_2 puede ser H;

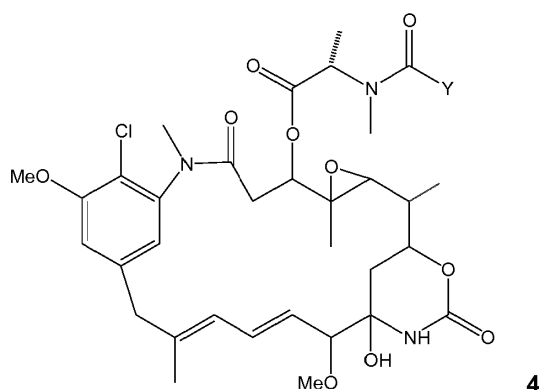
R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico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

5 I, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

Z es H, 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 un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático; y

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

Más preferido es el éster C-3, que es un compuesto representado por la fórmula 4:



en donde los sustituyentes son como se definen anteriormente.

15 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, I 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, I y m son 1, n es 0, y Z es H; aquellos compuestos en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H, I y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃; y aquellos compuestos R_1 y R_2 son metilo, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, I y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃. Además, se prefiere el estereoisómero L-alanina ya que el el más útil para los conjugados de la presente divulgación.

20 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 I 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, I 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, I y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃; 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, I y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

Los ejemplos de alquilos o alquenos 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 alquenos 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.

30 Los ejemplos de alquilos o alquenos cíclicos que tienen de 3 a 10 átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo 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.

35 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.

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.

- 5 Los ejemplos de radicales heteroalquilo incluyen dihidrofurilo, tetrahidrofurilo, tetrahidropirolilo, piperidinilo, piperazinilo y morfolino.

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

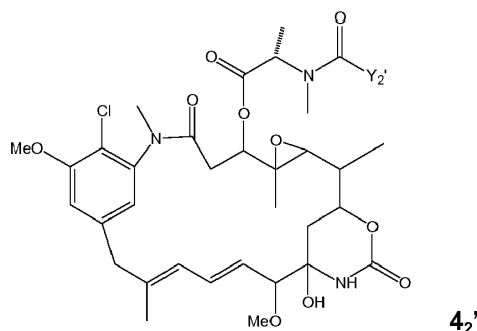
- 10 La figura 3a muestra las etapas de la síntesis del maitansinoide DM4 (**4b**). Se hace reaccionar el sulfuro de isobutileno (**5**) con el anión del acetonitrilo para dar el compuesto mercapto **6**. La hidrólisis del compuesto **6** con base proporcionó el ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (**7**). La conversión del compuesto **7** en el disulfuro **8** se lleva a cabo por reacción con metanotolsulfonato de metilo (MeSSO₂Me). 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 **4e** 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.

- 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 metanotolsulfonato 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.

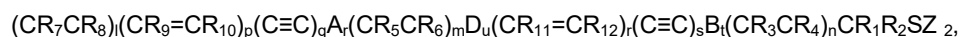
- 30 Las figuras 3c y d muestran la síntesis de DM3 que lleva el resto (*S*)-4-metilditio-1-oxopentilo o el resto (*R*)-4-metilditio-1-oxo-pentilo. La conversión del (*R*)-1,3-butanodiol (**16**) en su ditosilato **17**, seguido de reacción secuencial con cianuro de sodio y etil-xantato de potasio dio 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**.

- Así, la presente divulgación proporciona un método de esterificación de un maitansinoide en C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15, o desmetilo C-20, con una cadena lateral de aminoácido acilado donde el grupo acilo lleva un grupo sulfhidrilo protegido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que lleva la funcionalidad tiol protegida tienen uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre, comprendiendo dicho método hacer reaccionar un maitansinoide en C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15, o desmetilo C-20, comprendiendo dicho método hacer reaccionar un maitansinoide en C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15, o desmetilo C-20, con el aminoácido acilado donde el grupo acilo lleva un grupo sulfhidrilo protegido.

- 50 En una realización preferida, la presente divulgación proporciona un método de esterificación de maitansinol para proporcionar un maitansinoide de la fórmula **42'**: en donde:

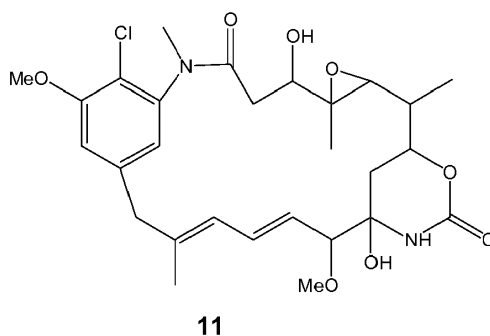


Y₂' representa

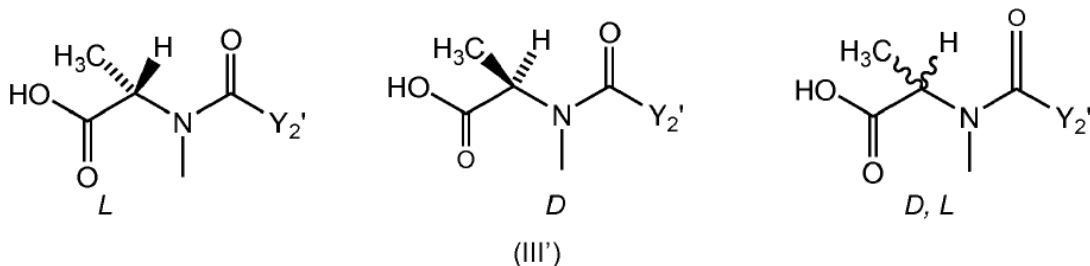


en donde:

- 5 R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R₂ puede ser H;
- A, B, y D cada uno independientemente es cicloalquilo o cicloalqueno que tiene de 3 -10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;
- 10 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;
- l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento; y
- 15 Z₂ 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 - 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, dicho método comprendiendo hacer reaccionar el maitansinol de la estructura 11 en la C-3:

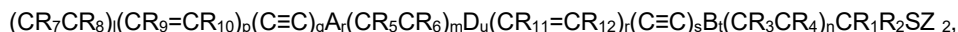


- 20 con un compuesto de fórmula (III'-L), (III'-D), o (III'-D, L):



en donde:

Y₂ representa



en donde:

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

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

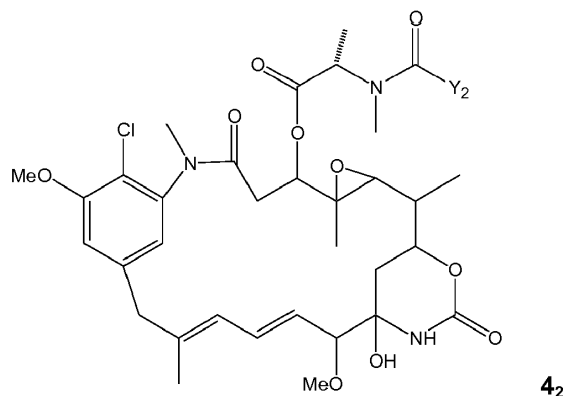
10 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico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

l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento; y

15 Z₂ es SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático.

Preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) se representa por la fórmula (I-L) y, también preferible, R₁ es H y R₂ es metilo.

20 En una realización más preferida, la presente divulgación proporciona un método de esterificación de maitansinol para proporcionar un maitansinoide de la fórmula 4₂:



en donde:

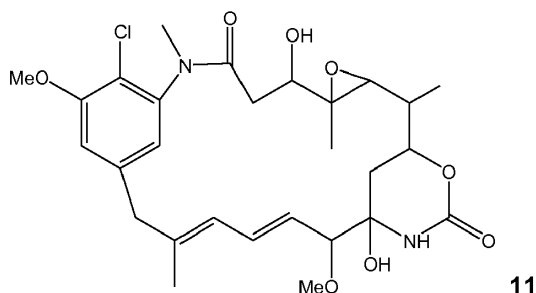
Y₂ representa (CR₇CR₈)_l(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂SZ₂, en donde:

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

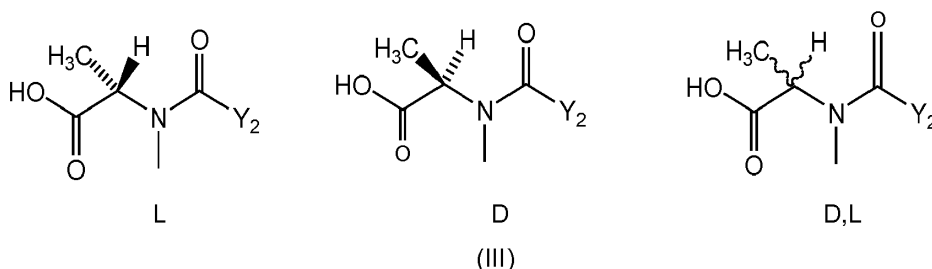
R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

30 l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

Z₂ es SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático; comprendiendo dicho método hacer reaccionar maitansinol de la estructura 11 en la C-3:



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



en donde:

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

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

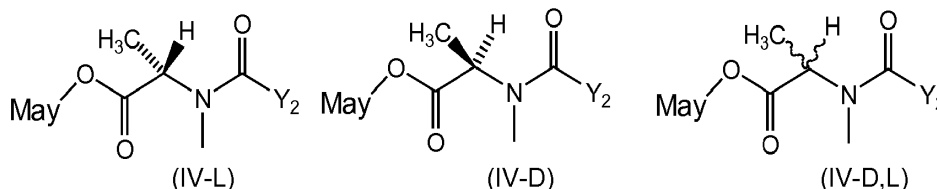
- 10 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico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

l , m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

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

Los diaestereoisómeros se pueden separar mediante HPLC en sílice unida a ciano.

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



- 20 en donde:

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

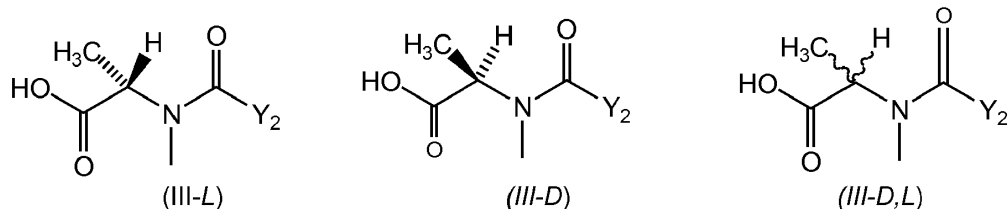
R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R_2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

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

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

Z₂ es SR o COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3-10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático; y

- 5 May es a maitansinoide; comprendiendo dicho método hacer reaccionar dicho may en C-3, hidroximetilo C-14, hidroxí C-15, o desmetilo C-20, con un compuesto de fórmula (III-L), (III-D), o (III-D,L):



34

en donde:

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

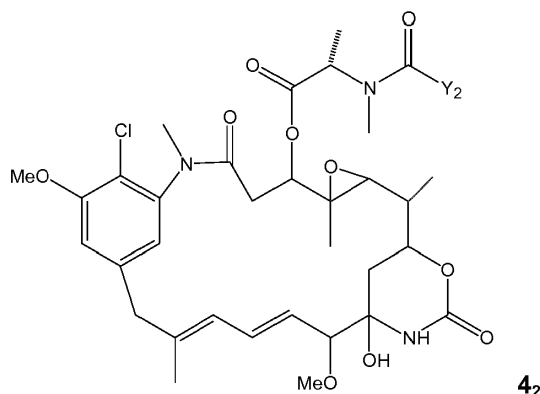
- 10 R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R₂ puede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

- 15 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

Z₂ es SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático.

- 20 En una realización incluso más preferida, la presente divulgación proporciona un método de esterificación de maitansinol para proporcionar un maitansinoide de la fórmula 4₂:



en donde:

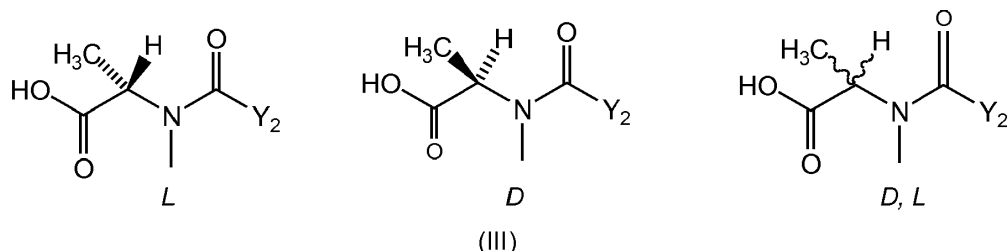
Y₂ representa (CR₇CR₈)(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂SZ₂, en donde:

- 25 R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R₂ puede ser H;

- 30 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

Z₂ 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 - 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, comprendiendo dicho método hacer reaccionar maitansinol en la C-3 con un compuesto de fórmula (III-L), (III-D), o (III-D,L):



en donde:

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

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

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

Z₂ 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 un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático.

Preferiblemente, el compuesto representado mediante la fórmula (I) es el estereoisómero L.

Para los métodos anteriormente, es preferido que R₁ sea H, R₂ sea metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, l y m sean cada uno 1, y n sea 0; o que R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ sean cada uno H, l y m sean 1, y n sea 0.

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); el compuesto de fórmula (III-D) es *N*-metil-D-alanina acilada con el grupo acilo racémico o con el grupo acilo que tiene o bien quiralidad R o S para dar los compuestos **15**; y El compuesto de fórmula (III-D,L) es *N*-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva un grupo funcional tiol protegido, en el que el carbono central 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 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*-metil-L-alanina para dar la mezcla de compuestos **15a**(S,S) y **15b**(S,R);

De forma similar, la mezcla de compuestos **15**(R,S) y **15**(R,R) puede obtenerse mediante un proceso que comprende:

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

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

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

La *N*-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva un grupo funcional tiol protegido, en el que el carbono central 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:

(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**;

5 (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 carbono central que lleva el átomo de azufre es racémico o de quiralidad *R* o *S*, para dar los compuestos de estructura **15**.

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

10 (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*).

15 Cuando se hace DM4, el compuesto de fórmula (III-L) es un compuesto **10** que contiene *N*-metil-L-alanina. El compuesto de fórmula (III-D) es el compuesto **10** que contiene *N*-metil-D-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, *N*-metil-D-alanina, o *N*-metilalanina racémica se obtiene mediante un procedimiento que comprende:

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

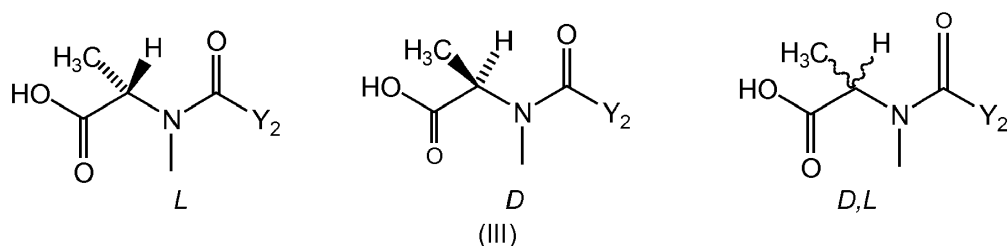
(2) hidrolizar el compuesto **6** para dar el ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (**7**);

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

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

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

De acuerdo con la presente divulgación, los compuestos de fórmula III también son nuevos:



en donde:

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

30 R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

35 I , m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

I , m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

Z_2 es SR o -COR, en donde R es alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de

carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático.

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

- 5 La citotoxicidad in vitro de los maitansinoides de la presente divulgación 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_{50} de $1,5 \times 10^{-11}$ M y $7,0 \times 10^{-12}$ M respectivamente. Igualmente, el maitansinoide **4e** también es muy potente con valores de CI_{50} de $3,2 \times 10^{-11}$ M y $9,0 \times 10^{-12}$ 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 divulgación, 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

- 15 La eficacia de los compuestos de la presente divulgación 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.

Los ejemplos más específicos de agentes de unión a células que se pueden usar incluyen:

- 20 anticuerpos policlonales;
anticuerpos monoclonales;
fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', y $F(ab')_2$, Fv (Parham, *J. Immunol.* 131:2895-2902 (1983); Spring et al. *J. Immunol.* 113:470-478 (1974); Nisonoff et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230-244 (1960));
- interferones (p. ej., alfa, beta, gamma);
25 linfoquinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;
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));
30 transferrina (O'Keefe et al., *J. Biol. Chem.* 260:932-937 (1985)); y
vitaminas, tales como folato.

- 35 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 mamíferos, 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).
40 Además, también se pueden usar anticuerpos recubiertos descritos en la patente de EE.UU. nº 5.639.641, así como anticuerpos humanizados.

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.

- 45 Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG₁ 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 IgG₁ 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. n° 5.552.293) se puede usar para tratar tumores que expresan CanAg, tales como cánceres colorrectal, pancreático y gástrico.

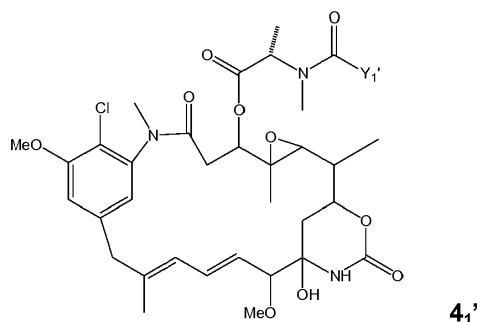
Además, el GM-CSF, que se une a células mieloides se puede usar como un agente de unión a células para células enfermas de leucemia mieloide aguda. La IL-2 que se une a linfocitos T activados se puede usar para prevenir el rechazo de injerto de trasplante, para tratamiento y prevención de enfermedades 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.

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 divulgación también proporciona un conjugado de maitansinoide-agente de unión a célula que comprende al menos un maitansinoide unido al agente de unión a célula, en donde el agente de unión a célula se une al maitansinoide usando la funcionalidad tiol o disulfuro que está presente en el grupo acilo de una cadena lateral de aminoácido acilada encontrada en C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15 o desmetilo C-20 del maitansinoide, y en donde el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácido acilado tiene su funcionalidad tiol o disulfuro en un átomo de carbono que tiene uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH₃, C₂H₅, 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

Un conjugado de agente de unión a célula preferido comprende al menos un maitansinoide unido a un agente de unión a célula, en donde el maitansinoide se representa mediante la fórmula 41':



en donde:

Y₁' representa



en donde:

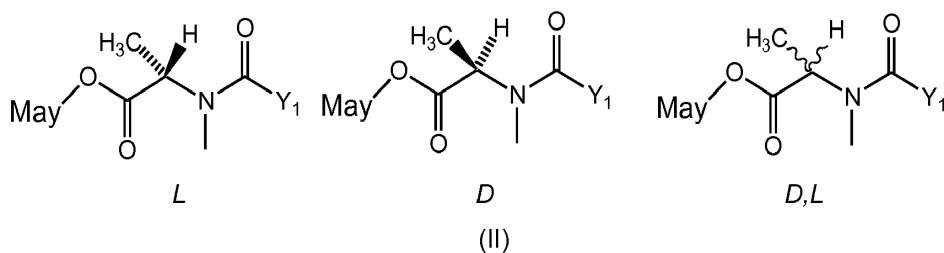
A, B, y D, cada uno independientemente es cicloalquilo o cicloalqueno que tiene 3-10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático; y

l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento.

Preferiblemente, R₁ es H y R₂ es metilo. o R₁ y R₂ son metilo.

Un conjugado de agente de unión a célula incluso más preferido comprende al menos un maitansinoide unido a un agente de unión a célula, en donde el maitansinoide se representa mediante la fórmula (II-L), (II-D), o (II-D,L):



en donde:

Y_1 representa $(CR_7CR_8)_l(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$, en donde:

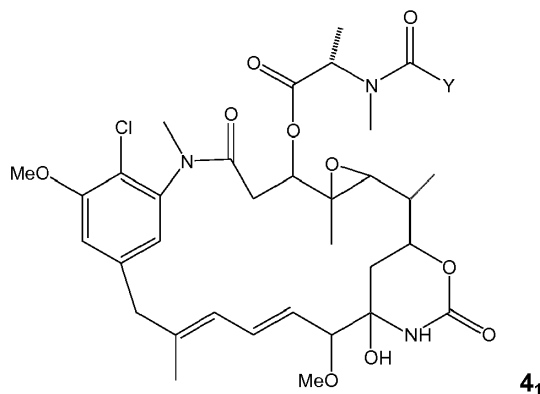
5 R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenoil lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenoil ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido, radical heterocíclico aromático o heterocicloalquilo, y además R_2 puede ser H;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenoil lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenoil ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

10 l , m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

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

Incluso más preferido la presente invención proporciona también un conjugado de maitansinoide-agente de unión a células, en donde el maitansinoide se representa por la fórmula 4₁:



15 en donde los sustituyentes son como se definen por la fórmula (II) anterior.

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

Además, se prefiere el estereoisómero *L*-aminoácido.

20 Los conjugados citotóxicos representativos de la presente divulgación 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.

25 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. Más específicamente (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 ditió o un sulfhidrido reactivo. Preferiblemente, el grupo ditió reactivo es un grupo ditiopiridilo o un grupo ditiopiridilo sustituido. En especial preferiblemente, el grupo ditió reactivo comprende un grupo nitropiridilditió o dinitropiridilditió.

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 presente divulgación, 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.

La potencia y especificidad de diana in vitro de los conjugados de anticuerpo-maitansinoide de la presente divulgación 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 divulgación 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 divulgación, con anticuerpos MY9-6 y anti-B4, respectivamente.

Se comparó la eficacia antitumoral in vivo de conjugados de anticuerpos con los maitansinoides que contienen tiol impedido de la presente divulgación, 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.

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.

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 MY9-6-DM4 produjeron retrasos del crecimiento tumoral mayores de 20 días.

- 5 En el cuarto modelo (figura 11), se comparó directamente un maitansinoide de la presente divulgación (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 divulgación, 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.

En el quinto modelo (figura 13a), un conjugado de un maitansinoide de la presente divulgación 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).

- 15 Los resultados de los cinco experimentos de eficacia anteriores demuestran que los maitansinoides que contienen tiol con impedimento estérico de la presente divulgación, 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

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

La presente divulgación también proporciona métodos de tratamiento que comprenden administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad eficaz de cualquiera de los conjugados descritos anteriormente.

- 25 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 divulgación, o una de sus sales o solvatos. Las células diana son células a las que se pueden unir los agentes de unión a células.

- 30 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.

- 35 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.

- 40 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.

- 45 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 presente divulgación, las concentraciones están en el intervalo de 10 μ 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 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.

Para uso in vivo clínico, el agente citotóxico de la presente divulgación 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 µg 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 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.

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.

EJEMPLOS

La presente divulgación ahora se ilustrará por referencia a ejemplos no limitantes. Salvo que se exponga lo contrario, todos los porcentajes, proporciones, partes etc. son en peso. Los ejemplos descritos anteriormente son para los compuestos donde R₁ es H o CH₃, R₂ es CH₃, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, I y m son cada uno 1, y n es 0. La síntesis similar puede realizarse para otros compuestos de la presente divulgación donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, o alquilo, alqueno superior que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, o fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático; y donde l, m y n son cada uno números enteros de 1 a 5, y además, n también puede ser 0.

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 ¹H) 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 (Ejemplo de Referencia)

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 Na₂SO₄ 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 ¹H (CDCl₃): 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 metanotolsulfonato 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 ¹H (CDCl₃): δ 1,54 (6H, s), 2,15-2,21 (2H, m), 2,64 (3H, s), 2,69-2,72 (2H, m). MS (M + Na⁺) calc.: 217,0, encontrado: 217,1

4-Metil-4-(metilditio)pentanoato de N-hidroxisuccinimida (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 hidrocloreuro 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 Na₂SO₄ 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 ¹H (CDCl₃): δ 1,30 (6H, s), 2,00-2,05 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,68-2,72 (2H, m), 2,73-2,83 (4H, m). MS (M + Na⁺) calc.: 314,0, encontrado: 314,1

N-metil-N-(4-metil-4-metilditio-1-oxopentil)-L-alanina (10): 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 enérgicamente 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 Na₂SO₄ 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 ¹H (CDCl₃): δ 1,32 (6H, s), 1,42 (3H, d, J = 7 Hz), 1,90-1,97 (2H, m), 2,40 (3H, s), 2,42-2,49 (2H, m), 2,9 (3H, s), 5,15 (1H, q, J = 7 Hz). MS (M + Na⁺) calc.: 302,1, encontrado: 302,0.

N²-Desacetil-N²-(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 diciclohexilcarbodiimida (DCC, 57,1 mg, 0,277 mmol) en 0,67 ml de diclorometano. Después de 1 min se añadió una solución de ZnCl₂ 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 ¹H (CDCl₃): δ 0,80 (3H, s), 1,28-1,36 (13H, m), 1,42-1,46 (2H, m), 1,53-1,63 (2H, m), 1,64 (3H, s), 1,75-1,85 (1H, m), 1,90-2,10 (1H, m), 2,18 (1H, dd, J=3 Hz y 14 Hz), 2,31 (3H, s), 2,40-2,49 (1H, m), 2,50-2,65 (1H, m), 2,85 (3H, s), 3,04 (1H, d, J=9 Hz), 3,11 (1H, d, J=11 Hz), 3,23 (3H, s), 3,35 (3H, s), 3,49 (1H, d, J=9 Hz), 3,63 (1H, d, J=12 Hz), 3,98 (3H, s), 4,27 (1H, t, J=10 Hz), 4,79 (1H, dd, J=3 Hz y 12 Hz), 5,41 (1H, q, J=7 Hz), 5,66 (1H, dd, J=9 Hz y 15 Hz), 6,21 (1H, s), 6,42 (1H, dd, J=11 Hz y 15 Hz), 6,65 (1H, d, J=1,5 Hz), 6,73 (1H, d, J=11 Hz), 6,81 (1H, d, J=1,5 Hz). MS de alta resolución (M + H⁺) calc.: 826,3174, encontrado: 826,3150.

N²-Desacetil-N²-(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 ditiotreitól (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 ¹H (CDCl₃): δ 0,80 (3H, s), 1,19-1,23 (1H, m), 1,28-1,36 (12H, m), 1,42-1,46 (2H, m), 1,53-1,63 (2H, m), 1,64 (3H, s), 1,75-1,85 (1H, m), 1,90-2,10 (1H, m), 2,18 (1H, dd, J=3 Hz y 14 Hz), 2,40-2,49 (1H, m), 2,50-2,65 (2H, m), 2,88 (3H, s), 3,04 (1H, d, J=9 Hz), 3,11 (1H, d, J=11 Hz), 3,23 (3H, s), 3,35 (3H, s), 3,49 (1H, d, J=9 Hz), 3,63 (1H, d, J=12 Hz), 3,98 (3H, s), 4,27 (1H, t, J=10 Hz), 4,79 (1H, dd, J=3 Hz y 12 Hz), 5,41 (1H, q, J=7 Hz), 5,66 (1H, dd J=9 Hz y 15 Hz), 6,21 (1H, s), 6,42 (1H, dd, J=11 Hz y 15 Hz), 6,65 (1H, d, J=1,5 Hz), 6,73 (1H, d, J=11 Hz), 6,81 (1H, d, J=1,5 Hz). MS de alta resolución (M + Na⁺) calc.: 802,3101, encontrado: 802,3116.

Ejemplo 2 (Ejemplo de Referencia)

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 metanotiol sulfonato 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 metanotiol sulfonato 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 orgánicas 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 ¹H δ 1,36 (3H, d, J = 7 Hz), 1,84-1,95 (H, m), 1,85-2,56 (1H, m), 2,42 (3H, s), 2,53 (2H, t, J = 7 Hz), 2,85-2,95 (1H, m), MS (M + Na⁺) calc.: 203,3, encontrado: 203,2.

4-Metilditio-pentanoato de N-hidroxisuccinimido (14): Se disolvió ácido 4-metilditio-pentanoico (**13**, 0,75 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 hidrócloruro 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 Na₂SO₄ 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 ¹H δ 1,48 (3H, d, J = 7), 2,06 (1H, m), 2,17 (1H, m), 2,55 (3H, s), 2,93 (2H, t, J = 7), 2,98 (4H, s), 3,15 (1H, m). MS (M + Na⁺) calc.: 304,1, encontrado: 304,0.

N-Metil-N-(4-metilditio-1-oxopentil)-L-alanina (15): 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 equipada 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 Na₂SO₄ 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 ¹H δ 1,35 (3H, d, J = 7), 1,41

(3H,d,J = 7), 1,94-2,03 (2H,m), 2,43(3H,s), 2,50-2,55 (2H,m), 2,83-2,93 (1H,m), 2,98 (3H,s), 5,14(1H, q, J= 7). MS (M + Na⁺) calc.: 288,1, encontrado: 288,1.

N²-Desacetil-N²-(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 diciclohexilcarbodiimida (DCC, 57,1 mg, 0,277 mmol) en 0,67 ml de diclorometano. Después de 1 min, se añadió una solución de ZnCl₂ 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 DiazemTM 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 ¹H (CDCl₃): δ 0,80 (3H, s), 1,19-1,23 (1H,m), 1,28-1,36 (9H, m), 1,42-1,46 (1H, m), 1,53-1,63 (2H, m), 1,64 (3H, s), 1,80-1,89 (1H, m), 1,90-2,09 (1H, m), 2,18 (1H, dd, J=3 Hz y 14 Hz), 2,32 (3H, s), 2,33-2,42 (1H, m), 2,49-2,62 (2H, m), 2,88 (3H, s), 3,04 (1H, d, J=9 Hz), 3,11 (1H, d, J=11 Hz), 3,23 (3H,s), 3,35 (3H,s), 3,49 (1H, d, J=9 Hz), 3,63 (1H, d, J=12 Hz), 3,98 (3H, s), 4,27 (1H, t, J=10 Hz), 4,79 (1H, dd, J=3 Hz y 12 Hz), 5,41 (1H, q, J=7 Hz), 5,66 (1H, dd J=9 Hz y 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.

N²-Desacetil-N²-(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 ditiotretol (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 DiazemTM 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 ¹H (CDCl₃): δ 0,80 (3H, s), 1,19-1,23 (1H,m), 1,28-1,36 (9H, m), 1,42-1,46 (1H, m), 1,53-1,63 (2H, m), 1,64 (3H, s), 1,80-1,89 (1H, m), 1,90-2,09 (1H, m), 2,18 (1H, dd, J=3 Hz y 14 Hz), 2,33-2,42 (1H, m), 2,49-2,62 (2H, m), 2,88 (3H, s), 3,04 (1H, d, J=9 Hz), 3,11 (1H, d, J=11 Hz), 3,23 (3H, s), 3,35 (3H, s), 3,49 (1H, d, J=9 Hz), 3,63 (1H, d, J=12 Hz), 3,98 (3H, s), 4,27 (1H, t, J=10 Hz), 4,79 (1H, dd, J=3 Hz y 12 Hz), 5,41 (1H, q, J=7 Hz), 5,66 (1H, dd J=9 Hz y 15 Hz), 6,21 (1H, s), 6,42 (1H, dd, J=11 Hz y 15 Hz), 6,65 (1H, d, J=1,5 Hz), 6,73 (1H, d, J=11 Hz), 6,81 (1H, d, J=1,5 Hz). MS: (M + Na⁺) calc.: 788,3, encontrado: 788,3.

EJEMPLO 3 (Ejemplo de Referencia)

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 NaHCO₃ 0,1 M, seguido de solución saturada de NaCl. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, 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 ¹H (CDCl₃) 7,76 (dd, 4H, J = 1,0, 8,0 Hz), 7,35 (dt, 4H, J = 0,4, 8,0 + 8,0 Hz), 4,70 (m, 1H), 4,03 (m, 1H), 3,94 (m, 1H), 2,46 (s, 6H), 1,92 (m, 2H), 1,26 (d, 3H, J = 6,3 Hz); RMN ¹³C 145,17, 133,00, 130,11, 128,12, 127,91, 76,28, 66,21, 36,08, 21,86, 21,06; MS: 420,99 (M + Na)⁺, 421,93 (M+1+Na)⁺.

S-4-O-Etilxántico-pentanonitrilo (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 NaH₂PO₄ 1,0 M frío a pH 7,5, agua y NaH₂PO₄ 1,0 M a pH 4,0. La capa orgánica se separó y se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó para dar 2,63 g de R-3-O-p-toluenosulfonil-pentanonitrilo bruto. MS 275,80 (M + Na)⁺, 276,75 (M + 1 + Na)⁺. El producto se usó directamente sin más purificación.

A la solución de R-3-O-p-toluenosulfonil-pentanonitrilo 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 ^1H (CDCl_3) 4,67 (dd, 2H, $J = 7,1, 14,2$ Hz), 3,86 (ddd, 1H, $J = 7,0, 14,0, 21,9$ Hz), 2,50 (t, 2H $J = 7,3 + 7,6$ Hz), 2,06 (m, 2H), 1,44 (m, 6H); RMN ^{13}C 213,04, 119,16, 70,28, 44,57, 32,10, 20,20, 15,21, 13,93; MS: 226,51 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$, 242,51 ($\text{M} + \text{K}$) $^+$.

- 5 **Ácido S-(+)-4-metilditio-pentanoico (19)**: A una solución de S-4-O-etilxántico-pentanonitrilo (**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_3PO_4 hasta pH 2,5 ~ 3,0 y se extrajo con EtOAc (6 x 75 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO_4 , 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.

- 10 A una solución del ácido S-4-mercaptopentanoico bruto (1,2 g) en una mezcla de etanol (50 ml) y NaH_2PO_3 0,5 M, pH 7,0 (75 ml), se añadió gota a gota metanotiosulfonato 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_3PO_4 hasta pH 2,5 ~ 3,0 y se extrajo con EtOAc (4 x 100 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO_4 , 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 ^1H (CDCl_3) 2,91 (ddd, 1H, $J = 6,8, 13,7, 20,5$ Hz), 2,53 (t, 2H, $J = 7,7 + 7,4$ Hz), 2,42 (s, 3H), 1,94 (m, 2H), 1,36 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz); RMN ^{13}C 179,18, 45,35, 31,58, 30,73, 24,70, 21,05; MS: 202,92 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$, 203,91 ($\text{M} + 1 + \text{Na}$) $^+$; $[\alpha] = 41,35$ ($c = 2, \text{CH}_3\text{OH}$).

- 15 **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 ^1H δ 1,36 (3H, d, $J = 7$), 1,42 (3H, d, $J = 7$), 1,93-1,98 (2H, m), 2,40 (3H, s), 2,50-2,53 (2H, m), 2,90-2,95 (1H, m), 2,99 (3H, s), 5,14 (1H, q, $J = 7$), MS: ($\text{M} + \text{Na}$) calc.: 288,1, encontrado: 288,1

- 20 **N²-Desacetil-N²-(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 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$. El pico para el otro isómero **4h** (R,S) se separó bien y eluyó a 34,6 min. MS: m/z 834,2 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.

EJEMPLO 4 (Ejemplo de Referencia)

- 35 **Síntesis del maitansinoide 4k,l (FIG. 3d)**

- 40 **S-1,3-Di-O-p-toluenosulfonil-butano 22**: Una solución de S-(-)-1,3-butanodiol (21,200 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_3 0,1 M y solución saturada de NaCl. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO_4 , 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**. $R_f = 0,40$ (EtOAc/hexano 1:1); RMN ^1H (CDCl_3) 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 ^{13}C 145,17, 133,00, 130,11, 128,12, 127,91, 76,28, 66,21, 36,08, 21,86, 21,06; MS: 420,99 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.

- 45 **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_2PO_4 1,0 M frío a pH 7,5, agua, NaH_2PO_4 1,0 M a pH 4,0. La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , 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.

- 50 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**. $R_f = 0,40$ (EtAc/hexano 1:4). RMN ^1H (CDCl_3) 4,67 (dd, 2H, $J = 7,1, 14,2$ Hz), 3,86 (ddd, 1H, $J = 7,0, 14,0, 21,9$ Hz), 2,50 (t, 2H $J = 7,3 + 7,6$ Hz), 2,06 (m, 2H), 1,44 (m, 6H); RMN ^{13}C 213,04, 119,16, 70,28, 44,57, 32,10, 20,20, 15,21, 13,93; MS: 226,51 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$, 242,51 ($\text{M} + \text{K}$) $^+$.

Ácido *R*-(-)-4-metilditio-pentanoico (24): Una solución de *R*-4-O-etilxantico-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 H₃PO₄ hasta pH 2,5 ~ 3,0 y se extrajo con EtOAc (6 x 75 ml). Las

capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, 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 NaH₂PO₄ 0,5 M, a pH 7,0 (75 ml), se añadió gota a gota metanotiosulfonato 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 H₃PO₄ hasta pH 2,5 ~ 3,0 y se extrajo con EtOAc (4 x 100 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, 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*_f = 0,32 (HOAc/EtOAc/hexano 1:100:400); RMN ¹H (CDCl₃) 2,91 (ddd, 1H, *J* = 6,8, 13,7, 20,4 Hz), 2,53 (t, 2H, *J* = 7,7 + 7,4 Hz), 2,42 (s, 3H), 1,96 (m, 2H), 1,36 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz); RMN ¹³C 179,46, 45,67, 31,91, 31,07, 25,02, 21,36; MS: 202,9 (M+Na)⁺, 203,9 (M+1+Na)⁺; [α] = -39,16 (c = 2, CH₃OH).

***N*-Metil-*N*-[4-(*R*)-metilditio-1-oxopentil]-*S*-alanina (15b):** 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*²-Desacetil-*N*²-(4-(*R*)-metilditio-1-oxopentil)maitansina (DM3-SMe, 4k,l):** 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 (**4l**, *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)⁺. 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)⁺.

EJEMPLO 5a (Ejemplo de Referencia)

Citotoxicidad in vitro de maitansinoides y conjugados de anticuerpo-maitansinoide

La línea celular KB (ATCC CCL-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 CO₂ 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 divulgación 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 CI₅₀ en el intervalo de 7 x 10⁻¹² M a 2,5 x 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 divulgación 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 divulgación 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_{50} 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 divulgación 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 $\epsilon_{280nm} = 217.560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

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 $\epsilon_{280nm} = 217.560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{252nm} = 80.062 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; para DM3 o DM4, $\epsilon_{280nm} = 5.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{252nm} = 26.790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). 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 (Ejemplo de Referencia)

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 $\epsilon_{280nm} = 217.560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

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 $\epsilon_{280nm} = 217.560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{252nm} = 80.062 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; para DM3 o DM4, $\epsilon_{280nm} = 5.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{252nm} = 26.790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). 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

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

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 $\epsilon_{280nm} = 217.560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

EJEMPLO 6 (Ejemplo de Referencia)

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 mm³. Los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (5 animales por grupo). El primer grupo recibió el conjugado huC242-DM1 (DM1 dosis

de 75 µg/kg, una vez al día x 5) administrado por vía intravenosa. El segundo grupo recibió el conjugado huC242-DM3 (DM3 dosis de 75 µg/kg, una vez al día x 5) administrado por vía intravenosa. El tercero recibió el conjugado huC242-DM4 (DM4 dosis de 75 µg/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 mm³ 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 divulgación eran significativamente más eficaces y prolongaron el retraso del crecimiento tumoral a 28 días y 36 días, respectivamente.

EJEMPLO 7 (Ejemplo de Referencia)

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 x 10⁶ células/ratón) en 0,1 ml de medio exento de suero. Los tumores se desarrollaron durante 11 días hasta un tamaño medio de 100 mm³. Los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (5 animales por grupo). El primer grupo recibió el conjugado huC242-DM1 (DM1 dosis de 75 µg/kg, una vez al día x 5) administrado por vía intravenosa. El segundo grupo recibió el conjugado huC242-DM3 (DM3 dosis de 75 µg/kg, una vez al día x 5) administrado por vía intravenosa. El tercer grupo recibió el conjugado huC242-DM4 (DM4 dosis de 75 µg/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 mm³ 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 divulgación 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 divulgación era incluso más eficaz, produciendo curas de todos los animales tratados.

EJEMPLO 8 (Ejemplo de Referencia)

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 x 10⁶ células/ratón) en 0,1 ml de medio exento de suero. Los tumores se desarrollaron durante 12 días hasta un tamaño medio de 100 mm³. 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 µg/kg, una vez al día x 5) administrado por vía intravenosa. El segundo grupo recibió el conjugado MY9-6-DM3 (DM3 dosis de 200 µg/kg, una vez al día x 5) administrado por vía intravenosa. El tercer grupo recibió el conjugado MY9-6-DM4 (DM4 dosis de 200 µg/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 mm³ 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 divulgación 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 mg/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 mM, pH 6,5, que contenía ácido etilendiaminotetraacético 2 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 nm. El anticuerpo modificado se diluyó a 4,9 mg/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 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 μg de DM4 en el conjugado, que corresponde a una dosis de anticuerpo de aproximadamente $67 \mu\text{g}$ por μg 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).

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

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

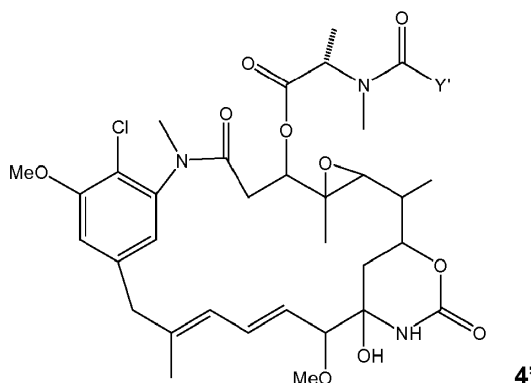
Eficacia in vivo del conjugado huB4-DM4 contra xenoinjertos de tumores humanos Ramos en ratones SCID

La eficacia de huB-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 mm³. 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 µg de DM4 en el conjugado, que corresponde a una dosis de anticuerpo de aproximadamente 44 µg por µg 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 µg/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 mg/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.

La presente divulgación se puede además entender son relación a las siguientes cláusulas no limitantes:

1. Un maitansinoide que tiene, en C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15, o desmetilo C-20, una cadena lateral de aminoácido acilado con un grupo acilo que lleva un grupo sulfhidrilo estéricamente impedido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que lleva la funcionalidad tiol tiene uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

2. Un compuesto representado por la fórmula 4':



en donde:

Y' representa



en donde:

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

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

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

l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento;

Z es H, SR o -COR, en donde R es alquilo o 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 un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático.

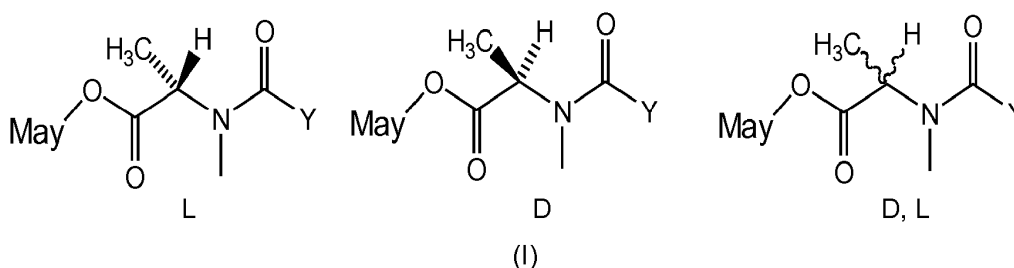
3. El compuesto de la cláusula 2, en donde R₁ es H, R₂ es metilo y Z es H.

4. El compuesto de la cláusula 2, en donde R₁ y R₂ son metilo y Z es H.

5. El compuesto de la cláusula 2, en donde R₁ es H, R₂ es metilo, y Z es -SCH₃.

6. El compuesto de la cláusula 2, en donde R₁ y R₂ son metilo y Z es -SCH₃.

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



en donde:

Y representa (CR₇CR₈)_l(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂SZ, en donde:

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

R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

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

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

8. El compuesto de la cláusula 7, en donde R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es H.

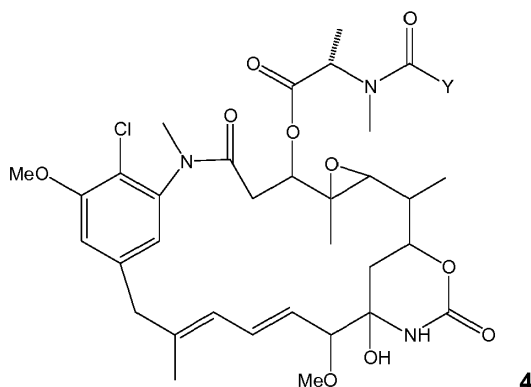
9. El compuesto de la cláusula 7, en donde R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es H.

10. El compuesto de la cláusula 7, en donde R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇, y R₈ son cada uno H, l y m son cada uno 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

11. El compuesto de la cláusula 7, en donde R₁ y R₂ son metilo, R₅, R₆, R₇, R₈ son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es -SCH₃.

12. El compuesto de una cualquiera de las cláusulas 1 a 11 o 12, en donde el compuesto se representa mediante la fórmula (I-L).

13. Un compuesto representado por la fórmula 4:



en donde:

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

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

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

10 l , m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

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

15 14. El compuesto de la cláusula 13, 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.

15. El compuesto de la cláusula 13, 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 H.

16. El compuesto de la cláusula 13, 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 $-SCH_3$.

20 17. El compuesto de la cláusula 13, en donde R_1 y R_2 son metilo; R_5 , R_6 , R_7 , R_8 son cada uno H, l y m son 1, n es 0, y Z es $-SCH_3$.

25 18. Un conjugado maitansinoide-agente de unión a célula que comprende al menos un maitansinoide unido a un agente de unión a célula, en donde el agente de unión a célula se une al maitansinoide usando la funcionalidad tiol o disulfuro que está presente en el grupo acilo de una cadena lateral de aminoácido acilada encontrada en C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15 o desmetilo C-20 del maitansinoide, y en donde el grupo acilo de la cadena lateral de aminoácido acilada tiene su funcionalidad tiol o disulfuro localizada en un átomo de carbono que tiene uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una longitud de cadena de la menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre.

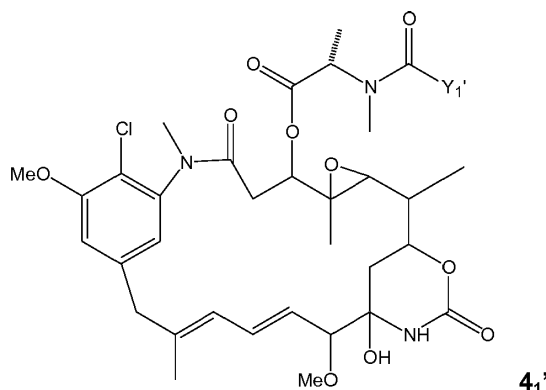
19. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 18, en donde el agente de unión a célula comprende al menos un sitio de unión de un anticuerpo.

35 20. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 19, en donde el anticuerpo es MY9, anti-B4 o C242.

21. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 19, en donde el anticuerpo es MY9 humanizado o recubierto, anti-B4 humanizado o recubierto, o C242 humanizado o recubierto.

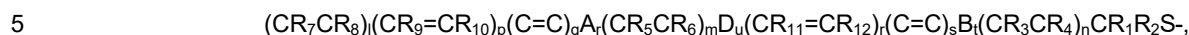
22. Un conjugado maitansinoide-agente de unión a célula, en donde el maitansinoide se representa mediante la

fórmula 41':



en donde:

Y₁' representa



en donde:

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

10 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, y R₁₂ son cada uno independientemente H, CH₃, C₂H₅, 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático; y

l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento.

23. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 22, en donde R₁ es H y R₂ es metilo.

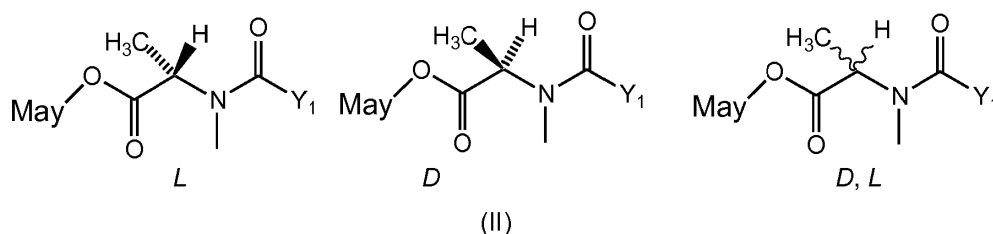
15 24. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 22, en donde R₁ y R₂ son metilo.

25. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de una cualquiera de las cláusulas 22, 23 o 24, en donde el agente de unión a célula comprende al menos un sitio de unión de un anticuerpo.

26. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 25, en donde el anticuerpo es MY9, anti-B4 o C242.

20 27. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 25, en donde el anticuerpo es MY4 humanizado o recubierto, anti-B4 humanizado o recubierto, o C242 humanizado o recubierto.

28. Un conjugado maitansinoide-agente de unión a célula que comprende al menos un maitansinoide unido a el agente de unión a célula, en donde el maitansinoide se representa mediante la fórmula (II-L), (II-D) o (II-D, L):



25 en donde:

Y₁ representa (CR₇CR₈)_l(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂S-, en donde:

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

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

, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

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

29. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 28, en donde R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H; l y m son cada uno 1; n es 0.

10 30. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 28, en donde R₁ y R₂ son metilo; R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H; l y m son 1; n es 0.

31. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 28, en donde el maitansinoide se representa mediante la fórmula (II-L).

32. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 29, en donde el maitansinoide se representa mediante la fórmula (II-L).

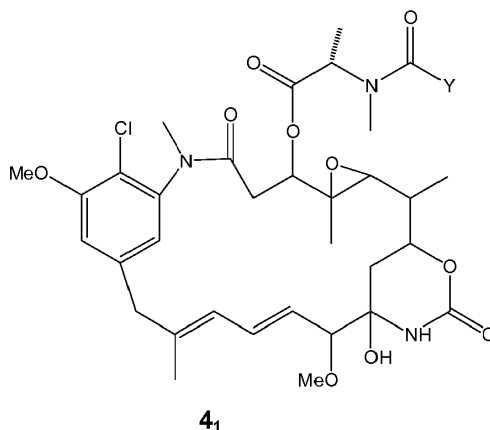
15 33. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 30, en donde el maitansinoide se representa mediante la fórmula (II-L).

34. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de una cualquiera de las cláusulas 28 a 32 o 33, en donde el agente de unión a célula comprende al menos un sitio de unión de un anticuerpo.

20 35. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 34, en donde el anticuerpo es MY9, anti-B4 o C242.

36. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 34, en donde el anticuerpo es MY9 humanizado o recubierto, anti-B4 humanizado o recubierto, o C242 humanizado o recubierto.

37. Un conjugado maitansinoide-agente de unión a célula, en donde el maitansinoide se representa mediante la fórmula 4₁:



25

en donde:

Y₁ representa (CR₇CR₈)(CR₅CR₆)_m(CR₃CR₄)_nCR₁R₂S-, en donde:

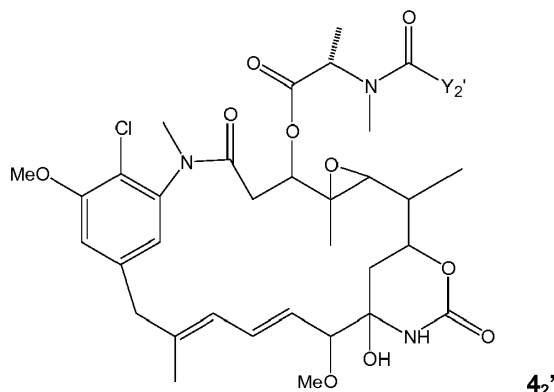
30 R₁ y R₂ son cada uno independientemente CH₃, C₂H₅, alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R₂ puede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

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

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0.

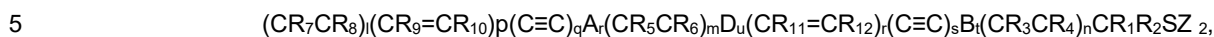
38. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 37, en donde R₁ es H, R₂ es metilo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H; l y m son cada uno 1; y n es 0.
39. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 37, en donde R₁ y R₂ son metilo; R₅, R₆, R₇ y R₈ son cada uno H; l y m son 1; y n es 0.
- 5 40. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de una cualquiera de las cláusulas 37, 38 o 39, en donde el agente de unión a célula comprende al menos un sitio de unión de un anticuerpo.
41. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 40, en donde el anticuerpo es MY9, anti-B4 o C242.
42. El conjugado maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 40, en donde el anticuerpo es MY9 humanizado o recubierto, anti-B4 humanizado o recubierto, o C242 humanizado o recubierto.
- 10 43. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un maitansinoide-agente de unión a célula de una cualquiera de las cláusulas 18 a 24, 28 a 33, 37, 38 o 39, una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
44. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 25, una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 45. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 26, una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 46. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 27, una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
47. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 34, una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 48. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 35, una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
49. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 36, una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 50. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 40, una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
51. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 41, una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 52. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de unión a célula de la cláusula 42, una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 40 53. Un método de esterificación de un maitansinoide en C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15, o desmetilo C-20, con un aminoácido acilado donde el grupo acilo lleva un grupo sulfhidrilo protegido, en donde el átomo de carbono del grupo acilo que lleva el grupo sulfhidrilo protegido tiene uno o dos sustituyentes, siendo dichos sustituyentes CH₃, C₂H₅, 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además uno de los sustituyentes puede ser H, y en donde el grupo acilo tiene una cadena lineal de al menos tres átomos de carbono entre la funcionalidad carbonilo y el átomo de azufre, comprendiendo dicho método hacer reaccionar un maitansinoide en C-3, hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15, o desmetilo C-20, con el aminoácido acilado, donde el grupo acilo lleva un grupo sulfhidrilo protegido.
- 45

54. Un método de esterificación de maitansinol para proporcionar un maitansinoide de la fórmula **42'**:



en donde:

Y_2' representa



en donde:

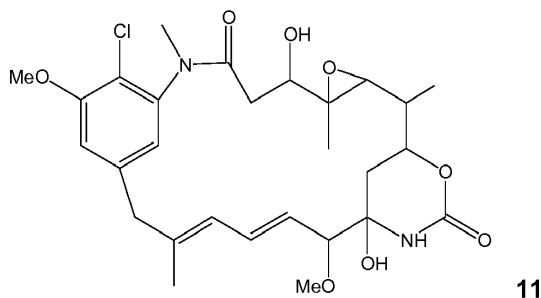
R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R_2 puede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

10 A, B, y D cada uno independientemente es cicloalquilo o cicloalqueno que tiene 3 a 10 átomos de carbono, arilo simple o sustituido, o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{11} , y R_{12} son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

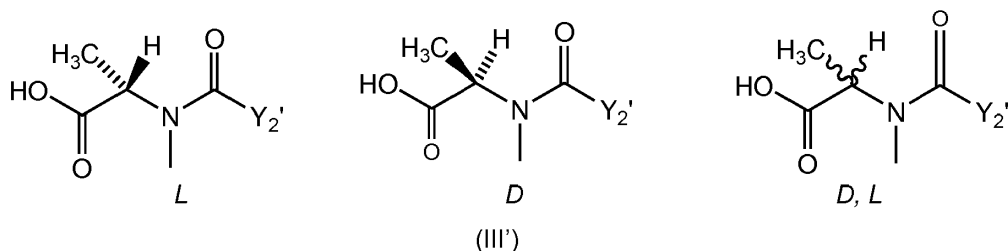
15 l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento; y

Z_2 es SR o -COR, en donde R es alquilo o alqueno lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alqueno ramificado o cíclico que tiene de 3 - 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, comprendiendo dicho método hacer reaccionar maitansinol de la estructura **11** en la C-3:



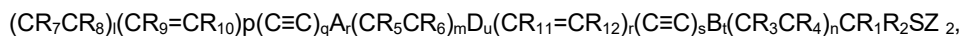
20

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



en donde:

Y_2 representa



en donde:

- 5 R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R_2 puede ser H;

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

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

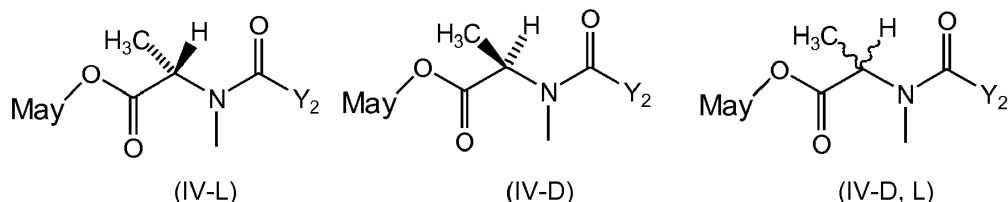
l, m, n, o, p, q, r, s, y t son cada uno independientemente 0 o un número entero de 1 a 5, con la condición de que al menos dos de l, m, n, o, p, q, r, s y t no son cero en ningún momento; y

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

55. El método de la cláusula 54, en donde el compuesto de fórmula (I) se representa mediante la fórmula (I-L).

56. El método de la cláusula 54, en donde R_1 es H y R_2 es metilo.

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



en donde:

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

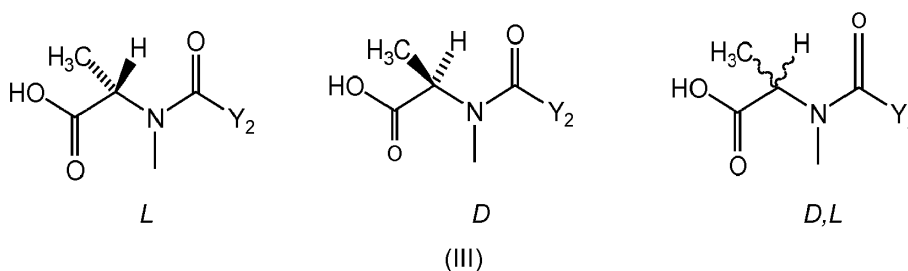
- 25 R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R_2 puede ser H;

- 30 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

l, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

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

- 35 May es a maitansinoide; comprendiendo dicho método hacer reaccionar dicho maitansinoide at C-3, Hidroximetilo C-14, hidroxilo C-15, o desmetilo C-20, con un compuesto de fórmula (III-L), (III-D), o (III-D,L):



en donde:

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

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

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, CH_3 , C_2H_5 , 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático;

10 l , m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; 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 - 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático.

15 58. El método de la cláusula 57, 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; y n es 0.

59. El método de una cualquiera de las cláusulas 58, en donde el compuesto de fórmula (I) se representa mediante la fórmula (I-L).

60. El método de la cláusula 58, 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).

20 61. El método de la cláusula 58, en donde dicho compuesto de fórmula (III-D) es el compuesto **15** (R, S), **15**(R,R), o una mezcla de **15**(R,S) y **15**(R,R).

62. El método de la cláusula 58, en donde dicho compuesto de fórmula (III-D,L) es N-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva una funcionalidad tiol protegida, en la que el carbono central que lleva el átomo de azufre es o bien racémico o de quiralidad R o S para dar los compuestos de la estructura de **15**.

25 63. El método de la cláusula 60, en donde dicha mezcla de **15a**(S,S) y **15b**(S,R) se obtiene mediante un proceso que comprende:

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

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

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

64. El método de la cláusula 60, en donde dicho compuesto **15a**(S,S) se obtiene mediante un método que comprende:

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

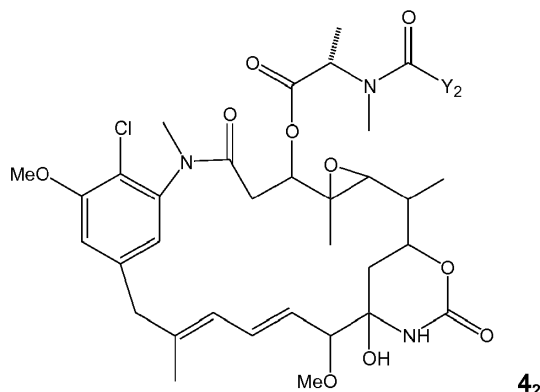
(2) convertir el compuesto **19** en éster de N-hidroxisuccinimida (**20**); y

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

65. El método de la cláusula 60, en donde dicho compuesto **15b**(S,R) se obtiene mediante un método que comprende:

- (1) convertir (S)-1,3-butanodiol en ácido (R)-4-(metiditio)pentanoico **24**;
- (2) convertir el compuesto **25** 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 66. El método de la cláusula 61, en donde dicha mezcla de compuestos **15**(R,S) y **15**(R,R) puede obtenerse mediante un proceso que comprende:
- (1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotolsulfonato de metilo para dar el compuesto **13**;
- (2) convertir el compuesto **13** éster de N-hidroxisuccinimida **14**;
- (3) hacer reaccionar el compuesto **14** con *N*-metil-D-alanina para dar dicha mezcla de compuestos **15**(R,S) y **15**(R,R).
- 10 67. El método de la cláusula 62, en donde dicha N-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva una funcionalidad tiol protegida, en el que el carbono central que lleva el átomo de azufre es o bien racémico o de la quiralidad R o S para dar los compuestos de la estructura de **15** se obtiene mediante un proceso que comprende:
- (1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotolsulfonato de metilo para dar el compuesto **13**;
- (2) convertir el compuesto **13** éster de N-hidroxisuccinimida **14**;
- 15 (3) hacer reaccionar el compuesto **14** con N-metilalanina racémica para proporcionar dicha N-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva una funcionalidad tiol protegida, en la que el carbono central que lleva el átomo de azufre es o bien racémico o de quiralidad R o S para dar los compuestos de la estructura **15**.
68. El método de la cláusula 56, en donde R₁ y R₂ son metilo; R₃, R₄, R₅, y R₆ son cada uno H; l y m son 1; y n es 0.
- 20 69. El método de la cláusula 68, en donde dicho compuesto de fórmula (III-L) es el compuesto **10** que contiene *N*-metil-L-alanina.
70. El método de la cláusula 68, en donde dicho compuesto de fórmula (III-D) es el compuesto **10** que contiene *N*-metil-D-alanina.
71. El método de la cláusula 68, en donde dicho compuesto de fórmula (III-D,L) es el compuesto **10** que contiene N-metilalanina racémica.
- 25 72. El método de una cualquiera de las cláusulas 69, 70 o 71, en donde dicho compuesto **10** que contiene *N*-metil-L-alanina, *N*-metil-D-alanina, o N-metilalanina racémica se obtiene mediante un proceso que comprende:
- (1) hacer reaccionar sulfuro de isobutileno (**5**) con el anión de acetonitrilo para dar el compuesto **6**;
- (2) hidrolizar el compuesto **6** para proporcionar ácido 4-mercapto-4-metilopentanoico (**7**);
- (3) convertir el compuesto **7** en disulfuro **8** mediante reacción con metilometanotolsulfonato;
- 30 (4) convertir el compuesto **8** éster de N-hidroxisuccinimida **9**; y
- (5) hacer reaccionar el compuesto **9** con *N*-metil-L-alanina, *N*-metil-D-alanina, o N-metilalanina racémica para dar dicho compuesto **10** que contiene *N*-metil-L-alanina, *N*-metil-D-alanina, o N-metilalanina racémica.
- 35 73. Un método para obtener un maitansinoide mediante el método de una cualquiera de las cláusulas 57, 58, 59 o 60, que además comprende separar diaestereoisómeros, si están presentes, y purificar el maitansinoide mediante HPLC sobre sílice unida a ciano.
74. Un método para obtener un conjugado maitansinoide-agente de unión a célula que comprende obtener un maitansinoide purificado mediante el método de la cláusula 73, y hacer reaccionar el maitansinoide purificado con un agente de unión a célula que comprende un grupo ditio o sulfhidrilo reactivo.
- 40 75. El método de la cláusula 74, en donde el grupo ditio reactivo es un grupo ditiopiridilo o un grupo ditiopiridilo sustituido.
76. Un método para obtener un conjugado maitansinoide-agente de unión a célula que comprende obtener un maitansinoide purificado mediante el método de la cláusula 72, y hacer reaccionar el maitansinoide purificado con un agente de unión a célula que comprende un grupo maleimido o un grupo haloacetilo.

77. Un método de esterificación de maitansinol para proporcionar un maitansinoide de la fórmula **4₂**:



en donde:

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

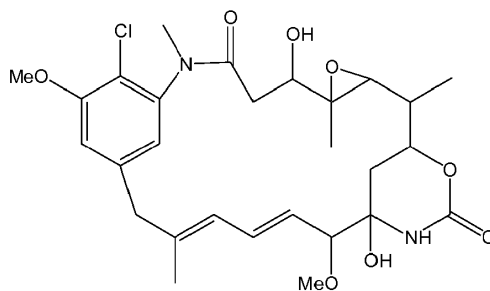
- 5 R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R_2 puede ser H;

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

10

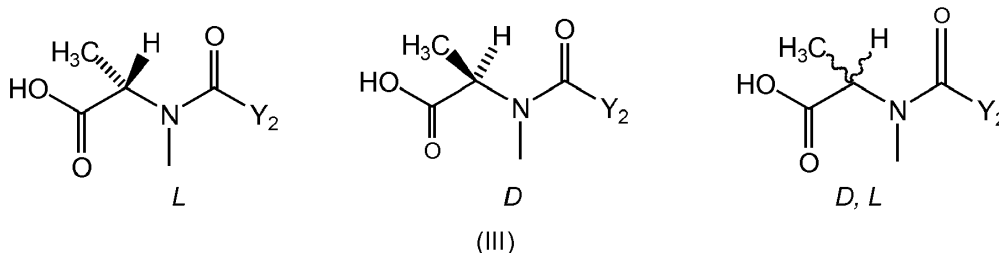
l , m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

Z_2 es SR o -COR, en donde R es alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, comprendiendo dicho método hacer reaccionar maitansinol de la estructura **11** en la C-3:



15

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



en donde:

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

- 20 R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , alquilo o alquenilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquilo o alquenilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, fenilo, fenilo sustituido o un

radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R_2 puede ser H;

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

5 I, m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0;

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

78. El método de la cláusula 77, en donde El compuesto de fórmula (I) se representa mediante la fórmula (I-L).

10 79. El método de la cláusula 77, en donde R_1 es H, R_2 es metilo, R_5 , R_6 , R_7 , y R_8 son cada uno H; I y m son cada uno 1; y n es 0.

80. El método de la cláusula 77, 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)**.

15 81. El método de la cláusula 77, en donde dicho compuesto de fórmula (III-D) es el compuesto **15(R, S)**, **15(R,R)**, o una mezcla de **15(R,S)** y **15(R,R)**.

82. El método de la cláusula 77, en donde dicho compuesto de fórmula (III-D,L) es N-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva una funcionalidad tiol protegida, en la que el carbono central que lleva el átomo de azufre es o bien racémico o de quiralidad R o S para dar los compuestos de la estructura de **15**.

20 83. El método de la cláusula 80, en donde dicha mezcla de **15a(S,S)** y **15b(S,R)** se obtiene mediante un proceso que comprende:

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

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

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

25 84. El método de la cláusula 80, en donde dicho compuesto **15a(S,S)** se obtiene mediante un método que comprende:

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

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

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

30 85. El método de la cláusula 80, en donde dicho compuesto **15b(S,R)** se obtiene mediante un método que comprende:

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

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

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

35 86. El método de la cláusula 81, en donde dicha mezcla de compuestos **15(R,S)** y **15(R,R)** puede obtenerse mediante un proceso que comprende:

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

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

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

40 87. El método de la cláusula 82, en donde dicho N-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva una funcionalidad tiol protegida, en la que el carbono central que lleva el átomo de azufre es o bien racémico o de quiralidad R o S para dar los compuestos de la estructura de **15** se obtiene mediante un proceso que comprende:

- (1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotolsulfonato de metilo para dar el compuesto **13**;
- (2) convertir el compuesto **13** éster de N-hidroxisuccinimida **14**;
- (3) hacer reaccionar el compuesto **14** con N-metilalanina racémica para proporcionar dicho N-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva una funcionalidad tiol protegida, en la que el carbono central que lleva el átomo de azufre es o bien racémico o de quiralidad R o S para dar el compuestos de la estructura **15**.
- 5 88. El método de la cláusula 77, 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; y n es 0.
89. El método de la cláusula 77, en donde dicho compuesto de fórmula (III-L) es el compuesto **10** que contiene N-metil-L-alanina.
- 10 90. El método de la cláusula 77, en donde dicho compuesto de fórmula (III-D) es el compuesto **10** que contiene N-metil-D-alanina.
91. El método de la cláusula 77, en donde dicho compuesto de fórmula (III-D,L) es el compuesto **10** que contiene N-metil-alanina racémica.
92. El método de una cualquiera de las cláusulas 89, 90 o 91, en donde dicho compuesto **10** que contiene N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina o N-metilalanina racémica se obtiene mediante un proceso que comprende:
- 15 (1) hacer reaccionar sulfuro de isobutileno (**5**) con el anión de acetonitrilo para dar el compuesto **6**;
- (2) hidrolizar el compuesto **6** para proporcionar ácido 4-mercapto-4-metilopentanoico (**7**);
- (3) convertir el compuesto **7** en el disulfuro **8** mediante reacción con metilometanotolsulfonato;
- (4) convertir el compuesto **8** en su éster de N-hidroxisuccinimida **9**; y
- 20 (5) hacer reaccionar el compuesto **9** con N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina o N-metilalanina racémica para dar dicho compuesto **10** que contiene N-metil-L-alanina, N-metil-D-alanina o N-metilalanina racémica.
93. El método para obtener un maitansinoide de una cualquiera de las cláusulas 77, 79 o 88, que además comprende separar diastereómeros, si están presentes, y purificar el maitansinoide mediante HPLC sobre sílice unida a ciano.
- 25 94. Un método para obtener un conjugado maitansinoide-agente de unión a célula que comprende obtener un maitansinoide purificado mediante el método de la cláusula 93, y hacer reaccionar el maitansinoide purificado con un agente de unión a célula que comprende un grupo ditio o sulfhidrilo reactivo.
95. El método de la cláusula 94, en donde el grupo ditio reactivo es un grupo ditiopiridilo o un grupo ditiopiridilo sustituido.
- 30 96. Un método para obtener un conjugado maitansinoide-agente de unión a célula que comprende obtener un maitansinoide purificado mediante el método de la cláusula 93, y hacer reaccionar el maitansinoide purificado con un agente de unión a célula que comprende un grupo maleimido o un grupo haloacetilo.
97. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva del conjugado de una cualquiera de las cláusulas 18 a 24, 28 a 33, 37, 38 o 39, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable.
- 35 98. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva del conjugado de la cláusula 25, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable.
99. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva del conjugado de la cláusula 26, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable.
- 40 100. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva del conjugado de la cláusula 27, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable.
101. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva del conjugado de la cláusula 34, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable.
102. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva del conjugado de la cláusula 35, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable.

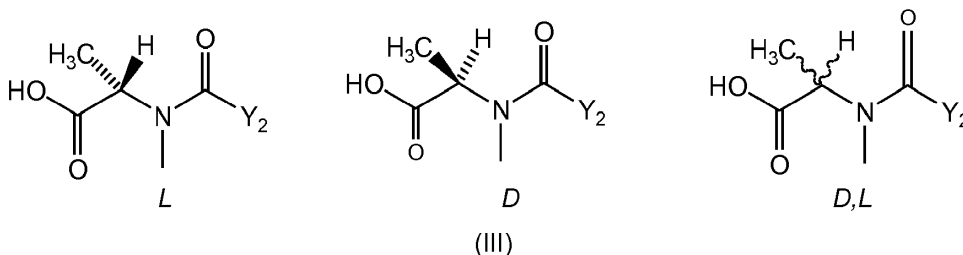
103. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva del conjugado de la cláusula 36, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable.

104. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva del conjugado de la cláusula 40, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable.

5 105. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva del conjugado de la cláusula 41, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable.

106. Un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva del conjugado de la cláusula 42, o una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable.

107. A compuesto de fórmula III:



en donde:

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

R_1 y R_2 son cada uno independientemente CH_3 , C_2H_5 , 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, fenilo, fenilo sustituido o un radical heterocicloalquilo o heterocíclico aromático, y además R_2 puede ser H;

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

l , m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 5, y además n puede ser 0; y

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

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

109. Un método para obtener compuesto **10** que contiene *N*-metil-L-alanina, *N*-metil-D-alanina, o *N*-metilalanina racémica que comprende:

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

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

(3) convertir el compuesto **7** en disulfuro **8** mediante reacción con metilometanotiol sulfonato;

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

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

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

111. Un método para obtener una mezcla de compuestos **15a(S,S)** y **15b(S,R)**, que comprende:

(1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metilometanotiol sulfonato para dar el compuesto **13**;

(2) convertir el compuesto **13** 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)**.

112. Una mezcla de compuestos **15**(R,S) y **15**(R,R).
113. Un método para obtener una mezcla de compuestos **15**(R,S) y **15**(R,R) que comprende:
- (1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotolsulfonato de metilo para dar el compuesto **13**;
- (2) convertir el compuesto **13** éster de N-hidroxisuccinimida **14**;
- 5 (3) hacer reaccionar el compuesto **14** con *N*-metil-D-alanina para dar dicha mezcla de compuestos **15**(R,S) y **15**(R,R).
114. N-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva una funcionalidad tiol protegida, en la que el átomo de carbono central que lleva el átomo de azufre es o bien racémico o de la quiralidad R o S para dar los compuestos de una estructura de **15**.
- 10 115. Un método para obtener N-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva una funcionalidad tiol protegida, en la que el átomo de carbono central que lleva el átomo de azufre es o bien racémico o de la quiralidad R o S para dar los compuestos de estructura **15**, que comprende:
- (1) hacer reaccionar ácido 4-mercaptopentanoico (**12**) con metanotolsulfonato de metilo para dar el compuesto **13**;
- (2) convertir el compuesto **13** éster de N-hidroxisuccinimida **14**;
- 15 (3) hacer reaccionar el compuesto **14** con N-metilalanina racémica para proporcionar dicho N-metilalanina racémica acilada con un grupo carboxílico que lleva una funcionalidad tiol protegida, en la que el átomo de carbono central que lleva el átomo de azufre es o bien racémico o de la quiralidad R o S para dar los compuestos de la estructura **15**.
116. Compuesto **15a**(S,S).
- 20 117. Un método para obtener compuesto **15a**(S,S) que comprende:
- (1) convertir el ácido (R)-1,3-butanodiol en (S)-4-(metiditio)pentanoico **19**;
- (2) convertir el compuesto **19** en su éster de N-hidroxisuccinimida (**20**); y
- (3) hacer reaccionar el compuesto **20** con *N*-metil-L-alanina para dar dicho compuesto **15a**(S,S).
118. Compuesto **15b**(S,R).
- 25 119. Un método para obtener compuesto **15b**(S,R) que comprende:
- (1) convertir (S)-1,3-butanodiol en (R)-4-(metiditio)pentanoico **24**;
- (2) convertir el compuesto **24** en su éster de N-hidroxisuccinimida (**25**); y
- (3) hacer reaccionar el compuesto **25** con *N*-metil-L-alanina para dar dicho compuesto **15b**(S,R).
- 30 120. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del compuesto de una cualquiera de las cláusulas 2, 8, 13 o 108, una sal o solvato de la misma farmacéuticamente aceptable, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
121. La composición farmacéutica de la cláusula 120, que comprende además un anticuerpo.
122. Un método para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células diana o tejido que contiene células diana con una cantidad efectiva del maitansinoide-agente de unión a diana de una cualquiera de las cláusulas 18 a 24, 28 a 33, 37 a 40 o 41, una sal o solvato del mismo.
- 35 123. Un método para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células diana o tejido que contiene células diana con una cantidad efectiva del maitansinoide-agentes de unión a diana de la cláusula 25, una sal o solvato del mismo.
- 40 124. Un método para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células diana o tejido que contiene células diana con una cantidad efectiva del maitansinoide-agentes de unión a diana de la cláusula 26, una sal o solvato del mismo.
125. Un método para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en

contacto células diana o tejido que contiene células diana con una cantidad efectiva del maitansinoide-agentes de unión a diana de la cláusula 27, una sal o solvato del mismo.

5 126. Un método para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células diana o tejido que contiene células diana con una cantidad efectiva del maitansinoide-agentes de unión a diana de la cláusula 34, una sal o solvato del mismo.

127. Un método para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células diana o tejido que contiene células diana con una cantidad efectiva del maitansinoide-agentes de unión a diana de la cláusula 35, una sal o solvato del mismo.

10 128. Un método para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células diana o tejido que contiene células diana con una cantidad efectiva del maitansinoide-agentes de unión a diana de la cláusula 36, una sal o solvato del mismo.

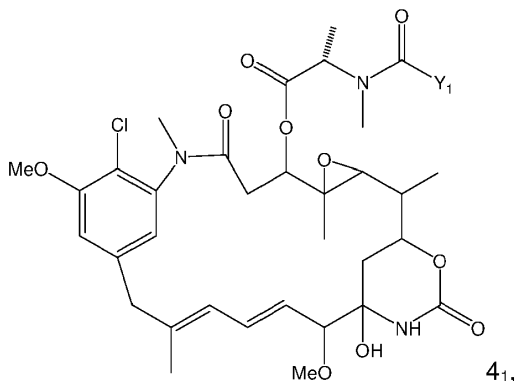
129. Un método para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células diana o tejido que contiene células diana con una cantidad efectiva del maitansinoide-agentes de unión a diana de la cláusula 42, una sal o solvato del mismo.

15 130. Un método para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células diana o tejido que contiene células diana con una cantidad efectiva del maitansinoide-agentes de unión a diana de la cláusula 43, una sal o solvato del mismo.

20 131. Un método para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células diana o tejido que contiene células diana con una cantidad efectiva del maitansinoide-agentes de unión a diana de la cláusula 44, una sal o solvato del mismo.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de maitansinoide-agente de unión a diana, en donde el maitansinoide se representa mediante la fórmula 4₁:



en donde el maitansinoide se une al agente de unión a diana a través de un enlace disulfuro, y en donde:

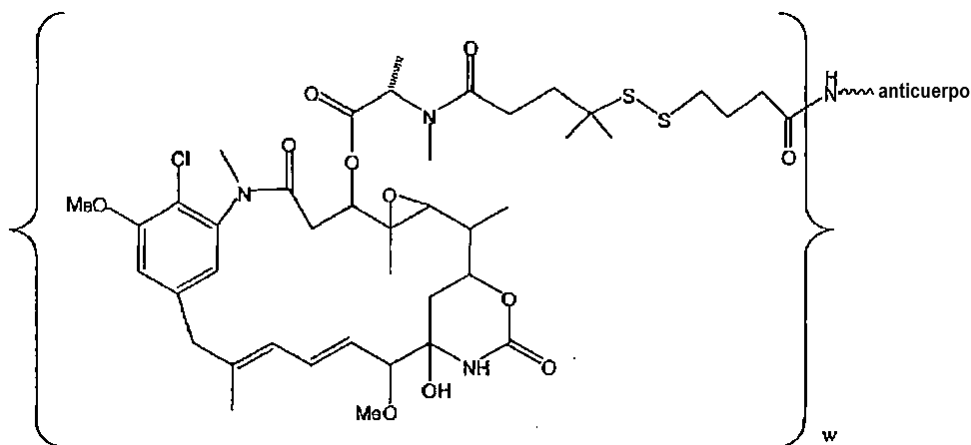
Y_1 es $(CH_2)_2CR_1R_2S^-$; y

R_1 es metilo y R_2 es H o R_1 y R_2 son metilo.

2. El conjugado de maitansinoide-agente de unión a diana de la reivindicación 1, en donde R_1 y R_2 son metilo.

3. El conjugado de maitansinoide-agente de unión a diana de la reivindicación 1, en donde R_1 es metilo y R_2 es H.

4. El conjugado de maitansinoide-agente de unión a diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el conjugado se representa mediante la fórmula siguiente:



en donde R es H o Me; y w es un promedio de 1-10.

5. El conjugado de maitansinoide-agente de unión a diana de la reivindicación 4, en donde R es Me.

6. El conjugado de maitansinoide-agente de unión a diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el agente de unión a diana es un anticuerpo.

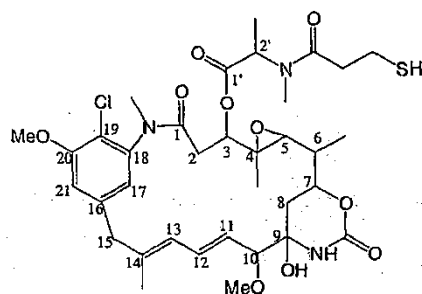
7. El conjugado de maitansinoide-agente de unión a diana de la reivindicación 6, en donde el anticuerpo es un anticuerpo MY9 humanizado o recubierto que se une específicamente al antígeno CD33, un anticuerpo anti-B4 humanizado o recubierto que se une específicamente al antígeno CD19, o un anticuerpo C242 humanizado o recubierto que se une específicamente al antígeno CanAg.

8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del conjugado maitansinoide-agente de

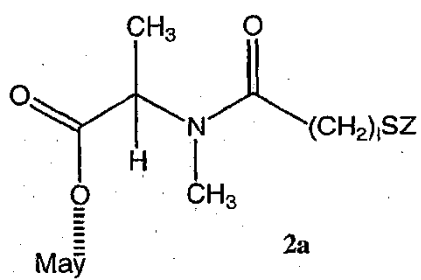
unión a célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5 9. Un conjugado de maitansinoide-agente de unión a diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de dicho conjugado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
10. Un conjugado de maitansinoide-agente de unión a diana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en un método de tratamiento de malignidad, una enfermedad autoinmune, un rechazo de injerto, enfermedad de injerto versus huésped, una infección viral o una infección parasitaria.
11. El conjugado para uso de la reivindicación 10, en donde el método es de tratamiento de un tumor.
- 10 12. El conjugado para uso de la reivindicación 10, en donde el método es de tratamiento de cáncer de pulmón, de mama, de colon, de próstata, de riñón, de páncreas, de ovarios, de órganos linfáticos.
13. conjugado para uso de la reivindicación 10, en donde el agente de unión a diana es un anticuerpo monoclonal anti-B4 y el método es de tratamiento de linfoma no de Hodgkin o leucemia linfoblástica crónica.
- 15 14. El conjugado para uso de la reivindicación 10, en donde el agente de unión a diana es un anticuerpo monoclonal anti-B4 y el método es de tratamiento de linfoma no de Hodgkin.

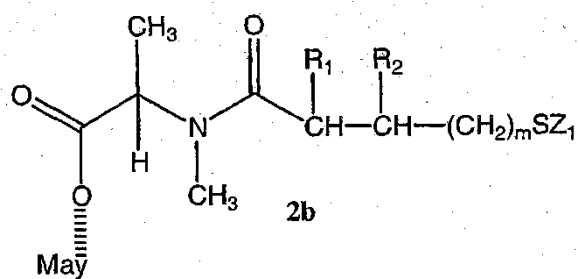
FIG. 1 (técnica anterior)



DM1 (1)



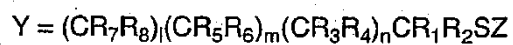
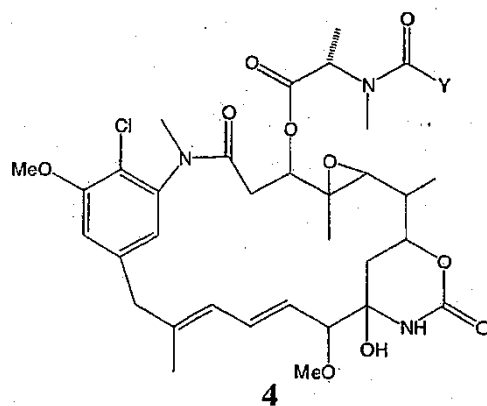
2a



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

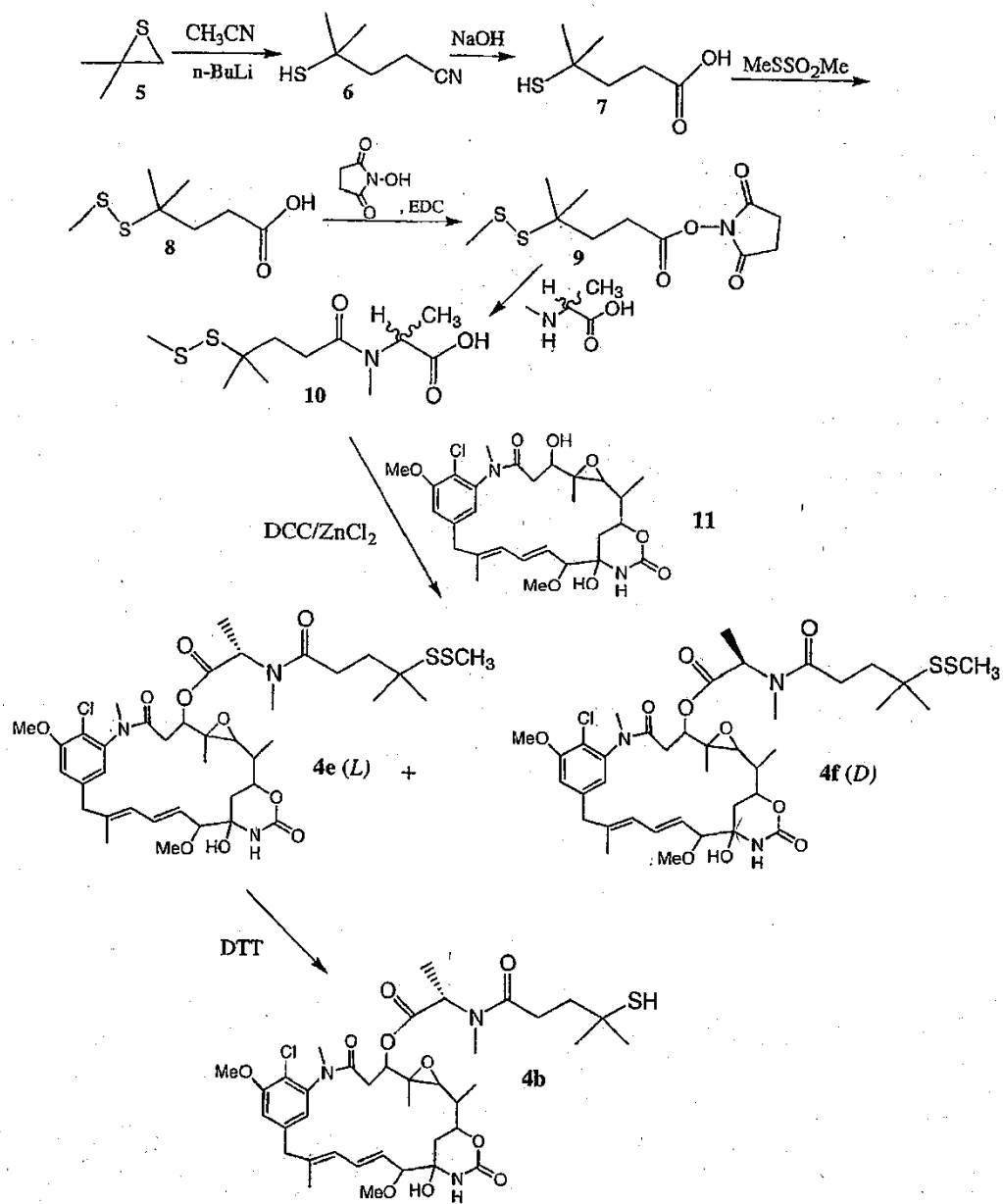


FIG. 3b

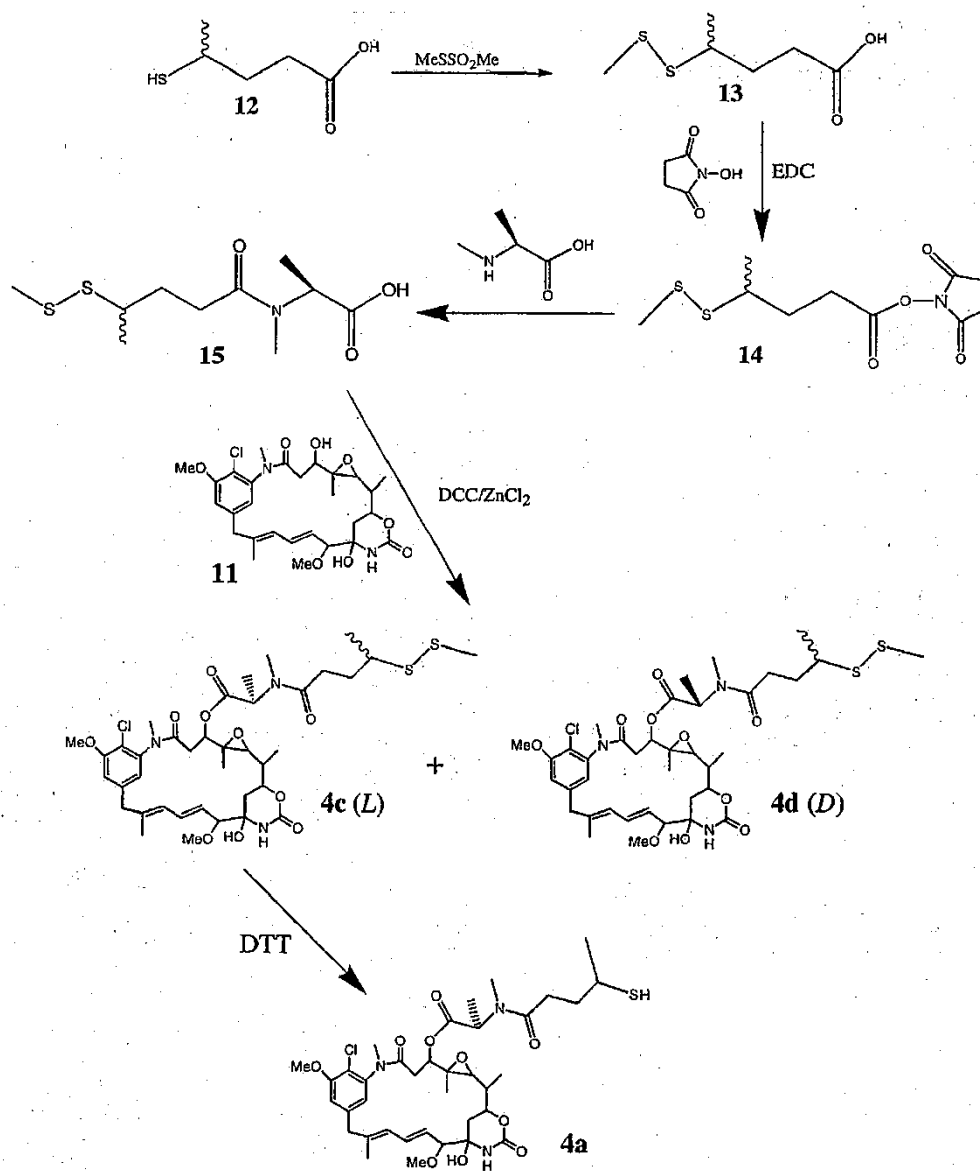


FIG. 3c

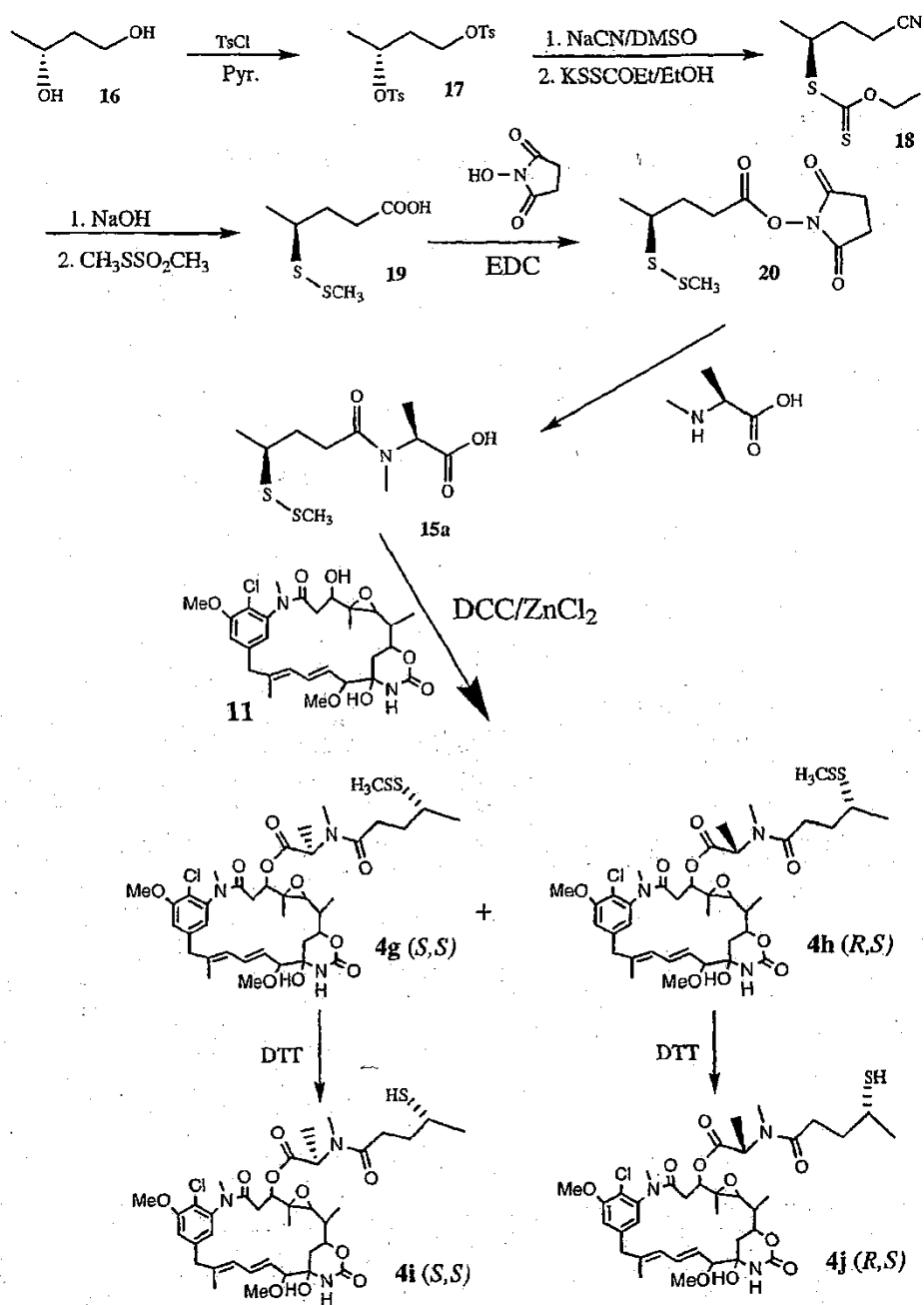


FIG. 3d

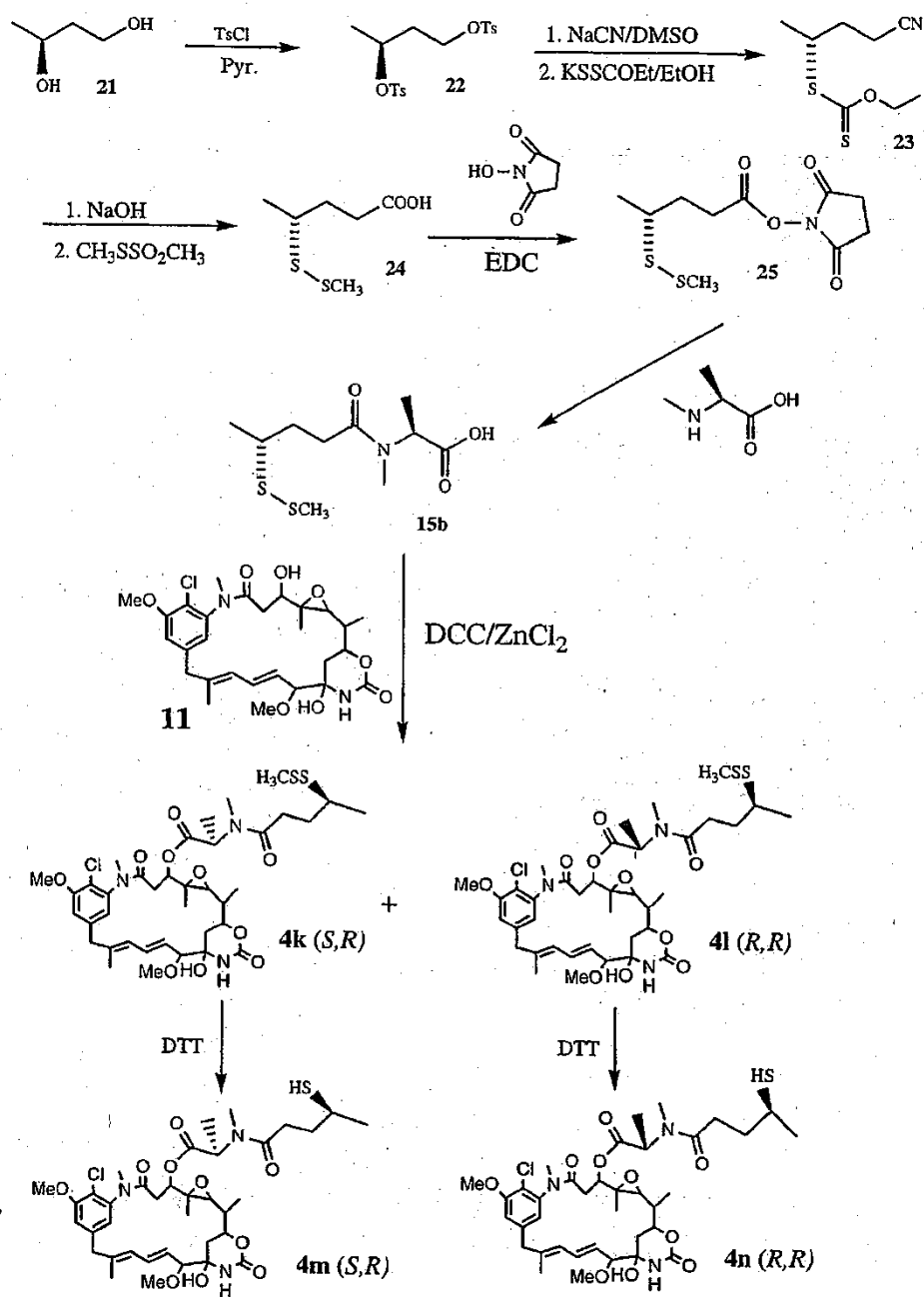
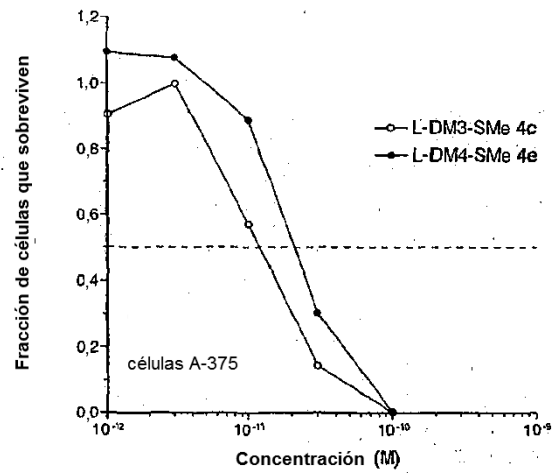


FIG. 4

a) Citotoxicidad in vitro contra células A-375



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

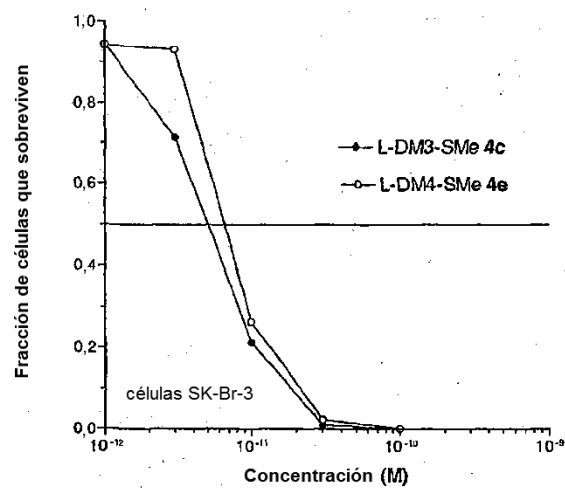
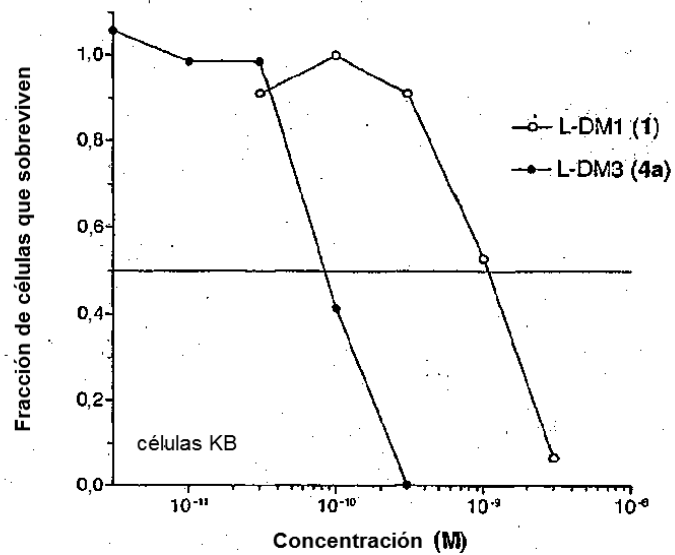


FIG. 4

c) Citotoxicidad in vitro contra células KB



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

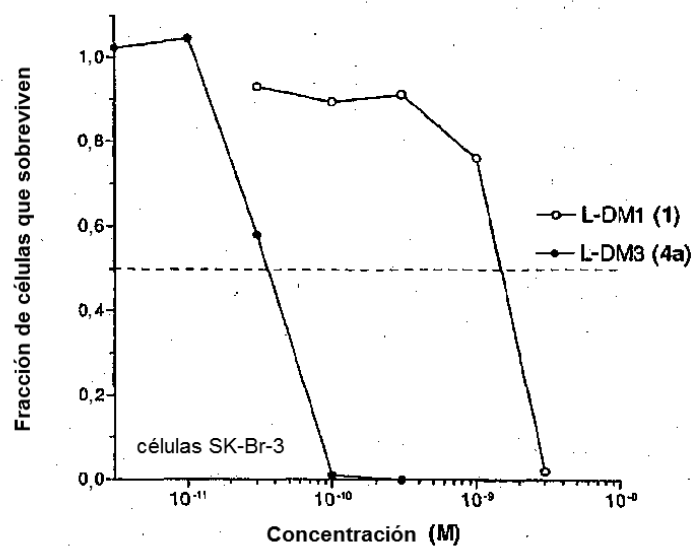


FIG. 5a

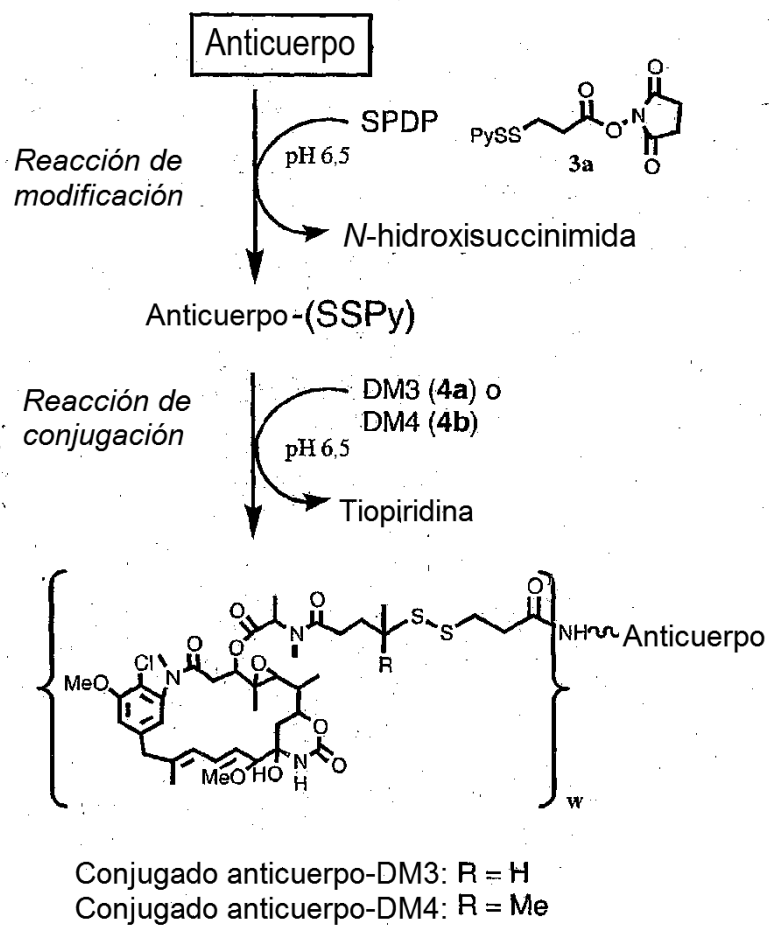


FIG. 5b

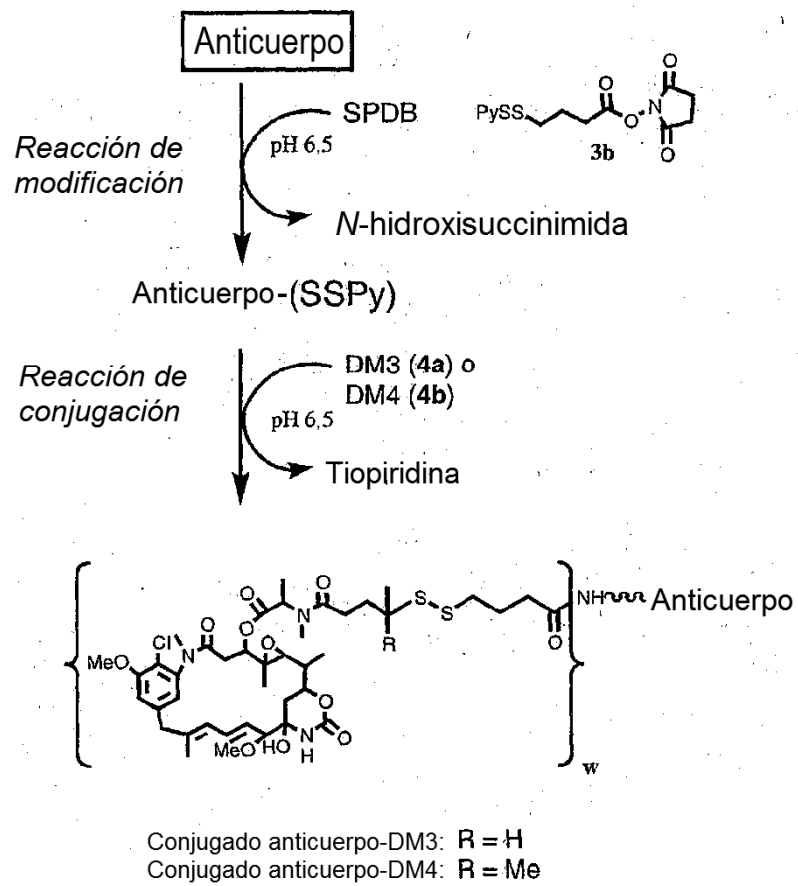


FIG. 5c

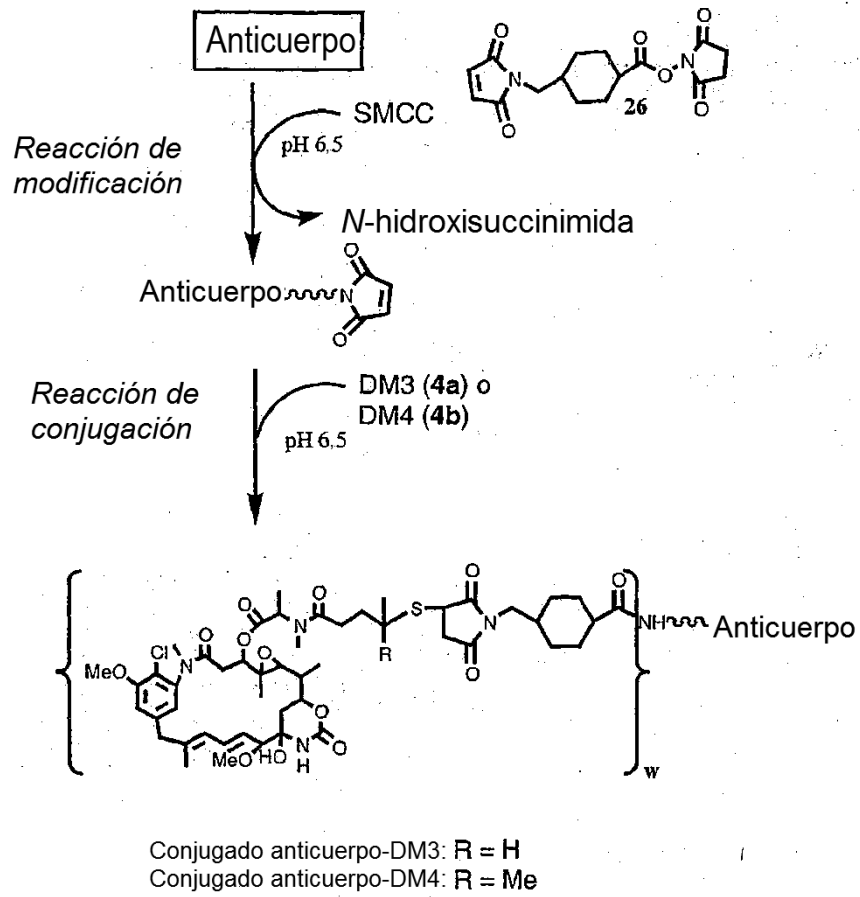


FIG. 5d

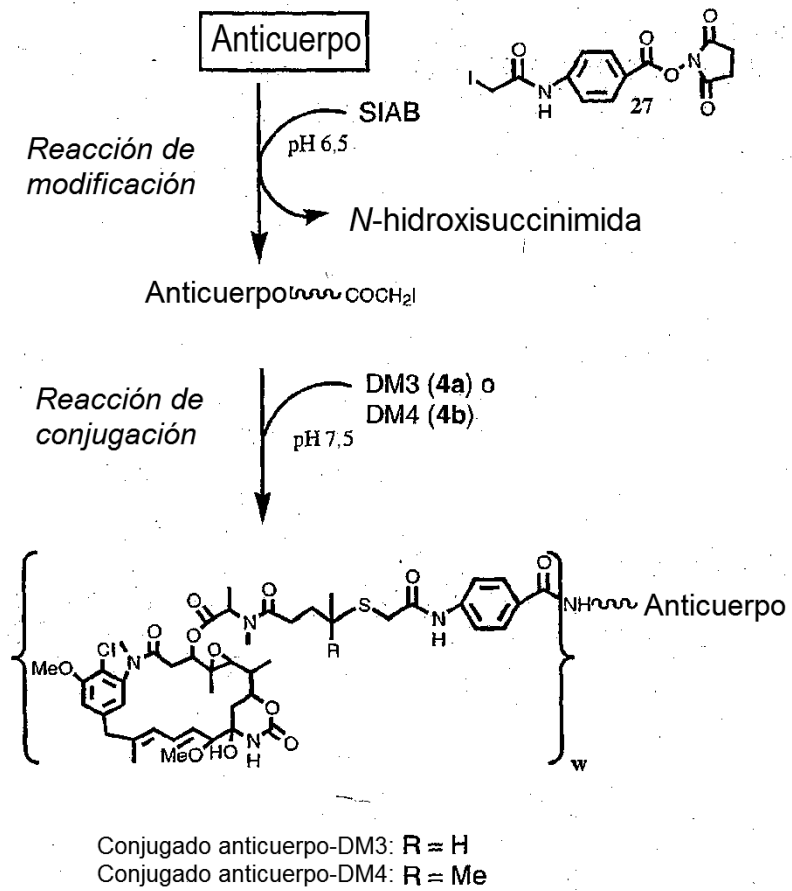


FIG. 6

a) Citotoxicidad in vitro y especificidad de conjugados huC242-DM3 y huC242-DM4

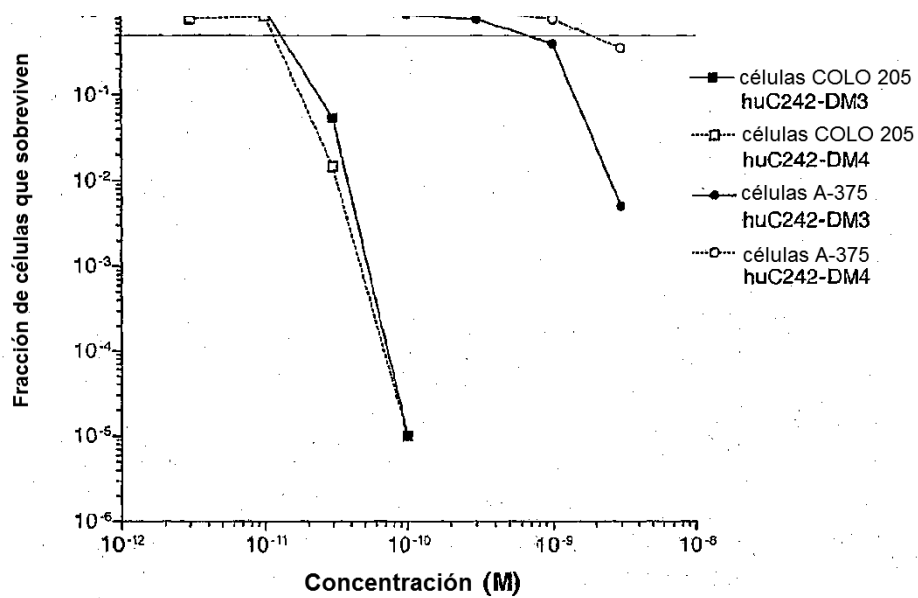


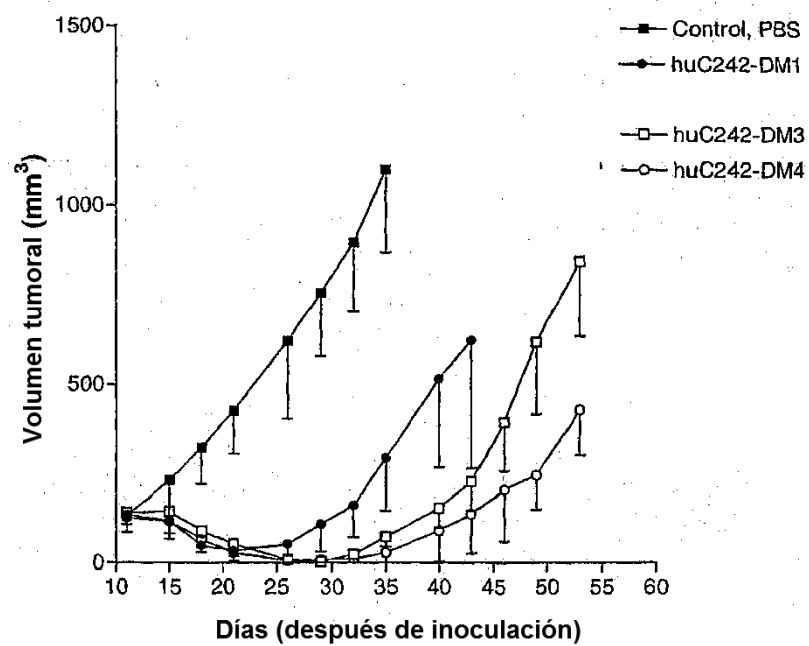
FIG. 7 Eficacia in vivo de conjugados de huC242-maitansinoide (xenoinjertos de HT-29)

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

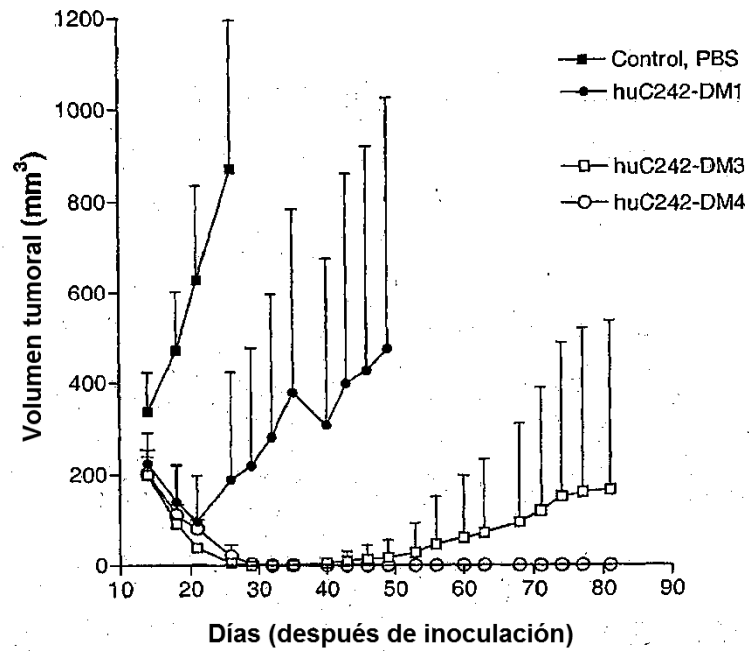


FIG. 9 Eficacia de conjugados de MY-9-6-maitansinoide (xenoinjertos de HL60)

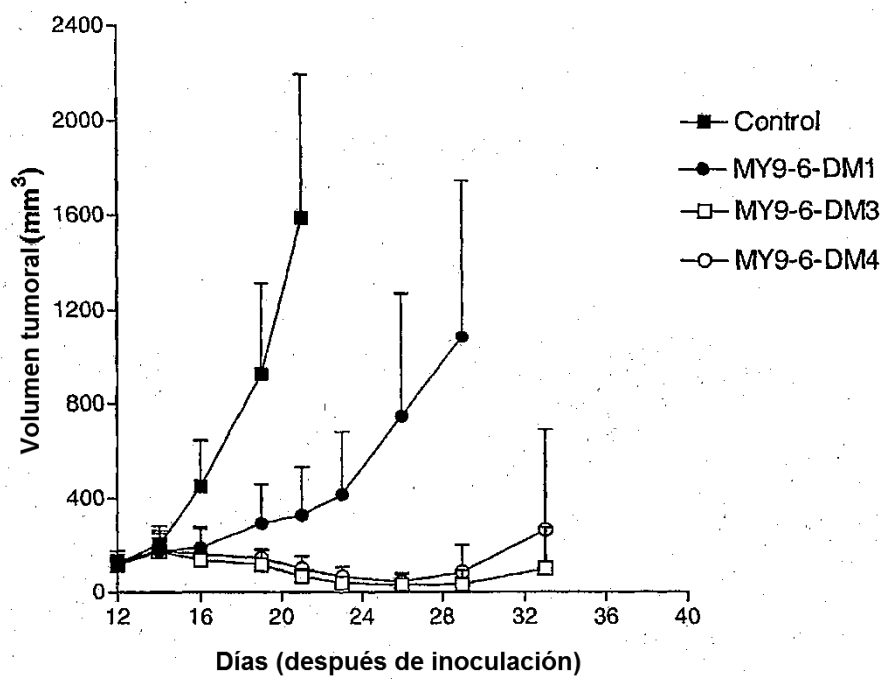


FIG. 10 Análisis de citotoxicidad in vitro: Actividad de HuMy9-6-DM4 contra células HL-60 positivas para el antígeno y células Namalwa negativas para el antígeno

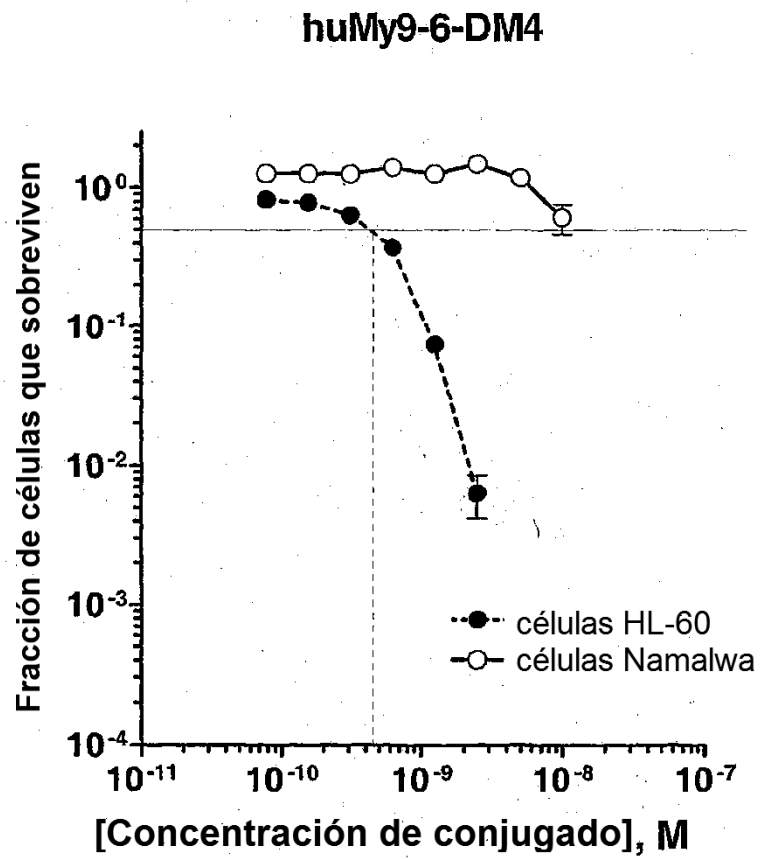


FIG. 11 Comparación de la eficacia in vivo de los conjugados HuMy9-6-DM4 y HuMy9-6-DM1 contra xenoinjertos de tumor humano de HL-60 en ratones SCID

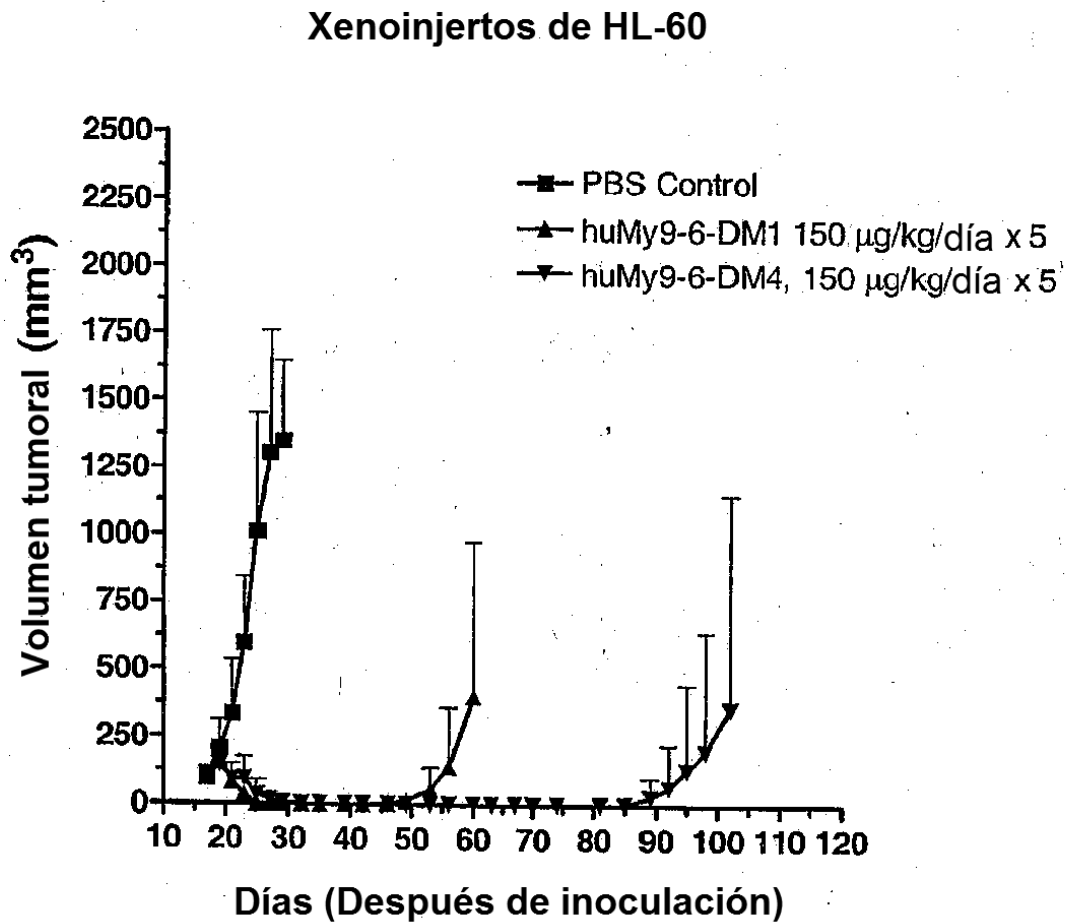


FIG. 12. Análisis de citotoxicidad in vitro de huB4-DM4

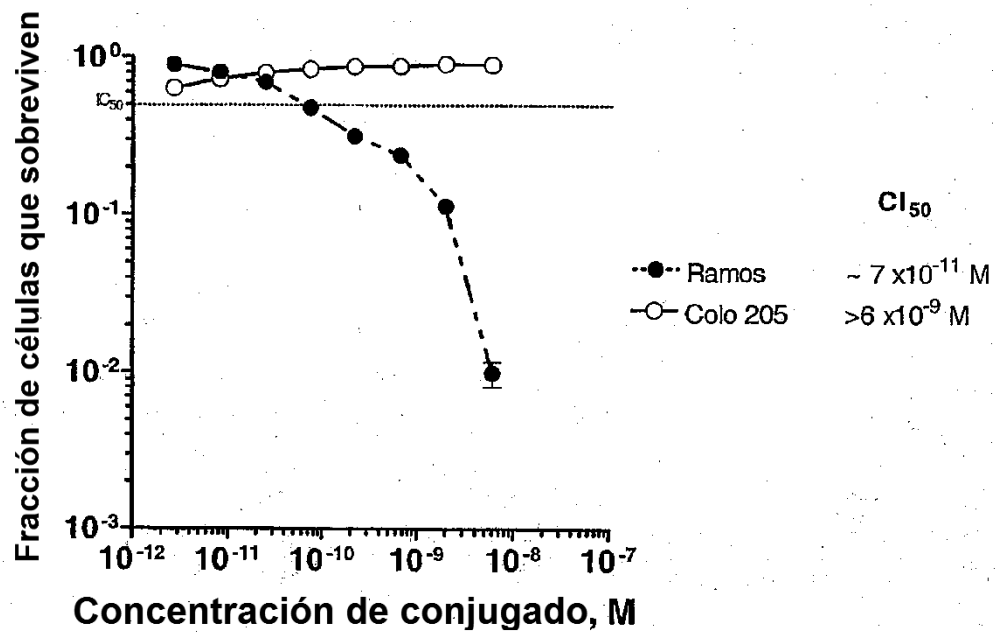


Figura 13a. Eficacia in vivo del conjugado huB4-DM4 contra xenoinjertos Ramos en ratones SCID

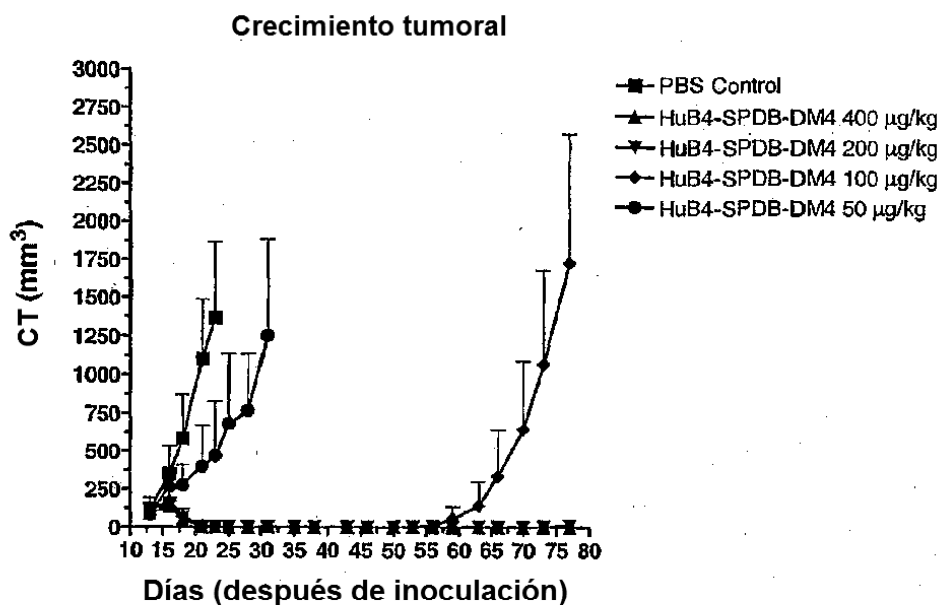


Figura 13b. Eficacia in vivo del conjugado huB4-DM4 contra xenoinjertos Ramos en ratones SCID: cambios de peso corporal en animales tratados

