

(11) Número de Publicação: **PT 2348024 E**

(51) Classificação Internacional:
C07D 491/12 (2015.01) **A61K 47/48** (2015.01)
C07D 498/18 (2015.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2002.02.14	(73) Titular(es): IMMUNOGEN, INC.
(30) Prioridade(s): 2001.05.31 US 867598	830 WINTER STREET WALTHAM, MA 02451 US
(43) Data de publicação do pedido: 2011.07.27	(72) Inventor(es): WAYNE C. WIDDISON US RAVI V.J. CHARI US
(45) Data e BPI da concessão: 2015.07.29 223/2015	(74) Mandatário: JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PREPARAÇÃO DE ÁCIDO BILIAR SINTÉTICO**

(57) Resumo:

OS ÁCIDOS BILIARES E COMPOSIÇÕES RELACIONADAS E MÉTODOS DE SÍNTESE E DE UTILIZAÇÃO. MAIS ESPECIFICAMENTE, ÁCIDO DESOXICÓLICO E COMPOSIÇÕES RELACIONADAS, DISSE COMPOSIÇÕES ESTAR LIVRE DE TODAS AS UNIDADES DE ORIGEM ANIMAL E LIVRE DE PORÇÕES PIROGÊNICAS.

RESUMO

MÉTODOS PARA A PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS CITOTÓXICOS DE MAITANSINÓIDE E AGENTES DE LIGAÇÃO CELULAR

A invenção proporciona um método para a produção de um conjugado citotóxico que compreende uma ou mais moléculas de maitansinóide e um agente de ligação celular, consistindo o referido método essencialmente no passo único de reação de uma ou mais moléculas de maitansinóide, contendo um éster reativo, com o agente de ligação celular.

DESCRIÇÃO

MÉTODOS PARA A PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS CITOTÓXICOS DE MAITANSINÓIDE E AGENTES DE LIGAÇÃO CELULAR

ÁREA DA INVENÇÃO

A presente invenção está relacionada com um método melhorado de preparação de conjugados citotóxicos que compreendem maitansinóides e agentes de ligação celular. Estes conjugados têm uso terapêutico já que são entregues a uma população celular específica de forma orientada.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Existem muitas descrições sobre a tentativa de direcionamento específico para células tumorais de conjugados de drogas de anticorpos monoclonais (Sela et al. em *Immunoconjugates* 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al, em *Medicamentos direcionados* 1-22 (E. Goldberg, ed.1983); Diener et al, em *Sistemas de Entrega Mediados por Anticorpos* 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al, em *Sistemas de Entrega Mediados por Anticorpos* 25-53 (J. Rodwell, ed.1988); Bumol et al, em *Sistemas de Entrega Mediados por Anticorpos* 55-79 (J.Rodwel, ed. 1988)). As drogas citotóxicas como o metotrexato, a daunorubicina, a doxorubicina, a vincristina, a vinblastina, o melfalano, a mitomicina C e o clorambucil têm sido conjugadas com uma variedade de anticorpos monoclonais murinos. Em alguns casos, as moléculas das drogas foram ligadas às moléculas dos anticorpos através duma molécula transportadora intermediária como a albumina sérica (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)), o 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. Nati. Acad. Sci.* 85:8276-8280

(1988)) ou o ácido poliglutâmico (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)).

Uma ampla gama de tecnologias de ligação foi usada na preparação de tais imunoconjugados e tanto os ligantes cliváveis como os não cliváveis foram investigados. Na maioria dos casos, o potencial citotóxico completo das drogas só podia ser observado, no entanto, se as moléculas da droga pudessem ser libertadas dos conjugados na forma não modificada, no local de ação.

Um dos ligantes cliváveis que foi usado na preparação de conjugados de drogas de anticorpos é um ligante ácido-lábil baseado no ácido cis-aconítico, que usa a seu favor o ambiente ácido de diferentes compartimentos celulares como os endossomas, encontrados durante a endocitose mediada por receptores, e os lisossomas. Shen e Ryser introduziram este método para a preparação de conjugados de daunorubicina com macromoléculas transportadoras (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102:1048-1054 (1981)). Yang e Reisfeld usaram a mesma técnica para conjugar a daunorubicina com um anticorpo anti-melanoma (*J. Natl. Canc. Inst.* 80: 1154-1159 (1988)). Recentemente, Dillman et al. também usaram um ligante ácido-lábil numa forma semelhante para preparar conjugados de daunorubicina com um anticorpo anti-células T (*Cancer Res.* 48:6097-6102 (1988)).

Uma abordagem alternativa, explorada por Trouet et al. envolve a daunorubicina ligada a um anticorpo através dum braço peptídico espaçador (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 626-629 (1982)). Isto foi realizado sob a premissa que as drogas livres podem ser libertadas dum tal conjugado pela ação de peptidases lisossomais.

Os testes citotóxicos *in vitro*, no entanto, revelaram que os conjugados de drogas de anticorpos raramente atingem a mesma potência citotóxica que uma droga livre não

conjugada. Isto sugere que os mecanismos pelos quais as moléculas da droga são libertadas a partir dos anticorpos são bastante ineficazes. Na área das imunotoxinas, os conjugados formados através de pontes dissulfeto entre os anticorpos monoclonais e as toxinas proteicas catalíticamente ativas, são mais citotóxicos que os conjugados que contêm outros ligantes. Ver, Lambert et al. *J. Biol. Chem.* 260: 12035-12041 (1985); Lambert et al. in *Immunotoxins* 175-209 (A. Frankel, ed. 1988); Ghetie et al, *Cancer Res.* 48:2610-2617 (1988). Isto foi atribuído à elevada concentração intracelular de glutathione que contribui para a clivagem eficaz da ligação dissulfeto entre a molécula de anticorpo e a toxina. Apesar disto, existem apenas alguns casos descritos do uso das pontes de dissulfeto para a preparação de conjugados entre drogas e macromoléculas. Shen et al. descreveram a conversão do metotrexato num derivado mercaptoetilamida seguida da conjugação com poli-D-lisina através duma ligação dissulfeto (*J. Biol. Chem.* 260:10905-10908 (1985)). Além disso, um relatório descreveu a preparação de conjugados de trissulfeto, contendo a droga tóxica caliqueamicina, com um anticorpo (Menendez et al. Quarta Conferência Internacional Sobre Imunoconjugados de Anticorpos Monoclonais para o Cancro, San Diego, Resumo 81 (1989)). Outro relatório descreveu a preparação de um conjugado do trissulfeto, contendo a droga tóxica caliqueamicina, com um anticorpo (Himman et al, 53 *Cancer Res.* 3336-1142 (1993)).

Uma razão para a falta de conjugados de drogas de anticorpos ligadas ao dissulfeto é a indisponibilidade das drogas citotóxicas que carregam átomos de enxofre contendo um radical que pode facilmente ser usado para ligar a droga a um anticorpo através duma ponte de dissulfeto. Além disso, a modificação química das drogas existentes é difícil sem ocorrer a diminuição do seu potencial citotóxico.

Uma outra grande desvantagem dos conjugados de drogas de anticorpos é a sua incapacidade para entregar uma concentração de droga suficiente no local de ação devido ao número limitado de antígenos alvo e à relativamente moderada citotoxicidade dos medicamentos cancerostáticos como o metotrexato, a daunorubicina e a vincristina. De forma a atingir uma citotoxicidade significativa, torna-se necessária a ligação de um grande número de moléculas da droga, tanto diretamente ao anticorpo como através duma molécula transportadora polimérica. No entanto, tais anticorpos altamente modificados apresentam, frequentemente, uma ligação fraca ao antígeno alvo e uma rápida depuração da corrente sanguínea *in vivo*.

Os maitansinóides são drogas altamente citotóxicas. A maitansina foi isolada pela primeira vez por Kupchan et al. a partir do arbusto africano *Maytenus serrata* e provou-se ser de 100 a 1000 vezes mais citotóxica que os agentes quimioterápicos para tumores convencionais como o metotrexato, a daunorubicina e a vincristina (Patente dos Estados Unidos N° 3,896,111). Subsequentemente foi descoberto que alguns micróbios também produzem maitansinóides, como um maitansinol e ésteres C-3 de maitansinol (Patente dos Estados Unidos N° 4,151,042). Os ésteres C-3 do maitansinol e análogos do maitansinol, também foram descritos (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)). Exemplos de análogos do maitansinol, a partir dos quais os ésteres C-3 foram preparados, incluem o maitansinol com modificações no anel aromático (por exemplo, dicloro) ou no C-9, C-14 (por exemplo, grupo metil hidroxilado), C-15, C-18, C-20 e C-4,5.

Os ésteres C-3 naturais e sintéticos podem ser classificados em dois grupos:

(a) ésteres C-3 com ácidos carboxílicos simples (Patente

dos Estados Unidos N° 4,248,870; 4,265,814; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,317,821; 4,322,348 e 4,331,598) e (b) ésteres C-3 com derivados de N-metil-L-alanina (Patente dos Estados Unidos N° 4,137,230; 4,260,608; 5,208,020 e Chem. Pharm. Bull. 12:3441 (1984)).

Os ésteres do grupo (b) são muito mais citotóxicos que os ésteres do grupo (a).

A maitansina é um inibidor mitótico. Foi descrito que o tratamento de células L1210 *in vivo* com maitansina resultou em 67% das células acumulando em mitose. As células controle não tratadas demonstraram um índice mitótico que variou entre 3.2 a 5.8% (Sieber et al. 43 *Comparative Leukemia Research* 1975, Bibl.Haemat. 495-500 (1976)). Experiências com ovos de ouriços-do-mar e de ovos de moluscos sugeriram que a maitansina inibe a mitose por interferência com a formação de microtúbulos através da inibição da polimerização da proteína dos microtúbulos, a tubulina (Remillard et al. Science 189:1002-1005 (1975)).

Suspensões *in vitro* de células leucémicas murinas P388, L1210 e LY5178, demonstraram ser inibidas pela maitansina a doses de 10^{-3} a 10^{-1} µg/µl, sendo a linha P388 a mais sensível. Também se demonstrou que a maitansina é um inibidor ativo do crescimento *in vitro* das células do carcinoma nasofaríngeo humano e a linha CEM da leucemia linfoblástica aguda humana foi inibida a concentrações tão baixas como 10^{-7} mg/ml (Wolpert-DeFillippes et al. *Biochem Pharmacol.* 24:1735-1738 (1975)).

A maitansina provou ser ativa também *in vivo*. O crescimento do tumor no sistema leucemia linfocítica P388 foi inibido num intervalo de doses de 50 a 100 vezes, o que sugere um índice terapêutico elevado; também pode ser demonstrada atividade inibitória significativa no sistema de leucemia em ratos L1210, no sistema de carcinoma pulmonar de Lewis humano e no sistema de melanocarcinoma B-16 humano (Kupchan, *Ped. Proc.* 33:2288-2295 (1974)).

Os métodos atuais de conjugação dos maitansinóides com agentes de ligação celular (como os anticorpos) envolvem dois passos de reação. Um agente de ligação celular, por exemplo um anticorpo, é primeiramente modificado com um reagente de reticulação como o *N*-succinimidil piridil ditiopropionato (SPDP) para introduzir grupo ditiopiridil no anticorpo (Carlsson et al. Biochem. J. 173:723-737 (1978); Patente dos Estados Unidos N° 5,208,020). Numa segunda etapa, um maitansinóide reativo, com um grupo tiol como o DM1, é adicionado ao anticorpo modificado, resultando numa deslocação dos grupos tiopiridil nos anticorpos modificados e, na produção de conjugados maitansinóide citotóxico ligado ao dissulfeto/anticorpo (Patente dos Estados Unidos N° 5,208,020).

Os métodos atuais de conjugação de maitansinóides com anticorpos têm a desvantagem de sujeitar os anticorpos a duas etapas de reação, necessitando como tal duas etapas gel-filtração de purificação das proteínas para separar as proteínas das moléculas orgânicas pequenas não conjugadas, como as SPDP e os maitansinóides. Isto torna os métodos caros e demorados e, também resulta num baixo rendimento do produto.

Concordantemente, é bastante necessário um método para a conjugação de maitansinóides com agentes de ligação celular, em que o número de etapas da reação é reduzido, com a concomitante redução de tempo e gastos, e em que haja um aumento do rendimento.

RESUMO DA INVENÇÃO

De acordo com a invenção, é descrito um processo com apenas uma etapa, para a produção de conjugados citotóxicos de maitansinóides e agentes de ligação celular, como determinado na reivindicação 1. Os maitansinóides com uma parte de dissulfeto que carrega um grupo reativo, estão ligados a agentes de ligação celular, como os anticorpos, sem modificação anterior do agente de ligação celular. Este

processo de conjugação minimiza o tempo de reação e de processamento das moléculas de proteínas dos anticorpos sensíveis e também minimiza as etapas de purificação das proteínas melhorando, assim, o rendimento geral. Estes conjugados são úteis enquanto agentes terapêuticos que são entregues especificamente às células alvo e são citotóxicos.

Também aqui descritos, estão novos métodos para a síntese de maitansinóides com uma parte de dissulfeto que carrega um grupo reativo. Os maitansinóides são moléculas orgânicas que são sensíveis a condições aquosas de baixo pH (pH 5 e inferior) ou elevado pH (pH 8 e superior) e têm fraca solubilidade em soluções aquosas. O novo método aqui descrito ultrapassa estes problemas convertendo os maitansinóides em maitansinóides com um radical dissulfeto que carrega um grupo reativo, em solventes orgânicos ou misturas de solventes aquosos e orgânicos. Os derivados de maitansinóides reativos resultantes têm melhor solubilidade em soluções aquosas e podem ser conjugados com agentes de ligação celular numa reação de etapa única, em tampões aquosos sob condições suaves (pH 6-8). Uma vantagem adicional é que todos os maitansinóides intermediários neste processo podem ser completamente analisados antes de serem conjugados. É descrita a síntese de maitansinóides adequados, com uma parte de dissulfeto que carrega um grupo reativo, como os compostos **2** e **3a** discutidos abaixo.

Também é descrito um método para produção de outros derivados dos maitansinóides, como os compostos **6** e **10**, que podem ser usados na produção de maitansinóides com radical dissulfeto que carrega um grupo reativo, como os compostos **2** e **3a**.

Também são descritos vários novos maitansinóides, compostos **2**, **3a**, **6** e **10**, cujos usos incluem a produção de novos conjugados citotóxicos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra os resultados de uma experiência que avalia a capacidade dos conjugados do maitansinóide huN901, preparado com **2** pelo método da presente invenção, seguido da purificação com cromatografia Sephanil S300 (●) ou com Sephadex G25 (○) e o anticorpo huN901 não conjugado (▲) para eliminar as células positivas a antigénio.

A Figura 2 mostra as vias de síntese dos maitansinóides com um radical dissulfeto que carrega um grupo reativo.

A Figura 3 mostra uma via de síntese alternativa dos maitansinóides com um radical dissulfeto que carrega um grupo reativo.

A Figura 4 mostra uma via de síntese alternativa de conjugados citotóxicos.

A Figura 5 mostra uma via alternativa para a produção de L-DM1-TPA (composto **6**).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Esta invenção descreve um processo de etapa única para a síntese de conjugados citotóxicos que compreendem maitansinóides e agentes de ligação celular. Também é aqui descrito um processo de síntese de novos maitansinóides com um radical dissulfeto que carrega um grupo reativo, como os compostos **2** e **3a**. Além disso, é descrito um processo para a síntese de novos derivados de maitansinóides, como os compostos **6** e **10**. Também são descritos novos derivados de maitansinóides, como os compostos **6** e **10**, que são úteis na produção de maitansinóides com um radical dissulfeto que carrega um grupo reativo, como os compostos **2** e **3a**, que são úteis na síntese de novos conjugados citotóxicos.

A arte revela que é extremamente difícil modificar as drogas existentes sem diminuir a seu potencial citotóxico. Como se ensina aqui, este problema é ultrapassado por um método de modificação de moléculas de maitansinóides com partes químicas reativas, especialmente moléculas de maitansinóides que contêm um radical dissulfeto e um grupo

reativo, o que permite a ligação a agentes de ligação celulares apropriados. Como resultado, os novos maitansinóides descritos, com um radical dissulfeto que carrega um grupo reativo, preservam, e em alguns casos até aumentam, a potência citotóxica dos maitansinóides naturais.

Os conjugados de maitansinóides citotóxicos-agentes de ligação celular permitem a medida completa da ação citotóxica dos derivados de maitansinóides a ser aplicados de forma direcionada apenas contra células indesejadas, evitando, como tal, efeitos secundários devido aos danos provocados em células saudáveis não alvo. Assim, a invenção proporciona novos métodos de criação de agentes úteis na eliminação de células doentes ou anormais que devem ser mortas ou lizadas, como as células tumorais (particularmente células de tumores sólidos), células infectadas por vírus, células infectadas por microrganismos, células infectadas com parasitas, células autoimunes (células que produzem auto-anticorpos), células ativadas (as células envolvidas na rejeição de enxertos ou em doenças enxerto vs. hospedeiro) ou qualquer outro tipo de células doentes ou anormais, enquanto exibem os efeitos secundários mínimos.

Assim, a invenção ensina um método de etapa única para a produção de conjugados citotóxicos que compreendem maitansinóides e agentes de ligação celular. Também é aqui ensinado um método para a síntese de derivados de maitansinóides e maitansinóides com radical dissulfeto que carrega um grupo reativo, que permite a ligação química a um agente de ligação celular, enquanto mantém uma citotoxicidade elevada, tanto na forma ligada como na forma liberta, ou em ambos os estados. Também são aqui descritos derivados de maitansinóides úteis na produção de maitansinóides com um radical dissulfeto que carrega um grupo reativo e maitansinóides com um radical dissulfeto

que carrega um grupo reativo, úteis na síntese de novos conjugados citotóxicos.

Os conjugados citotóxicos aqui descritos compreende um ou mais maitansinóides ligados a um agente de ligação celular. De forma a ligar o maitansinóide ao agente de ligação celular, o maitansinóide deve ser primeiramente modificado.

Os maitansinóides que podem ser usados para produzir os derivados de maitansinóides reativos, capazes de serem ligados a um agente de ligação celular, são bem conhecidos na arte.

Os conjugados de maitansinóides citotóxicos-agentes de ligação celular permitem uma medida completa da ação citotóxica dos derivados de maitansinóides a serem aplicados de forma direcionada apenas contra células não desejadas, evitando assim efeitos secundários devido aos danos causados sobre células saudáveis não alvo. Assim, a invenção proporciona agentes úteis e novos métodos de criação dos mesmos, para a eliminação de células doentes ou anormais que devem ser mortas ou lizadas, como as células tumorais (particularmente células de tumores sólidos), células infetadas por vírus, células infetadas por microrganismos, células infetadas com parasitas, células autoimunes (células que produzem auto-anticorpos), células ativadas (as células envolvidas na rejeição de enxertos ou em doenças enxerto vs. hospedeiro) ou qualquer outro tipo de células doentes ou anormais, enquanto exibem os efeitos secundários mínimos.

Assim, a invenção ensina um método de etapa única para a produção de conjugados citotóxicos que compreendem maitansinóides e agentes de ligação celular. A invenção ensina ainda um método para a síntese de derivados de maitansinóides e maitansinóides com uma parte dissulfeto que carrega um grupo reativo que permite a ligação química a um agente de ligação celular, enquanto mantém uma

citotoxicidade elevada, tanto na forma ligada como na forma liberta, ou em ambos os estados. Finalmente, a invenção descreve derivados de maitansinóides úteis na produção de maitansinóides com uma parte dissulfeto que carrega um grupo reativo e, maitansinóides com uma parte dissulfeto que carrega um grupo reativo, úteis na síntese de novos conjugados citotóxicos.

O conjugado citotóxico, de acordo com a presente invenção, compreende um ou mais maitansinóides ligados a um agente de ligação celular. De forma a ligar o maitansinóide a um agente de ligação celular, o maitansinóide deve ser primeiramente modificado.

Os maitansinóides que podem ser usados na presente invenção para produzir os derivados de maitansinóides reativos, capazes de serem ligados a um agente de ligação celular, são bem conhecidos na arte e podem ser isolados a partir de fontes naturais, de acordo com métodos conhecidos ou preparados sinteticamente, de acordo com métodos conhecidos.

Exemplos de maitansinóides adequados incluem o maitansinol e os análogos do maitansinol. Exemplos de análogos do maitansinol adequados incluem os que têm um anel aromático modificado e os que têm modificações noutras posições.

Exemplos específicos de análogos do maitansinol adequados com um anel aromático modificado incluem:

- (1) C-19-dicloro (Patente dos Estados Unidos N°4,256,746) (preparado por redução LAH da ansamitocina P2);
- (2) C-20-hidroxi (ou C-20-dimetil) +/- C-19-dicloro (Patente dos Estados Unidos 4,361,650 e 4,307,016) (preparado por dimetilação usando *Strptomyces* ou *Actinomyces* ou decloração usando LAH); e
- (3) C-20-dimetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/- dicloro (Patente dos Estados Unidos N° 4,294,757) (preparado por acilação usando cloretos de acilo).

Exemplos específicos de análogos de maitansinol adequados com modificações de outras posições incluem:

- (1) C-9-SH (Patente dos Estados Unidos N° 4,424,219) (preparado por reação do maitansinol com H_2S ou P_2S_2);
- (2) C-14-alcoximetil (dimetoxi/ CH_2OR) (Patente dos Estados Unidos N° 4,331,598);
- (3) C-14-hidrometil ou aciloximetil (CH_2OH ou CH_2OAc) (Patente dos Estados Unidos N° 4,450,254) (preparado a partir de *Nocardia*);
- (4) C-15-hidroxi/aciloxi (Patente dos Estados Unidos 4,364,866) (preparado pela conversão do maitansinol pelo *Streptomyces*);
- (5) C-15-metoxi (Patente dos Estados Unidos 4,313,946 e 4,315,929) (isolado a partir de *Trewia mudiflora*);
- (6) C-18-N-dimetil (patente dos Estados Unidos N° 4,362,663 e 4,322,348) (preparado por dimetilação do maitansinol pelo *Streptomyces*); e
- (7) 4,5-dioxi (Patente dos Estados Unidos N° 4,371,533) (preparado pela redução pelo titânio tricloreto/LAH do maitansinol)

De forma a ligar o maitansinóide ao agente de ligação celular, o maitansinóide compreende um radical de ligação. O radical de ligação contém uma ligação química que permite libertação de maitansinóides completamente ativos num local particular. Ligações químicas adequadas são bem conhecidas na arte e incluem ligações dissulfeto, ligações ácido-lábeis, ligações fotolábeis, ligações peptidase lábeis e ligações ester lábeis. As preferidas são as ligações dissulfeto.

De acordo com a presente invenção, o radical de ligação compreende um grupo químico reativo. Numa forma de realização preferida, o grupo químico reativo pode ser covalentemente ligado ao maitansinol através dum radical de ligação numa ligação dissulfeto.

Os grupos químicos reativos particularmente preferidos são

os ésteres *N*-succinimidil e os ésteres *N*-sulfosuccinimidil.

Os maitansinóides particularmente preferidos compreendendo um radical de ligação que contém um grupo químico reativo são ésteres C-3 de maitansinol e os seus análogos, em que o radical de ligação contém uma ligação dissulfeto e o grupos químico reativo compreende um éster *N*-succinimidil ou *N*-sulfosuccinimidil.

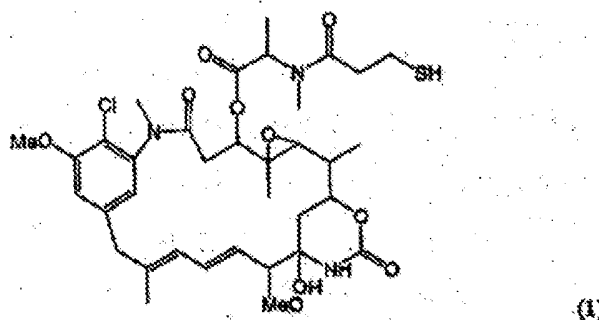
Várias posições nos maitansinóides podem servir como posição para a ligação do radical de ligação. Por exemplo, a posição C-3 com um grupo hidroxil, a posição C-14 modificada com o hidrometil, a posição C-15 modificada com o hidroxil e a posição C-20 com um grupo hidroxil, podem todas ser úteis. No entanto, a posição C-3 é preferida e a posição C-3 do maitansinol é especialmente preferida.

À medida que a síntese de ésteres de maitansinol com um radical livre é descrita abaixo, em termos de ligação dissulfeto contendo radicais de ligação, um perito na arte irá compreender que os radicais livres com outras ligações químicas (como descrito acima) também podem ser usados com a presente invenção, assim como podem outros maitansinóides. Exemplos específicos de outras ligações químicas incluem ligações ácido lábeis, ligações fotolábeis, ligações peptidase lábeis e ligações esterase lábeis. O descrito na Patente dos Estados Unidos Nº 5,208,020 ensina a produção de maitansinóides carregando tais ligações.

A síntese de derivados de maitansinóides e maitansinóides com um radical dissulfeto que carrega um grupo reativo pode ser descrita por referência às Figuras 1-4, onde os ésteres de maitansinóides contendo dissulfeto são preparados.

A maioria dos métodos aqui descritos utiliza maitansinóides contendo tiol (DM1), formalmente designado por *N*²-diacetil-*N*²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina, como reagente inicial. O DM1 é representado pela seguinte

fórmula estrutural (1):



Produção de Conjugados Citotóxicos

Os conjugados citotóxicos representacionais da invenção são anticorpos/maitansinóide, fragmentos de anticorpos/maitansinóide, factor de crescimento epidermal (EGF)/maitansinóide, hormona estimulante dos melanócitos (MSH)/maitansinóide, hormona estimulante da tiroide (TSH)/maitansinóide, estrogénio/maitansinóide, análogo do estrogénio/maitansinóide, androgénio/maitansinóide e análogo do androgénio/ maitansinóide.

O grupo reativo contendo maitansinóides reage com o agente de ligação celular para produzir conjugados citotóxicos. Estes conjugados podem ser purificados por HPLC ou por gel-filtração.

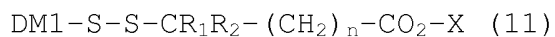
Esquema 1: Mais especificamente, uma solução de um anticorpo num tampão aquoso pode ser incubada com um excesso molar de maitansinóides com um radical dissulfeto que carrega um grupo reativo. A mistura de reação pode ser extinta por adição de excesso de amina (como por exemplo a etanolamina, taurina, etc.). O conjugado maitansinóide-anticorpo pode então ser purificado por gel-filtração.

O número de moléculas de maitansinóide ligadas por molécula de anticorpo pode ser determinado pela medição por espectrofotometria da razão da absorvância a 252 nm e 280 nm. Uma média de 1-10 moléculas de maitansinóide/molécula de anticorpo podem ser ligadas por este método.

Os conjugados de agentes de ligação celular com drogas de maitansinóides da invenção, podem ser avaliados no que diz respeito à sua capacidade de suprimir a proliferação de várias linhas celulares não desejadas *in vitro*. Por exemplo, linhas celulares como a linha A-431 do carcinoma epidermóide humano, a linha celular SW2 do cancro das células pequenas do pulmão em humano, a linha SKBR3 do tumor de mama humano e a linha Namalwa do linfoma Burkitt's podem ser facilmente usadas para análise da citotoxicidade destes compostos. As células a serem avaliadas podem ser expostas aos compostos durante 24 horas e as frações sobreviventes das células medidas em ensaios diretos por métodos conhecidos. Os valores IC_{50} podem então ser calculados a partir dos resultados dos ensaios.

Produção de Maitansinóides com um Radical Dissulfeto que Carrega um Grupo Reativo

Os novos maitansinóides com um radical dissulfeto que carrega um grupo reativo, aqui descritos, são os compostos representados pela fórmula 11:



em que R_1 e R_2 são independentemente H, CH_3 , C_2H_5 , alquilo superior linear ou ramificado,

em que n é de 1-5, e

em que X é uma parte de um éster ativo e pode ser N -succinimidil, N -Sulfosuccinimidil, N -ftalimidil, N -sulfoftalimidil, 2-nitrofenil, 4-nitrofenil, 2,4-dinitrofenil, 3-sulfonil-4-nitrofenil ou 3-carboxi-4-nitrofenil.

Exemplos de alquilos lineares incluem propil, butil, pentil e hexil.

Exemplos de alquilos ramificados incluem isopropil, isobutil, sec.-butil, tert.-butil, isopentil e 1-etil-propil.

Formas de realização preferidas da fórmula 11 incluem os maitansinóides com radical dissulfeto que carrega um

éster $\text{CO}_2\text{-X}$ reativo, em que X é um *N*-succinimidil ou *N*-sulfosuccinimidil. Formas de realização mais preferidas da fórmula 11 incluem os maitansinóides com um radical dissulfeto que carrega um grupo reativo, em que R_1 é H, R_2 é CH_3 , n é 2 e $\text{CO}_2\text{-X}$ é um éster *N*-succinimidil ativo (composto **2**) ou $\text{CO}_2\text{-X}$ é um éster *N*-sulfosuccinimidil ativo (composto **3a**).

Novos maitansinóides com um radical dissulfeto que carrega um grupo reativo podem ser preparados pelos novos métodos descritos em seguida.

Esquema 2a: os maitansinóides com um radical dissulfeto que carrega um éster *N*-succinimidil reativo (composto **2**) podem ser preparados por reação de $\text{N}^{2'}$ -diacetil- $\text{N}^{2'}$ -[3-(3-carboxi-1-motil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina (composto **6**) com *N*-hidroxisuccinimidina num solvente orgânico seco na presença de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida. HCl(EDC.HCL) a temperatura ambiente durante aproximadamente 1-12h. A completação da reação pode ser monitorizada com técnicas químicas padrão como a cromatografia de camada fina (TLC) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A seguir à completação da reação, o derivado do maitansinóide com um radical dissulfeto que carrega um éster *N*-succinimidil reativo (composto **2**) pode ser purificado usando cromatografia de gel de sílica ou HPLC. Outros agentes de condensação para além do EDC.HCL também podem ser usados para a reação, como o *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC).

Esquema 2b: O maitansinóide com um radical dissulfeto que carrega um éster *N*-succinimidil (composto **2**) pode ser preparado por um método alternativo. Uma solução de *N*-succinimidil 4-(2-piridilditio)-pentanoato (SPP) (composto **7**) em metanol é tratada com uma solução de DM1 em metanol. O tampão de acetato de sódio (pH 3-5) é adicionado e a mistura da reação é agitada sob uma atmosfera de árgon a

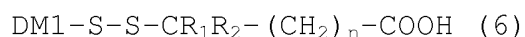
temperatura ambiente. O progresso da reação pode ser monitorizado por HPLC usando uma coluna Vydac C-18. O produto **2** pode ser purificado por HPLC.

Esquema 3a: O maitansinóide com um radical dissulfeto que carrega um éster de *N*-sulfosuccinimidil (composto **3a**) pode ser preparado por reação do *N*^{2'}-diacetil-*N*^{2'}-[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina (composto **6**) com o sal de sódio *N*-hidroxisulfosuccinimida (1-2 vezes mais excesso molar do que o ácido (**6**)) num solvente orgânico seco (como o cloreto de metileno, a dimetilformamida, o tetrahidrofurano, o dioxano, o dietiléter) na presença do 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida. HCl(EDC.HCl) (1-2 vezes mais excesso molar do que o ácido (**6**)). A completação da reação pode ser monitorizada usando técnicas químicas padrão como a TLC ou a HPLC. A seguir à completação da reação, o derivado de maitansinóide com o radical de dissulfeto que carrega o éster *N*-sulfosuccinimidil (composto **3a**) pode ser purificado por cromatografia de gel de sílica, ou por HPLC, ou por precipitação por adição de grandes volumes de acetato etílico (semelhante ao método geral de preparação do éster *N*-sulfosuccinimidil como descrito por Staros, *Biochemistry*, 1982, 21:3950-3955). Outros agentes de condensação para além do EDC.HCl podem ser usados para a reação.

Esquema 3b: O maitansinóide com um radical dissulfeto que carrega um éster de *N*-sulfosuccinimidil (composto **3a**) pode ser preparado por um método alternativo. Uma solução de *N*-sulfosuccinimidil 4-(2-piridilditio)-pentanoato (sulfo-SPP) (composto **8**) em metanol é tratada com uma solução de DM1 em metanol. O tampão de acetato de sódio (pH 3-5) é adicionado e a mistura da reação é agitada sob uma atmosfera de árgon a temperatura ambiente. O progresso da reação pode ser monitorizado por HPLC. O produto **3a** pode se purificado por HPLC.

Produção de Derivados de Maitansinóides

Os esquemas 4a e 4b descrevem novos métodos para a produção de um derivado de maitansinóide a partir do DM1 (1). Este derivado do maitansinóide **6** é formalmente designado por N^{2'}-diacetil-N^{2'}-[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina e representado pela fórmula:



R₁ = H, R₂ = CH₃, n = 2.

O derivado de maitansinóide **6** pode ser usado diretamente na preparação de um número de conjugados maitansinóides citotóxicos-agentes de ligação celular. Preferencialmente, o derivado de maitansinóide **6** é usado na produção de novos maitansinóides com um radical dissulfeto que carrega um grupo reativo, usando os novos métodos determinados nos **Esquemas 2a e 3a**.

Esquema 4a: O derivado de maitansinóide **6** pode ser sintetizado por troca do dissulfeto entre o DM1 e o 4-(2-piridilditio)-ácido pentanóico (composto **5**). Uma solução de 4-(2-piridilditio)-ácido pentanóico em metanol é tratada com uma solução de DM1 em metanol. O tampão de fosfato de potássio é adicionado e a mistura da reação é agitada sob uma atmosfera de árgon à temperatura ambiente. O progresso da reação pode ser monitorizado por HPLC. O produto **6** pode ser purificado por HPLC. O produto purificado pode ser reanalisado por HPLC. A identidade do produto pode ser estabelecida por espectrometria de massa de alta resolução do sal de sódio de **6**.

Esquema 4b: O derivado de maitansinóide **6** pode ser preparado por um método alternativo em que o maitansinol é acoplado com a mistura de dissulfeto N-metil-N-(3-mercaptopropanoil)-L-alanina e trimetilsilietil 4-mercaptopentanoato (composto **9**) para produzir o éster de maitansinol (composto **10**), o qual é posteriormente desprotegido para originar o composto **6**.

Preparação de Agentes de Ligação Celular

A eficácia dos compostos da invenção enquanto agentes terapêuticos depende na seleção rigorosa de um agente de ligação celular. Os agentes de ligação celular podem ser de qualquer tipo presentemente conhecido ou, que se torne conhecido e inclua péptidos ou não péptidos. Normalmente, estes podem ser anticorpos (especialmente anticorpos monoclonais), linfoquinas, hormonas, factores de crescimento, vitaminas, moléculas transportadoras de nutrientes (como a transferrina) ou qualquer outro tipo de moléculas de ligação celular ou substância.

Exemplos mais específicos de agentes de ligação celular que podem ser usados incluem:

- anticorpos policlonais;
- anticorpos monoclonais;
- fragmentos de anticorpos como Fab, Fab' e 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));
- interferão (por exemplo alfa, beta, gama);
- linfoquina como a IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;
- hormonas como a insulina, TRH (hormona libertadora de tirotropina), MSH (hormona estimulante dos melanócitos), hormonas esteroides como os androgéneos e os estrogénios;
- factores de crescimento e factores estimulantes de colónias como o EGF, TGF-alfa, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF e GM-CSF (Burgess, *Immunology Today* 5:155-158 (1984));
- transferina (O'keefe et al. *J. Biol. Chem.* 260:932-937 (1985)); e
- vitaminas como o folato.

As técnicas de anticorpos monoclonais permitem a produção de agentes de ligação celular extremamente específicos na forma de anticorpos monoclonais específicos. Particularmente bem conhecidas na arte são as técnicas para a criação de anticorpos monoclonais produzidos por ratos, ratazanas, hamsters ou qualquer outro mamífero imunizado

com os antígenos de interesse, como as células alvo intactas, antígenos isolados a partir das células alvo, vírus inteiros, vírus inteiros atenuados e proteínas virais como proteínas de revestimento viral. Também podem ser usadas células humanas sintetizadas. Outro método de criação de anticorpos monoclonais é o uso de bibliotecas de fagócitos de scFv (região variável de cadeia única), especificamente scFv humanos (*ver, por exemplo, Griffiths et al., Patente dos Estados Unidos N° 5,885,793 e 5,969,108; McCafferty et al., WO92/01047; Liming et al., WO 99/06587*). Além disso, os anticorpos ressurgidos descritos na Patente dos Estados Unidos N° 5,639,641 também podem ser usados, como podem os anticorpos humanizados.

A seleção do agente de ligação celular apropriado é uma questão de escolha que depende da população celular específica que deve ser considerada alvo mas, de forma geral os anticorpos monoclonais humanos são preferidos se houver um apropriado disponível.

Por exemplo, o anticorpo monoclonal J5 é um anticorpo IgG_{2a} murino que é específico para o Antígeno de Leucemia Linfoblástica Aguda Comum (CALLA) (Ritz et al. *Nature* 283:583-585 (1980)) e pode ser usado se as células alvo expressarem o CALLA como na doença da leucemia linfoblástica aguda. De forma semelhante, o anticorpo monoclonal anti-B4 é uma IgG₁ murina que se liga ao antígeno CD19 nas células B (Nadler et al. *J. Immunol.* 131:244-250 (1983)) e pode ser usado se as células alvo foram células B ou células doentes que expressem este antígeno como no Linfoma não-Hodgkin ou na leucemia linfoblástica crônica.

Adicionalmente, o GM-CSF que se liga às células mieloides pode ser usado como um agente de ligação celular em células doentes de leucemia mieloide aguda. A IL-2 que se liga às células T ativadas pode ser usada para prevenir a rejeição de enxertos transplantados, para a terapia e

prevenção da doença enxerto-versus-hospedeiro e para o tratamento de leucemia aguda das células T. A MSH que se liga aos melanócitos pode ser usada para o tratamento de melanoma.

Os cancros da mama e de testículos podem ser marcadas com sucesso com estrogénio (ou análogos de estrogénio) ou androgénio (ou análogos de androgénio) respetivamente, como agentes de ligação celular.

EXEMPLOS

A invenção será agora ilustrada por referência a exemplos, dos quais os Exemplos 2a-4 são apresentados, não enquanto formas de realização da invenção mas como exemplos que são úteis para entender a invenção. A menos que referido o contrário, todas as percentagens, razões, partes, etc. são de peso. Os exemplos descritos abaixo são moléculas em que R_1 é H, R_2 é CH_3 e n é 2. Uma síntese semelhante pode ser levada a cabo para outras moléculas em que R_1 e R_2 são, independentemente H, CH_3 , C_2H_5 ou alquilos superiores; e em que n é 1-5.

EXEMPLO Ia

Preparação de conjugados citotóxicos usando o maitansinóide 2:

Uma solução de anticorpo huN901 (2.5 mg/ml) num tampão aquoso (50 mM de fosfato de potássio, 50 mM de cloreto de sódio, 2 mM de sal dissódico de ácido etilenodiaminotetraacético), pH 6.5 foi incubada com um excesso molar de 6 vezes de maitansinóide 2 em dimetilacetamida (DMA) para originar uma concentração final de DMA de 20%. A reação prosseguiu durante 13h a temperatura ambiente. A mistura de reação foi dividida e duas porções. Uma porção foi purificada por passagem numa coluna de gel filtração Sephadex G25 e a segunda porção foi purificada por passagem numa coluna de gel filtração Sephacryl S300. Em cada caso, as frações que contêm o conjugado monomérico foram reunidas. A concentração do

conjugado foi determinada por espectrofotometria usando os coeficientes de extinção conhecidos para os componentes do anticorpo e do DM1 a 280 e 252 nm (para o huN901: $\epsilon_{280\text{nm}}=217,560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{252\text{nm}}=80,062 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; para o DM1: $\epsilon_{280\text{nm}}=5,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{252\text{nm}}=26,790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

A purificação por cromatografia Sephadex G25 origina um conjugado contendo, em média, 2.08 moléculas de DM1 ligadas por molécula de anticorpo (rendimento baseado no anticorpo inicial = 60%). Purificação por cromatografia com Sephacryl S300 resulta num conjugado contendo, em média, 1,61 de moléculas DM1 ligadas por molécula de anticorpo rendimento com base no anticorpo inicial = 64%)

EXEMPLO 1b

Preparação de conjugados citotóxicos usando o maitansinóide 3a:

Uma solução do anticorpo huN901 (2.5 mg/ml) em tampão aquoso (50 mM de fosfato de potássio, 50 mM de cloreto de sódio, 2 mM de sal dissódico de ácido etilenodiaminotetraacético), pH 6.5, foi incubada com um excesso molar de 12 vezes de maitansinóide 3a em dimetilacetamida (DMA) para originar uma concentração final de DMA de 20%. A reação continuou durante 11h à temperatura ambiente. A mistura de reação foi dividida em duas porções. Uma porção foi purificada por passagem numa coluna de gel filtração Sephadex G25 e a segunda porção foi purificada por passagem numa coluna de gel filtração Sephacryl S300. Em cada caso, as frações que contêm o conjugado monomérico foram reunidas. A concentração do conjugado foi determinada por espectrofotometria usando os coeficientes de extinção conhecidos para os componentes do anticorpo e do DM1 a 280 e 252 nm (para o huN901: $\epsilon_{280\text{nm}}=217,560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{252\text{nm}}=80,062 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; para o DM1: $\epsilon_{280\text{nm}}=5,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{252\text{nm}}=26,790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

A purificação por cromatografia Sephadex G25 origina um conjugado contendo, em média, 4.89 moléculas de DM1

ligadas por molécula de anticorpo (rendimento baseado no anticorpo inicial = 59%). A purificação por cromatografia Sephacryl S300 origina um conjugado contendo, em média, 4.16 moléculas de DM1 ligadas por molécula de anticorpo (rendimento baseado no anticorpo inicial = 58%).

EXEMPLO 2a

Síntese do derivado de maitansinóide (2) que carrega um éster *N*-succinimidil reativo

Todas as reações foram realizadas sob uma atmosfera de argon. Todos os reagentes foram adquiridos através da Aldrich Chemical Co., Nova Jersey. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (^1H NMR) foram adquiridos num instrumento Bruker 400 MHz e os espectros de massa foram adquiridos num instrumento Bruker Daltonics Esquire 3000 usando ionização electrospray.

A síntese do maitansinóide contendo tiol (L-DM1, 1) foi anteriormente descrita (Patente dos Estados Unidos N° 5,208,020).

A preparação do 4-(2-piridilditio)- ácido pentanóico (PPA, 5): Um frasco de 1 L com duas bocas foi equipado com uma barra de agitação, um funil e um termómetro. O frasco foi carregado com 150 g de 1,3-dibromobutano (0.74 mol) e 700 ml de sulfóxido de dimetil. Uma solução de cianeto de sódio (37.5 g, 0.76 mol) em água desionizada (79 ml) foi adicionada gota a gota a uma taxa que não permitiu que a temperatura da reação excedesse os 65°C. Após a adição estar completa, a reação foi agitada durante a noite. A mistura foi diluída com 700 ml de água desionizada e extraída com uma solução de 1:1 de acetato etílico:hexanos (2x 1.4 L). As camadas orgânicas foram combinadas e lavadas sequencialmente com 700 ml de água desionizada e 700 ml de cloreto de sódio aquoso saturado. O solvente foi evaporado

sob pressão reduzida (~ 15 Torr). O resíduo foi dissolvido

em 210 ml de etanol de grau reagente e transferido para um frasco de 1L. A água desionizada (210 ml) e a tiouréia (66.4 g, 0.87 mol) foram posteriormente adicionadas ao frasco. O frasco foi equipado com um condensador de refluxo e foi aquecido num banho de óleo com um agitador para originar um refluxo médio. Após 4 horas o banho de óleo foi removido e o frasco foi arrefecido à temperatura ambiente. A solução de 10 M de hidróxido de sódio (500 ml) foi adicionada e a mistura foi aquecida com um banho de óleo até um refluxo médio, com agitação durante a noite. O banho de óleo foi removido e o frasco foi arrefecido à temperatura ambiente. A solução foi transferida para um funil separador e lavada duas vezes com porções de 500 ml de acetato etílico. A camada aquosa foi transferida para um frasco de 2 L e arrefecida num banho de gelo/água. O acetato etílico (1 L) foi adicionado e os conteúdos foram rapidamente agitados à medida que o HCl concentrado foi adicionado, até que a camada aquosa testada tivesse um pH de aproximadamente 2. A camada de acetato etílico foi separada e a camada aquosa foi extraída com acetato etílico (2 x 1L). As camadas orgânicas foram combinadas e concentradas por evaporação rotativa à temperatura ambiente para originar um 4-mercapto ácido pentanóico, que foi usado na etapa seguinte sem mais purificação.

Um frasco de 2 L contendo uma barra de agitação foi carregado com 2-2'-ditiopiridina (300g, 1.36 mol), etanol de grau reagente (1 L) e ácido acético glacial (42ml). Uma solução de 4-mercapto ácido pentanóico bruto e acetato etílico (400 ml) foi adicionada gota a gota durante 15 minutos e a reação foi agitada sob árgon durante mais 2 horas. O solvente foi removido por evaporação rotativa e o

resíduo foi tomado num mínimo de acetato etílico e purificado por cromatografia de coluna usando uma coluna de gel de sílica (6.25 x 27 cm). A coluna foi eluída com 4:1 hexanos:acetato etílico até todos os 2-2'-ditiopiridina (Aldritiol-2) que não reagiram serem removidos. A coluna foi então eluída com 4:1 hexanos:acetato etílico contendo ácido acético a 2%. A eluição foi monitorizada por TLC e as fracções foram combinadas. O solvente foi então removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para originar 4-(2-piridilditio)-ácido pentanóico (PPA, 5) puro como um sólido branco (40 g, 23% de rendimento geral). ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.39 (d, 3H), 2.0 (t, 2H), 2.56 (t, 2H), 2.8-3.3 (m, 1H), 7.6-7.8 (m, 2H), 8.4-8.6 (m, 1H), 11.68 (s, 1H).

Preparação de $\text{N}^{2'}$ -diacetil- $\text{N}^{2'}$ -[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio) -1-oxopropil]-maitansina(L-DM1-TPA, 6): uma solução de 4-(2-piridilditio)-ácido pentanóico (5, 24 mg, 0.10 mmol) e L-DM1 (1, 30 mg, 0.041 mmol) em metanol destilado em vidro (5 ml) foi vigorosamente agitada e 3 ml de um tampão aquoso (200 mM KH_2PO_4 , 2 mM EDTA, pH7.6) foram adicionados gota a gota. A reação foi deixada a repousar durante a noite e o produto foi purificado por HPLC usando uma coluna Vydac C-18, 10 x 250 mm, 30°C, taxa de fluxo de 4.75 ml/min com um gradiente linear de acetonitrilo (de 15% 85% durante 30 min) num tampão de acetato de amónia de 40 mM, pH 7.2. L-DM1-TPA (6) eluído com um tempo de retenção de 12 min. O produto foi recolhido à medida que o sal de amónia foi tomado em 15 ml de acetato etílico. A solução foi lavada com sucesso com 4 ml de 1 M HCl seguido por 3 ml de cloreto de sódio saturado. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido sob vácuo para originar 15 mg (37% de rendimento) do produto 6. A identidade do produto foi estabelecida por espectrometria de massa de alta resolução: calculado para o ião molecular sodificado = 892.2891, Encontrado = 892.2955. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.84 (d, 1H, J = 1 Hz), 6.76 (dd, 1H, J = 7,

1 Hz), 6.59 (dd, 1H, $J = 14, 11$ Hz), 6.32-6.64 (m, 2H), 5.6-5.7 (m, 1H), 5.13-5.23 (m, 1H), 4.83 (dt, 1H, $J = 9.3$ Hz), 4.31 (dd, 1H, $J = 12.1$ Hz), 3.99 (s, 3H), 3.63 (dd, 1H, $J = 13, 1$ Hz), 3.49 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 3.36 (s, 3H), 3.22 (d, 3H, $J = 1$ Hz), 3.12 (dd, 1H, $J = 12.1$ Hz), 2.75-2.91 (m, 5H), 2.54-2.72 (m, 4H), 2.34-2.52 (m, 2H), 2.20 (dd, 3H, $J = 13.1$ Hz), 1.7-1.9 (m, 4H), 1.66 (s, 3H), 1.42-1.5 (m, 2H), 1.37 (dd, 3H, $J = 9.1$ Hz), 1.2-1.3 (m, 7H), 0.81 (s, 3H).

Preparação do éster de N^{2'}-diacetil-N^{2'}-[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina N-succinimidil (L-DM1-TPA éster succinimidil, 2): Uma solução de L-DM1-TPA (6) (10 mg, 0.011 mmol) em cloreto de metileno (1.5 ml) foi tratada com N-hidrosuccinimida (10 mg, 0.086 mmol) e 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida.HCl (21 mg, 0.11 mmol) com agitação vigorosa. A reação continuou durante 2 horas após o que, aproximadamente a metade do solvente foi removida sob vácuo. A restante solução foi sujeita a preparativos para a cromatografia de camada fina (duas placas de sílica fina de 2000 microns) usando uma fase móvel de (cloreto de metileno:metanol 95:5). A banda do produto desejado (2) foi removida da placa e agitada com 20 ml de (cloreto de metileno:metanol 80:20) e filtrada a vácuo através dum funil de vidro sinterizado. O filtrado foi concentrado sob vácuo para originar (8 mg, 0.0083 mmol, 75% de rendimento) de produto. A análise espectral de massa originou um pico de ião consistente com M⁺+Na 989.4. A fragmentação de 989.4 iões originou iões filhos, os quais foram também consistentes com a estrutura de 2. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.96 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz), 6.81 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz), 6.81 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz), 6.48 (dd, 1H, $J = 15.11$ Hz), 6.27 (s, 1H), 6.14 (d, 1H, $J = 11$ Hz), 5.53 (dd, 1H, $J = 15.93$ Hz), 5.41 (q, 1H, $J = 6.9$ Hz), 4.36 (dd, 1H, $J = 12.1$ Hz), 3.99 (s, 3H), 3.66 (s, 1H), 3.54 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz), 3.4-3.54 (m, 5H), 3.36

(s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 3.12 (d, 1H, $J = 12.7$ Hz), 2.88 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz), 2.7 (s, 4H), 2.5-2.65 (m, 5H), 2.1 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz), 1.69 (s, 3H), 1.45-1.55 (m, 2H), 1.1-1.3 (m, 10H), 0.83 (s, 3H).

EXEMPLO 2b

Método alternativo para a síntese do derivado de maitansinóide (2) que carrega um éster *N*-succinimidil reativo

Preparação do *N*-succinimidil 4-(2-piridilditio)-ácido pentanóico (SPP, 7): Uma solução de 4-(2-piridilditio)-ácido pentanóico (5.30 g, 123 mmol) em coreto de metileno (525 ml) foi tratada com *N*-hidroxisuccinimida (14.3 g, 124 mmol) e 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida.HCl (31.8 mg, 165 mmol). Os conteúdos foram agitados à temperatura ambiente durante 2 horas, após as quais foram adicionados 750 ml de acetato etílico. A solução foi lavada com 0.5% de ácido acético aquoso (3 x 350 ml) e 1 vez com 150 ml de cloreto de sódio aquoso saturado. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi removido sob vácuo por evaporação rotativa. O resíduo foi retirado num volume mínimo de acetato etílico e carregada numa coluna de sílica de 6.25 x 20 cm, preenchido por lama com 1:1 hexanos: acetato etílico. A coluna foi eluída com 1:1 hexanos:acetato etílico. As fracções contendo o produto foram combinadas e o solvente foi removido por evaporação rotativa. O óleo resultante (31g) foi retirado num volume mínimo de etanol de grau reagente quente e magneticamente agitado à medida que 350 ml de éter de etílico foram adicionados, seguidos por 100 ml de hexanos. O precipitado resultante foi recolhido por filtração a vácuo e seco num forno de vácuo a 30 graus C durante 12 horas, originando 18.7 g de SSP (7) como um sólido branco (18.7 g, 45% de rendimento). ^1H NMR (CDCl₃) δ 1.39 (d, 3H), 2.0 (t, 3H), 2.56-3.4 (m, 7H), 6.8-7.2 (m, 1H), 7.6-7.8 (m, 2H), 8.4-8.6 (d, 1H). Análise elementar:

Calculado: %C 49.4, %H 4.70, %N 8.20, %S 18.80. Encontrado: %C 49.3, %H 4.68, %N 8.18, %S 18.94.

Preparação do éster de N^{2'}-diacetil-N^{2'}-[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina N-succinimidil (L-DM1-TPA éster succinimidil, 2): Uma solução do éster N-succinimidil de 4-(2-piridilditio)-ácido pentanóico (SPP, 7, 3 mg, 15 µmol) em metanol (15 ml) reagiu com DM1 (1, 0.58 mg, 0.8 µmol) em dimetilacetamida (0.1' ml). Um tampão de fosfato de potássio (0.5 ml de uma solução de 0.2 M, pH 6, 2 mM de EDTA) foi adicionado e a mistura da reação foi agitado sob uma atmosfera de árgon à temperatura ambiente. O progresso da reação foi monitorizado por TLC em gel de sílica e o produto foi purificado por TLC de gel de sílica preparatória, como descrito acima.

EXEMPLO 3a

Síntese de um derivado de maitansinóide (3a) que carrega um éster N-sulfosuccinimidil reativo

Preparação do éster de N^{2'}-diacetil-N^{2'}-[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina N-sulfosuccinimidil (L-DM1-TPA éster sulfosuccinimidil, 3a): L-DM1-TPA (6.2 mg, 0.002 mmol) foi dissolvido em dimetilacetamida (0.25 ml), ao qual foi adicionado um sal de sódio de N-hidroxisulfosuccinimida (1.0 mg, 0.0046 mmol) e diciclohexilcarbodiimida (1.0 mg, 0.0048 mmol). Após 3 horas, foram adicionados 0.5 ml de álcool diisopropil e o precipitado resultante foi removido por filtração. A análise HPLC (coluna Vydac C-18, 10 x 250 coluna C18, 30°C, taxa de fluxo 4.75 ml/min, 50 mM de tampão pH 3.8 de formato de trietilamônio com um gradiente linear de metanol (de 30% a 90% durante 30 minutos) do filtrado mostrando dois picos, um de L-DM1-TPA não reagido a 22 min e um de L-DM1-TPA éster de sulfosuccinimidil a 19 min. O composto eluído aos 19 min foi isolado e analisado por espectrometria de massa, mostrando que tinha o pico esperado consistente com o íon molecular não sodificado (M⁺

+ 2Na) de 3a, m/e 1091.4. A fragmentação adicional de 1091.4 iões origina iões filhos previsíveis, m/e 1073.4 (M^+ + 2Na-H₂O), 874.4 (M^+ + 2Na-N-hidroxisulfosuccinimidina sodificada).

A preparação do éster de N^{2'}-diacetil-N^{2'}-[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina (L-DM1-TPA, 6) e 4-(2-piridilditio)-ácido pentanóico (PPA, 5) ocorreu como determinado no EXEMPLO 2a acima.

EXEMPLO 3b

Método alternativo para a síntese do derivado de maitansinóide (3a) que carrega um éster N-sulfosuccinimidil reativo

O maitansinóide 3a também pode ser preparado diretamente por reação do DM1 (1) com o sal de sódio de sulfoSPP (o éster N-sulfosuccinimidil do 4-(2-piridilditio)-ácido pentanóico, 8). O sal de sódio sulfoSPP (8a) pode ser preparado por acoplamento do PPA (5) com o sódio de sal de N-hidroxisulfosuccinimida na presença de EDC.HCl, pelo método descrito para o SPP (7) (ver o Exemplo 2a acima). A reação do DM1 com o excesso molar de 20 vezes do 8a em dimetilacetamida e o tampão pH 6 de fosfato de potássio contendo 2 mM EDTA a temperatura ambiente, origina o maitansinóide 3a, o qual pode ser purificado por HPLC como descrito no Exemplo 3a.

EXEMPLO 4

Método alternativo para a síntese do derivado de maitansinóide (6)

O maitansinóide 6 também pode ser diretamente preparado a partir do maitansinol, como descrito na Figura 5. O composto 9 é preparado por troca de dissulfeto entre o éster (2-trimetilsilil)etílico do PPA (5) e o N-metil-N-(3-mercaptop-1-oxopropil)-L-alanina. O produto pode ser purificado por cromatografia de coluna em gel de sílica. A esterificação do maitansinol com 6 equivalentes de 9, na presença de DCC (7.2 eq) e dimetilaminopiridina (DMAP) ou

cloreto de zinco (1 eq) em diclorometano, como previamente descrito (Patente dos Estados Unidos 5,208,020= origina o maitansinóide 10, o qual pode ser purificado por meios químicos padrão, como a cromatografia em gel de sílica ou HPLC. O tratamento de 10 com 5 equivalentes de fluoreto de tetrabutylamônio em tetrahidrofurano durante 30 min a temperatura ambiente resulta na clivagem do grupo protetor do (trimetilsilil)etílico para se obter **6**, o qual pode ser purificado por HPLC, como descrito no Exemplo 2a.

EXEMPLO 5

Avaliação da potência *in vitro* dos conjugados huN901-DM1

Os conjugados huN901-DM1 preparados novo método de etapa única, foram avaliados no que diz respeito à citotoxicidade *in vitro* em relação a células que expressassem antígenos, como descrito a seguir. Um clone das células A431 que expressam constitutivamente o antígeno para o huN901 (NCAM/CD56) foram usadas neste ensaio. As células foram colocadas em placas tratadas de cultura tecidual com 6 poços a uma densidade de 2×10^3 células/poço em 2 ml de um meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal de vitelo a 10% e penicilina + estreptomicina. Um conjugado huN901-DM1 o anticorpo huN901 controle foi adicionado aos poços no momento da colocação e as culturas foram incubadas numa incubadora de culturas celulares a 37°C, 6% CO₂, durante 5 a 7 dias, para formarem colônias não inferiores a 25 células/colônia. As placas foram então lavadas com PBS, e posteriormente fixadas/coradas durante 30 minutos a temperatura ambiente com formaldeído a 10%/ cristal violeta (w/v) a 0.2% em PBS. Os poços foram enxaguados 3 vezes com água, secos pelo ar e as colônias foram contadas num microscópio de disseção de baixa ampliação. As frações sobreviventes foram calculadas como o número de colônias nos poços tratados por drogas/ número de colônias nos poços não tratados.

Os resultados (Figura 1) indicam que os conjugados

huN901-DM1 preparados pelo método de uma etapa usando o maitansinóide 2, seguido pela purificação tanto por cromatografia Sephadex G25 como por cromatografia Sephacryl S300, foram eficazes a eliminar células positivas a antigénio, com um valor de IC_{50} de 1×10^{-10} M. Em contraste, o anticorpo huN901 não conjugado era não tóxico.

A invenção pode ser melhor compreendida com referência às seguintes cláusulas não limitantes:

1. Um método para produzir um maitansinóide com um radical dissulfeto que carrega um éster reativo, compreendendo a reação do o $N^{2'}$ -diacetil- $N^{2'}$ -[3-carboxialquilditio)-1-oxopropil]-maitansina com um composto hidroxil para obter um maitansinóide com um radical dissulfeto que carrega um éster reativo.
2. No método, de acordo com a cláusula 1, o $N^{2'}$ -diacetil- $N^{2'}$ -[3-carboxialquilditio)-1-oxopropil]-maitansina é o $N^{2'}$ -diacetil- $N^{2'}$ -[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina (6).
3. O método de acordo com a cláusula 1 compreende ainda uma etapa de isolamento do éster do maitansinóide produto da reação.
4. No método de acordo com a cláusula 1, o composto hidroxil referido é selecionado entre um grupo constituído por *N*-hidroxisuccinimida, *N*-hidrosulfosuccinimida, *N*-hidroxiftalimida, *N*-hidroxisulfoftalimida, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, 3-sulfonil-4-nitrofenol e 3-carboxi-4-nitrofenol.
5. No método de acordo com a cláusula 1, o composto hidroxil referido é uma *N*-hidroxisuccinimida.
6. No método de acordo com a cláusula 1, o composto hidroxil referido é uma *N*-hidroxisulfosuccinimida.
7. No método de acordo com a cláusula 1, o composto hidroxil referido é a *N*-hidroxisuccinimida e o referido maitansinóide com um radical dissulfeto que carrega um éster reativo é um éster *N*-succinimidil da $N^{2'}$ -diacetil-

$N^{2'}-[3-(3\text{-carboxi-1-metil-propilditio})-1\text{-oxopropil}]-$
maitansina **(2)**.

8. No método de acordo com a cláusula 1, o composto hidroxil referido é uma *N*-hidroxisulfosuccinimida e o referido maitansinóide com um radical dissulfeto que carrega um éster reativo é um éster *N*-sulfosuccinimidil da $N^{2'}\text{-diacetil-}N^{2'}-[3-(3\text{-carboxi-1-metil-propilditio})-1\text{-oxopropil}]-$ maitansina **(3a)**.

9. Um método para produzir um maitansinóide com um radical de dissulfeto que carrega um éster reativo, que compreende a reação de um maitansinóide contendo tiol com um éster de ácido carboxílico reativo contendo um dissulfeto reativo.

10. O método de acordo com a cláusula 9 compreende ainda uma etapa de isolamento do maitansinóide com um radical de dissulfeto que carrega um éster reativo.

11. No método de acordo com a cláusula 9, o éster de ácido carboxílico reativo contendo um dissulfeto reativo é o *N*-succinimidil 4-(2-piridilditio)-pentanoato **(7)**.

12. No método de acordo com a cláusula 9, o maitansinóide com um radical de dissulfeto que carrega um éster reativo é o éster *N*-succinimidil do $N^{2'}\text{-diacetil-}N^{2'}-[3-(3\text{-carboxi-1-metil-propilditio})-1\text{-oxopropil}]-$ maitansina **(2)**.

13. Um método para produzir um maitansinóide com um radical dissulfeto que carrega um éster reativo compreende a reação de um maitansinóide contendo tiol com um éster de ácido carboxílico reativo, solúvel em água, contendo um dissulfeto reativo.

14. O método de acordo com a cláusula 13 compreende ainda uma etapa de isolamento do maitansinóide com um radical dissulfeto que carrega um éster reativo.

15. No método de acordo com a cláusula 13, o éster de ácido carboxílico reativo, solúvel em água, contendo um dissulfeto reativo é o sulfosuccinimidil 4-(2-

piridilditio)-pentanoato (8).

16. No método de acordo com a cláusula 13, o maitansinóide com um radical dissulfeto que carrega um éster reativo é o éster N-sulfosuccinimidil do N^{2'}-diacetil-N^{2'}-[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina (3).

17. Um método para produzir o N^{2'}-diacetil-N^{2'}-[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina (6) compreende a reação dum maitansinóide contendo tiol com o 4-(2-piridilditio)-ácido pentanóico (5).

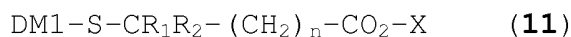
18. O método de acordo com a cláusula 17, inclui ainda a etapa de isolamento do N^{2'}-diacetil-N^{2'}-[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina (6).

19. Um método para produzir N^{2'}-diacetil-N^{2'}-[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina (6) que compreende as etapas de

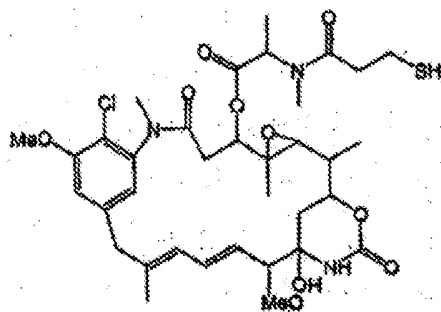
- (a) combinação do N-metil-N-(3-mercaptopropanoil)-L-alanina e do trimetilsililetil 4-mercaptopentanoato (9) para formar um composto misto de dissulfeto
- (b) acoplar um maitansinóide ao produto de (a) para produzir um éster de maitansinóide (10), e
- (c) desproteger o éster de maitansinóide 10

20. O método, de acordo com a cláusula 19 compreende ainda a etapa de isolamento do N^{2'}-diacetil-N^{2'}-[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina (6).

21. Um maitansinóide com um radical dissulfeto que carrega um éster reativo que compreende a fórmula 11 seguinte:



em que DM1 é



em que R_1 e R_2 são, independentemente H, CH_3 , C_2H_5 , um alquilo linear superior ou um alquilo ramificado superior,

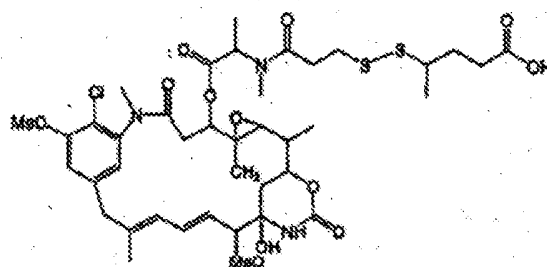
em que n é 1-5, e

em que X é uma parte de um éster ativo e pode ser *N*-succinimidil, *N*-sulfosuccinimidil, *N*-ftalimidil, *N*-sulfoftalimidil, 2-nitrofenil, 4-nitrofenil, 2,4-dinitrofenil, 3-sulfonil-4-nitrofenil ou 3-carboxi-4-nitrofenil.

22. No derivado de maitansinóide reativo, de acordo com a cláusula 21, R_1 é H, R_2 é CH_3 , n é 2 e X é *N*-succinimidil.

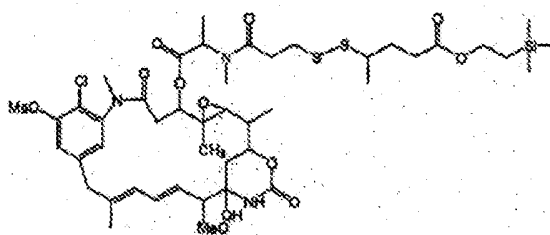
23. No derivado de maitansinóide reativo, de acordo com a cláusula 21, R_1 é H, R_2 é CH_3 , n é 2 e X é *N*-sulfosuccinimidil.

24. O $N^{2'}$ -diacetil- $N^{2'}$ -[3-(3-carboxi-1-metil-propilditio)-1-oxopropil]-maitansina (6) compreende a seguinte fórmula:



25. Um éster de maitansinóide (10) compreende a seguinte fórmula:

EP2348024B1



REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora tenha sido tomado muito cuidado na compilação das referências, não se poderão excluir erros e omissões e o IEP não assume qualquer responsabilidade neste sentido.

Documentos de Patente citados na descrição

- US 3896111 A [0009]
- US 4151042 A [0009]
- US 4248870 A [0010]
- US 4265814 A [0010]
- US 4308268 A [0010]
- US 4308269 A [0010]
- US 4309428 A [0010]
- US 4317821 A [0010]
- US 4322348 A [0010] [0035]
- US 4331598 A [0010] [0035]
- US 4137230 A [0010]
- US 4260608 A [0010]
- US 5208020 A [0010] [0015] [0041] [0075] [0085]
- US 4256746 A [0034]
- US 4361650 A [0034]
- US 4307016 A [0034]
- US 4294757 A [0034]
- US 4424219 A [0035]
- US 4450254 A [0035]
- US 4364866 A [0035]
- US 4313946 A [0035]
- US 4315929 A [0035]
- US 4362663 A [0035]
- US 4371533 A [0035]
- US 5885793 A, Griffiths [0064]
- US 5969108 A [0064]

- WO 9201047 A, McCafferty [0064]
- WO 9906587 A, Liming [0064]
- US 5639641 A [0064]

Literatura não relacionada com patentes referida na

- SELA et al. Immunoconjugates. 1987, 189-216 [0002]
- GHOSE et al. Targeted Drugs. 1983, 1-22 [0002]
- DIENER et al. Antibody Mediated Delivery Systems. 1988, 1-23 [0002]
- PIETERSZ et al. Antibody Mediated Delivery Systems. 1988, 25-53 [0002]
- BUMOL et al. Antibody Mediated Delivery Systems. 1988, 55-79 [0002]
- GARNETT et al. *Cancer Res*, 1986, vol. 46, 2407-2412 [0002]
- OHKAWA et al. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1986, vol. 23, 81-86 [0002]
- ENDO et al. *Cancer Res.*, 1980, vol. 47, 1076-1080 [0002]
- HURWITZ et al. *Appl. Biochem.*, 1980, vol. 2, 25-35 [0002]
- MANABI et al. *Biochem. Pharmacol.*, 1985, vol. 34, 289-291 [0002]
- DILLMAN et al. *Cancer Res.*, 1986, vol. 46, 4886-4891 [0002]
- SHOVAL et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1988, vol. 85, 8276-8280 [0002]
- TSUKADA. *J. Natl. Canc. Inst.*, 1984, vol. 73, 721-729 [0002]
- KATO et al. *J. Med. Chem*, 1984, vol. 27, 1602-1607 [0002]
- TSUKADA et al. *Br. J. Cancer*, 1985, vol. 52, 111-116 [0002]
- *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, vol. 102, 1048-1054 [0004]
- *J. Natl. Canc. Inst.*, 1988, vol. 80, 1154-1159 [0004]
- *Cancer Res*, 1988, vol. 48, 6097-6102 [0004]
- *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1982, vol. 79, 626-629 [0005]

- **LAMBERT et al.** *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, 12035-12041 [0006]
- **LAMBERT et al.** *Immunotoxins*. 1988, 175-209 [0006]
- **GHETIE et al.** *Cancer Res*, 1988, vol. 48, 2610-2617 [0006]
- *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, 10905-10908 [0006]
- **MENENDEZ et al.** *Fourth International Conference on Monoclonal Antibody Immunoconjugates for Cancer*, 1989 [0006]
- **HINMAN et al.** *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 3336-3342 [0006]
- **KUPCHAN et al.** *J. Med. Chem.*, 1978, vol. 21, 31-37 [0009]
- **HIGASHIDE et al.** *Nature*, 1977, vol. 270, 721-722 [0009]
- **KAWAI et al.** *Chem. Pharm. Bull.*, 1984, vol. 32, 3441-3451 [0009]
- *Chem. Pharm. Bull.*, 1984, vol. 12, 3441 [0010]
- **SIEBER et al.** *Comparative Leukemia Research 1975. Bibl. Haemat.*, 1976, vol. 43, 495-500 [0012]
- **REMILLARD et al.** *Science*, 1975, vol. 189, 1002-1005 [0012]
- **WOLPERT-DEFILLIPPES et al.** *Biochem. Pharmacol.*, 1975, vol. 24, 1735-1738 [0013]
- **KUPCHAN.** *Ped. Proc.*, 1974, vol. 33, 2288-2295 [0014]
- **CARLSSON et al.** *Biochem. J.*, 1978, vol. 173, 723-737 [0015]
- **STAROS.** *Biochemistry*, 1982, vol. 21, 3950-3955 [0056]
- **PARHAM.** *J. Immunol.*, 1983, vol. 131, 2895-2902 [0063]
- **SPRING et al.** *J. Immunol.*, 1974, vol. 113, 470-478 [0063]
- **NISONOFF et al.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, vol. 89, 230-244 [0063]
- **BURGESS.** *Immunology Today*, 1984, vol. 5, 155-158 [0063]
- **O'KEEFE et al.** *J. Biol. Chem*, 1985, vol. 260, 932-937 [0063]
- **RITZ.** *Nature*, 1980, vol. 283, 583-585 [0066]
- **NADLER et al.** *J. Immunol.*, 1983, vol. 131, 244-250 [0066]

EP2348024B1

Lisboa, 26 de Outubro de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para produzir um conjugado citotóxico que compreende uma ou mais moléculas de maitansinoides e um agente de ligação celular, o dito método consistindo essencialmente na etapa única de submeter a reação uma ou mais moléculas de maitansinoides contendo um éster reativo com um agente de ligação celular, em que o agente de ligação celular não foi anteriormente modificado para carregar um grupo reativo para utilização na conjugação com as moléculas de maitansinoides.
2. O método de acordo com a reivindicação 1, que compreende ainda uma segunda etapa de isolamento do conjugado.
3. O método de acordo com a reivindicação 1, em que o dito éster reativo está ligado à uma ou mais moléculas de maitansinoides através de uma fração de ligação.
4. O método de acordo com a reivindicação 3, em que a dita fração de ligação é uma ligação dissulfeto, uma ligação ácido-lábil, uma ligação fotolábil, uma ligação lábil à peptidase ou uma ligação lábil à esterase.
5. O método de acordo com a reivindicação 3, em que a dita fração de ligação é uma ligação dissulfeto.
6. O método de acordo com a reivindicação 1, em que o dito éster reativo é um éster reativo ligado por dissulfeto.
7. O método de acordo com a reivindicação 1, em que o dito éster reativo é um éster de *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-

nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo ou 3-carboxi-4-nitrofenilo.

8. O método de acordo com a reivindicação 1, em que o dito éster reativo é um éster de *N*-succinimidilo.

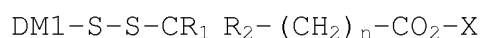
9. O método de acordo com a reivindicação 1, em que o éster reativo é um éster de *N*-sulfosuccinimidilo.

10. O método de acordo com a reivindicação 1, em que o dito agente de ligação celular é selecionado a partir do grupo que consiste em anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, fragmentos de anticorpos, linfocinas, hormonas, fatores de crescimento, vitaminas e moléculas de transporte de nutrientes.

11. O método de acordo com a reivindicação 1, em que o dito agente de ligação celular é um anticorpo monoclonal.

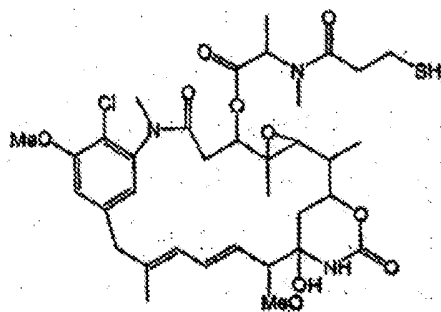
12. O método de acordo com a reivindicação 1, em que o dito agente de ligação celular é um fragmento de anticorpo.

13. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a molécula de maitansinoide é representada pela seguinte fórmula:



em que:

DM1-S- é representado pela seguinte fórmula:



R_1 e R_2 são cada um independentemente H ou alquilo linear ou ramificado;

n é 1-5;

X é *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo ou 3-carboxi-4-nitrofenilo.

14. No método de acordo com a reivindicação 13, em que R_1 é H, R_2 é CH_3 , n é 2 e CO_2-X é um éster de *N*-succinimidilo ou um éster de *N*-sulfosuccinimidilo.

Lisboa, 26 de Outubro de 2015

Figura 1

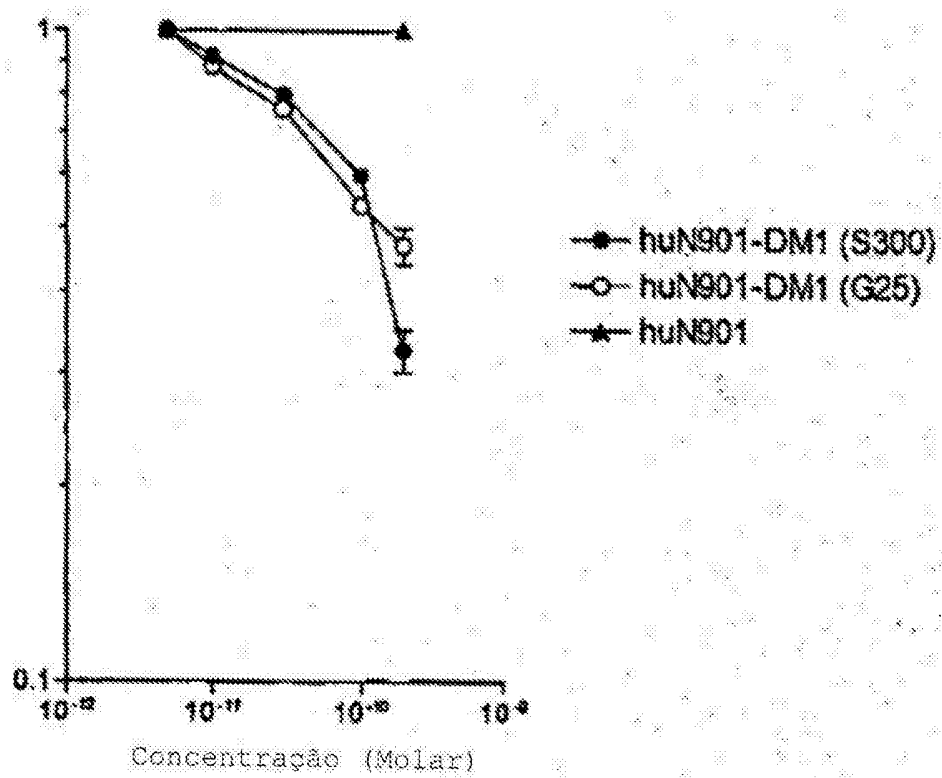


Figura 2

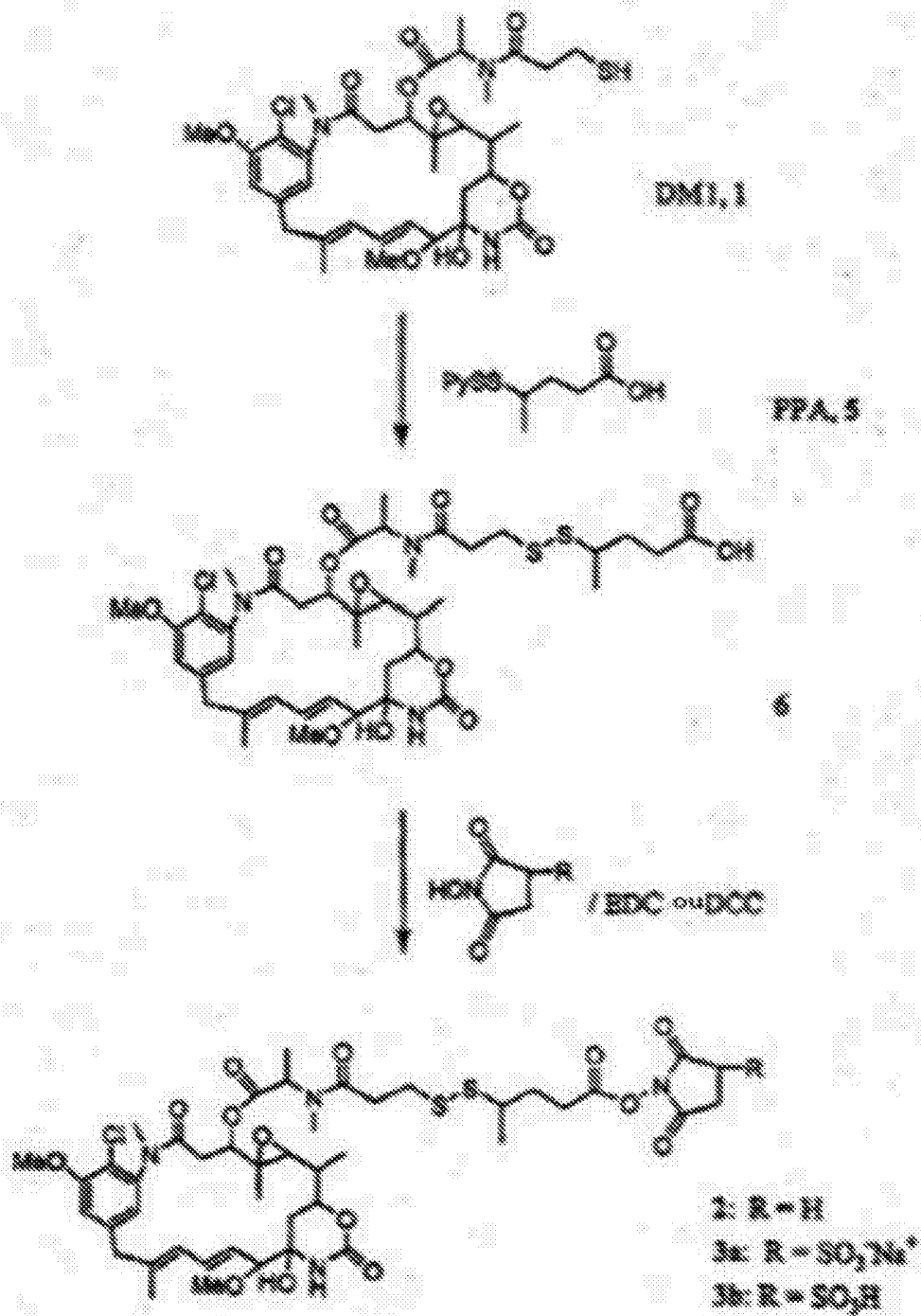


Figura 3

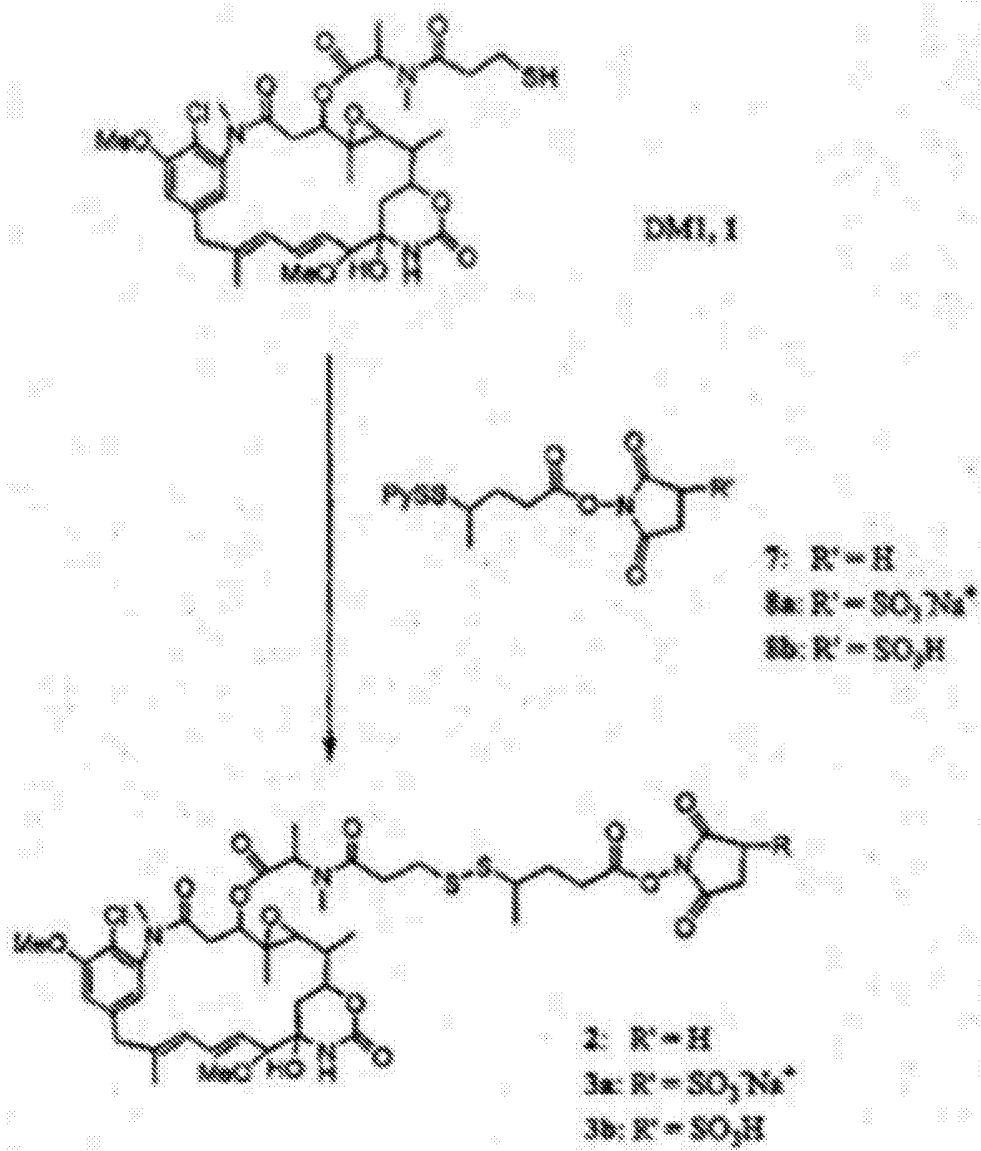


Figura 4

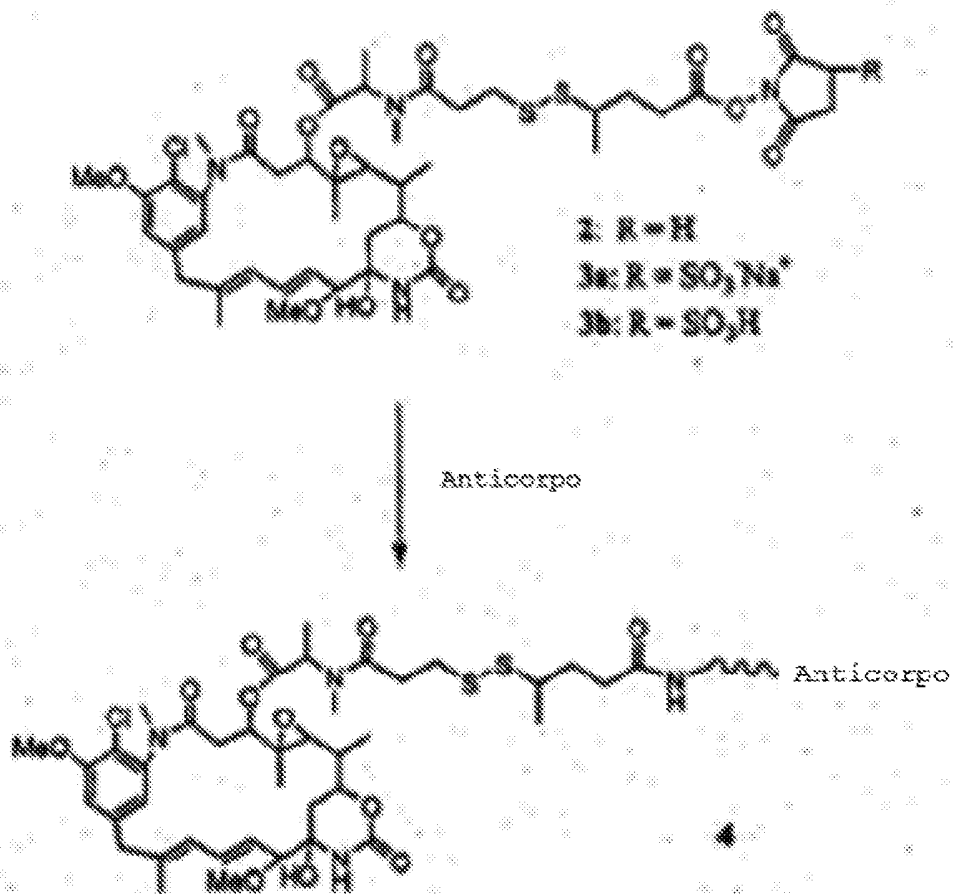


Figura 5

