

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 880 754**

51 Int. Cl.:

**C07D 498/18** (2006.01)

**C07D 498/16** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2013 E 18213678 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021 EP 3486248**

54 Título: **Métodos mejorados para la acilación de maitansinol**

30 Prioridad:

**26.09.2012 US 201261705731 P**

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

**25.11.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WIDDISON, WAYNE C y  
ZHAO, ROBERT YONGXIN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 880 754 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

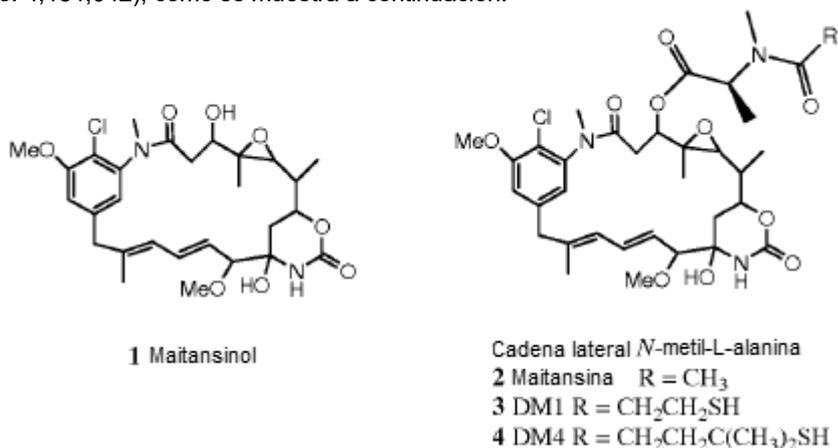
Métodos mejorados para la acilación de maitansinol

5 **Campo de la invención**

La presente invención es un proceso mejorado para preparar intermedios en la síntesis de maitansinoides y conjugados de anticuerpos de los mismos.

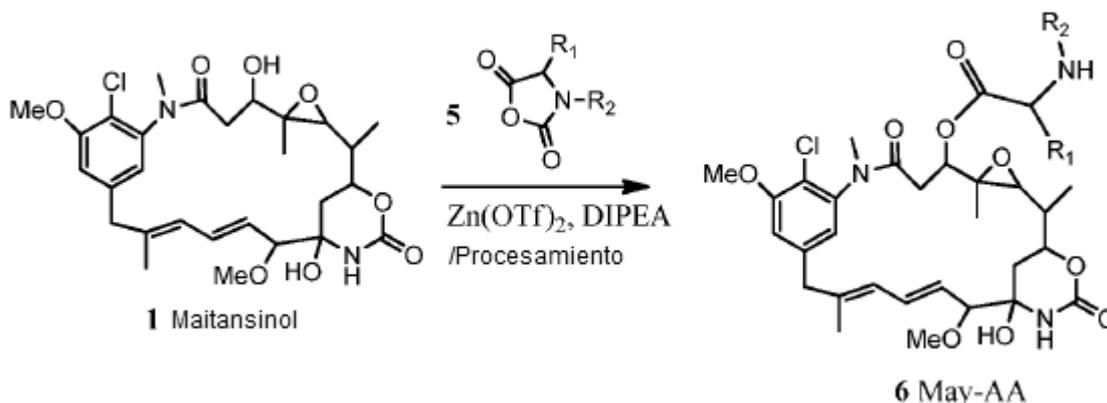
10 **Antecedentes de la invención**

Los maitansinoides son compuestos altamente citotóxicos, incluidos el maitansinol y los ésteres C-3 del maitansinol (Pat. de EE.UU. No. 4,151,042), como se muestra a continuación:

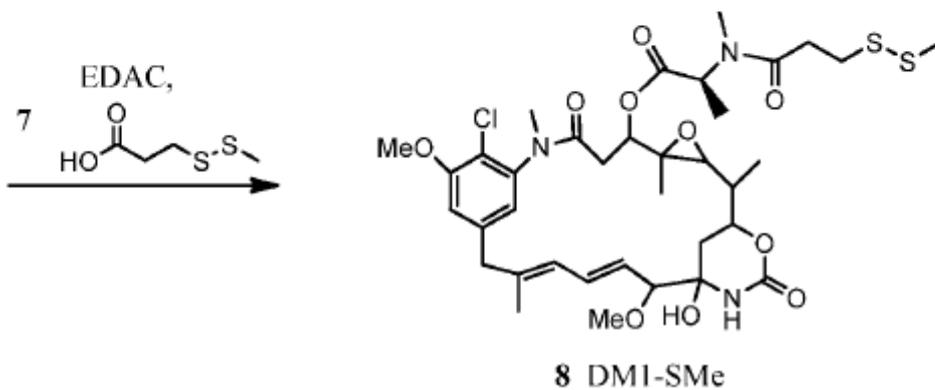
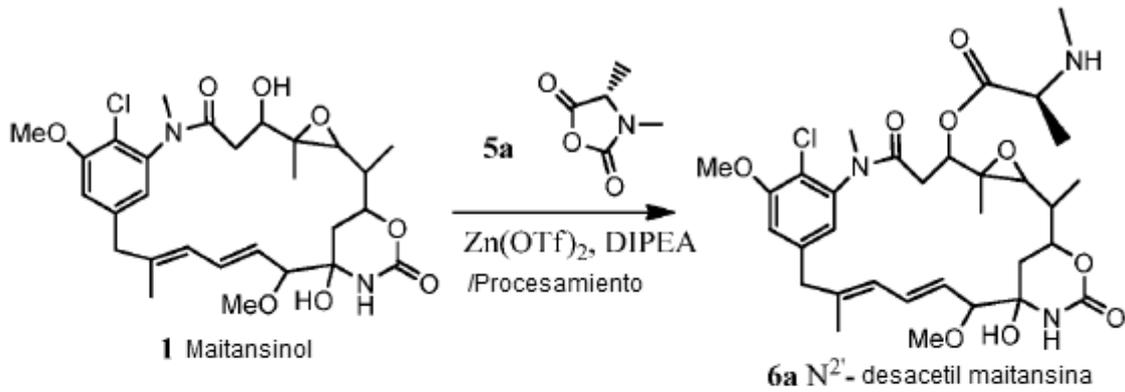


15 Los ésteres C-3 sintéticos y naturales del maitansinol se pueden clasificar en dos grupos: (a) Maitansina (2) y sus análogos (p. ej., DM1 y DM4), que son ésteres C-3 con *N*-metil-L-alanina o derivados de *N*-metil-L-alanina (Pat. de EE.UU. Nos. 4,137,230; 4,260,608; 5,208,020; y *Chem.Pharm.Bull.*12:3441 (1984)); (b) Ansamitocinas, que son ésteres C-3 con ácidos carboxílicos simples (Pat. de EE.UU. Nos. 4,248,870; 4,265,814; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,317,821; 4,322,348; y 4,331,598).

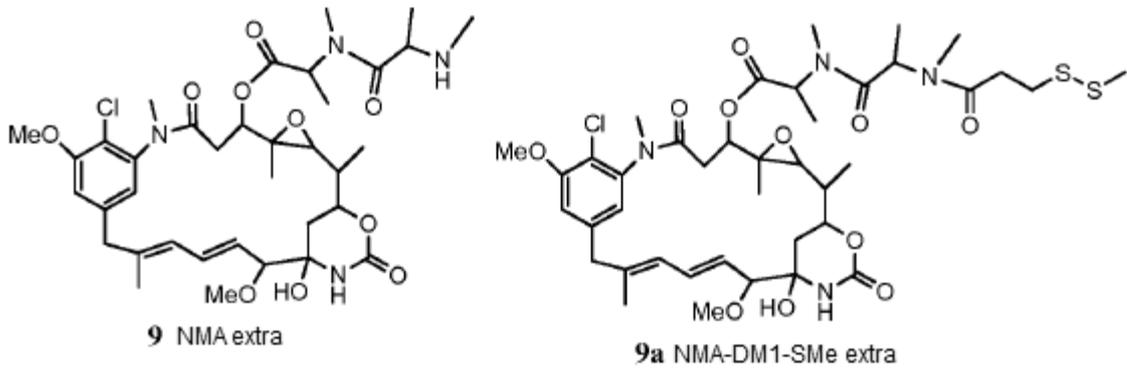
20 La maitansina (2), sus análogos y cada una de las especies de ansamitocina son ésteres C3 de maitansinol que se pueden preparar por esterificación de maitansinol (1). Las Patentes US Nos. 7,301,019 y 7,598,375 describen métodos para acilar maitansinol (1), con un *N*-carboxianhídrido de un aminoácido (NCA, 5), en presencia de una base para formar un éster de aminoácido de maitansinol (May-AA, 6) como se muestra a continuación:



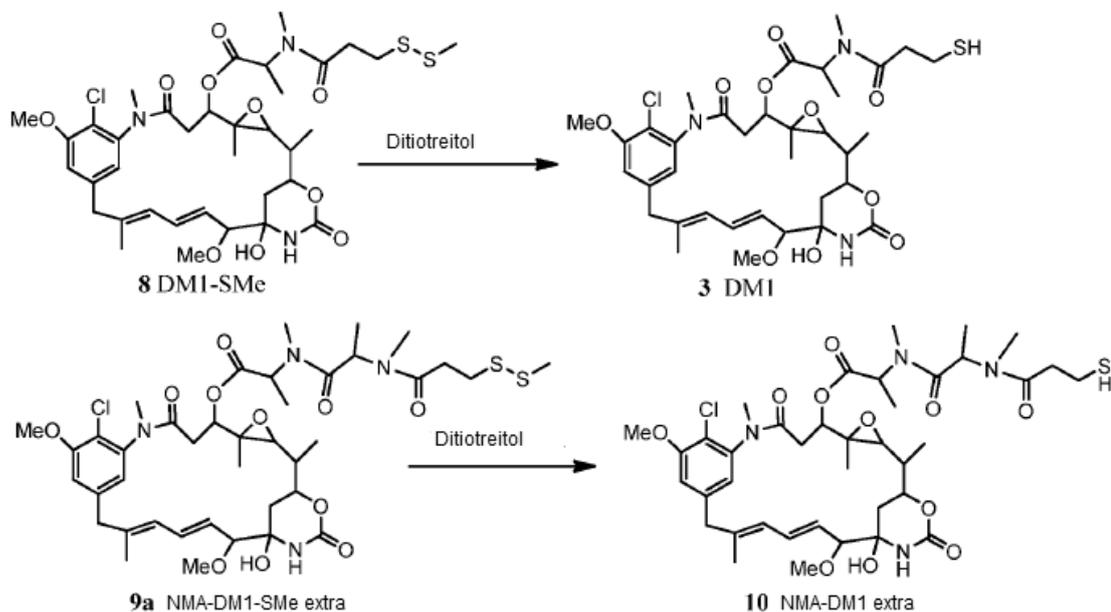
25 Los ésteres de aminoácidos del maitansinol son intermedios valiosos que pueden acoplarse a los ácidos carboxílicos para proporcionar maitansinoides. Por ejemplo, la reacción de maitansinol con (4*S*)-3,4-dimetil-2,5-oxazolidindiona (5a) forma *N*2'-desacetil-maitansina (6a), que a su vez se puede acoplar al ácido 3-(metilditio) propiónico (7), usando hidrocloreuro de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida (EDAC) para formar DM1-SMe (8) como se muestra a continuación:



Una desventaja significativa de la reacción de acilación que forma los ésteres de aminoácidos del maitansinol es que también forma un subproducto que comprende un resto N-metil-alanilo extra en la cadena lateral C3, denominado "NMA extra" (**9**). Cuando se acila la N<sup>2'</sup>-desacetil-maitansina, el NMA extra (**9**) también se acila para formar NMA-DM1-SMe extra (**9a**). Las estructuras de NMA extra (**9**) y NMA-DM1-SMe extra (**9a**) se muestran a continuación:



DM1 (**3**) se puede preparar a partir de DM1-SMe (**8**) por reducción, que también convierte cualquier NMA-DM1-SMe extra (**9a**) en NMA-DM1 extra (**10**) como se muestra a continuación:



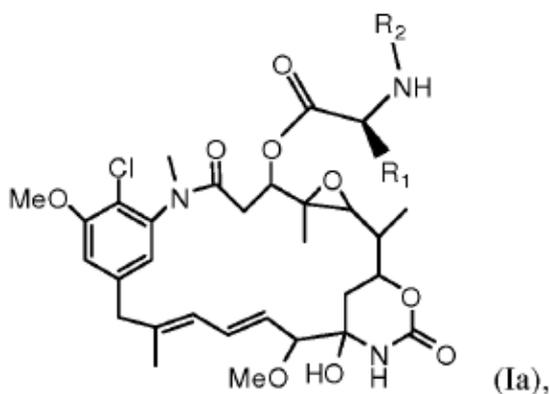
El NMA-DM1 extra (**10**) es difícil de eliminar de DM1 (**3**) porque ambos compuestos tienen polaridades similares y proporcionan picos superpuestos en la traza de HPLC de DM1 purificada (**3**). DM1 (**3**) y DM4 (**4**) se usan para preparar conjugados de anticuerpos, varios de los cuales se encuentran actualmente en ensayos clínicos.

5 Así, existe la necesidad de mejorar el rendimiento y la robustez de los procesos para preparar dichos maitansinoides y minimizar los subproductos formados durante las reacciones usadas en su preparación.

### Resumen de la invención

10 Se ha encontrado ahora que la adición de un agente de secado a la reacción entre maitansinol y un N-carboxianhídrido de un aminoácido incrementa sustancialmente el rendimiento de un éster de aminoácido de maitansinol, como se muestra en los Ejemplos 1-4. También se ha encontrado que la adición de una etapa de extinción previa con un nucleófilo después de la reacción de maitansinol y un N-carboxianhídrido de un aminoácido reduce sustancialmente la formación de subproductos indeseables, como NMA extra, como se muestra en los Ejemplos 6-8. En base a estos descubrimientos, en la presente memoria se describen métodos mejorados para preparar un éster de aminoácido de maitansinol.

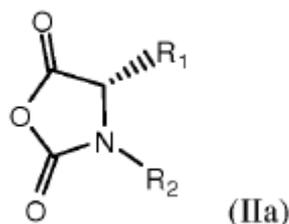
15 La invención se dirige a un método para preparar un éster de aminoácido de maitansinol representado por la Fórmula (Ia):



20 en donde R<sub>1</sub> es metilo; y R<sub>2</sub> es metilo.

El método comprende:

a) hacer reaccionar maitansinol con un N-carboxianhídrido en una mezcla de reacción que comprende además una base y agente secante. El N-carboxianhídrido está representado por la siguiente fórmula:



Todas las variables en la Fórmula (IIa) son como se definen en la Fórmula (Ia).

El método además comprende:

b) hacer reaccionar el N-carboxianhídrido sin reaccionar de la etapa a) con un reactivo nucleofílico en donde el reactivo nucleofílico es agua.

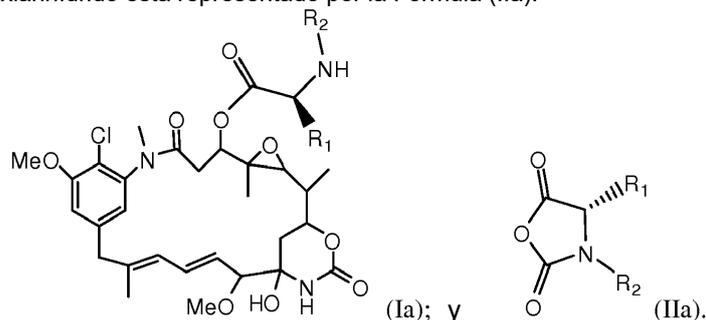
### Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1-2 son esquemas que muestran la acilación de N2'-desacetil-maitansina con un ácido carboxílico y un agente de condensación.

Las Figuras 3-4 son esquemas que muestran la acilación de N2'-desacetil-maitansina con un ácido carboxílico activado.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención está dirigida a métodos para preparar un éster de aminoácido representado por la Fórmula (Ia) a partir de maitansinol y del N-carboxianhídrido representado por la Fórmula (IIa). El éster de aminoácido se puede esterificar adicionalmente para preparar maitansinoides tales como DM1 y DM4 y luego se puede elaborar adicionalmente en conjugados de anticuerpos de maitansinoide. El éster de aminoácido está representado por la Fórmula (Ia) y el N-carboxianhídrido está representado por la Fórmula (IIa):



R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son ambos metilo.

El método de la invención comprende hacer reaccionar maitansinol con un N-carboxianhídrido representado por la Fórmula (IIa) en una mezcla de reacción que comprende adicionalmente una base y un agente de secado.

En una realización preferida, la mezcla de reacción comprende además un ácido de Lewis. Los ácidos de Lewis preferidos comprenden un catión metálico.

En otra realización preferida, el maitansinol y el N-carboxianhídrido se hacen reaccionar en primer lugar y luego la mezcla de reacción se pone en contacto con una disolución acuosa que contiene bicarbonato o carbonato o se pone en contacto la mezcla de reacción con un secuestrador de metales. Se pueden usar los secuestradores de metales conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el capítulo 9 en "The Power of Functional Resin in Organic Synthesis" por Aubrey Mendoca, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008). Los ejemplos de secuestradores de metales incluyen, pero no se limitan a, secuestradores de metales basados en polímeros y sílice (por ejemplo, secuestradores de metales QuadraPure™ y QuadraSil™ de Sigma-Aldrich, SiliaMetS® de SiliCycle, Smopex® de Johnson Matthey y Biotage), secuestradores basados en carbono (por ejemplo, QuadraPure™ C de Sigma-Aldrich).

En otra realización preferida, el maitansinol y el N-carboxianhídrido se hacen reaccionar en primer lugar y el catión metálico del ácido de Lewis se elimina entonces de la mezcla de reacción. Por ejemplo, el catión metálico del ácido de Lewis se elimina de la mezcla de reacción poniendo en contacto la mezcla de reacción con una disolución acuosa que contiene bicarbonato o carbonato o poniendo en contacto la mezcla de reacción con un secuestrador de metales. El método de la invención comprende: a) hacer reaccionar un maitansinol con un N-carboxianhídrido representado por la fórmula (IIa) en una mezcla de reacción que comprende adicionalmente una base y un agente de secado; b) hacer reaccionar el N-carboxianhídrido sin reaccionar de la etapa a) con un reactivo nucleofílico, en donde el reactivo nucleofílico es agua.

En una realización preferida, la mezcla de reacción de la etapa a) comprende además un ácido de Lewis. Los ácidos de Lewis preferidos comprenden un catión metálico.

En otra realización preferida, la mezcla de reacción después de la etapa b) se pone en contacto con una disolución acuosa que contiene bicarbonato o carbonato o con un secuestrador de metales.

En otra realización preferida, el catión metálico del ácido de Lewis se elimina de la mezcla de reacción después de realizar la etapa b), es decir, después de la reacción del nucleófilo con el N-carboxianhídrido que no reaccionado. Por

ejemplo, el catión metálico del ácido de Lewis se elimina de la mezcla de reacción poniendo en contacto la mezcla de reacción con una disolución acuosa que contiene bicarbonato o carbonato o poniendo en contacto la mezcla de reacción con un secuestrador de metales.

El término "**base**" se refiere a una sustancia que puede aceptar iones de hidrógeno (protones) o donar un par de electrones de valencia. Las bases ejemplares no son nucleófilas y no reaccionan con el N-carboxianhídrido representado por la Fórmula (II). Los ejemplos de las bases adecuadas incluyen una trialkilamina (por ejemplo, diisopropilamina, trietilamina y 1,8-Diazabicycloundec-7-eno), un alcóxido metálico (por ejemplo, terc-butóxido de sodio y terc-butóxido de potasio), un alquilo de metal (por ejemplo, terc-butil-litio, metil litio, n-butil litio, terc-butil litio, di-isopropilamida de litio, pentil sódico y 2-fenil isopropil-potasio), un arilo de metal (por ejemplo, fenil litio), un hidruro de metal (por ejemplo, hidruro de sodio), una amida de metal (por ejemplo, amida de sodio, amida de potasio, diisopropilamida de litio y tetrametilpiperidida de litio), y una amida a base de silicio (por ejemplo, bis(trimetilsilil)amida de sodio y bis(trimetilsilil)amida de potasio). Preferiblemente, la base es una trialkilamina. Más preferiblemente, la base es diisopropilamina.

El término "**agente de secado**" se refiere a un agente que puede eliminar el agua de una disolución. Los ejemplos de un agente de secado adecuado incluyen, pero no se limitan a, tamices moleculares, sulfato de sodio, sulfato de calcio, cloruro de calcio y sulfato de magnesio. Las formas físicas de los agentes de secado incluyen, pero no se limitan a, perlas o polvos granulares. Preferiblemente, el agente de secado es un tamiz molecular. Alternativamente, el agente de secado es sulfato de sodio.

El término "**ácido de Lewis**" se refiere a una sustancia ácida que puede emplear un par de electrones solitario de otra molécula para completar el grupo estable de uno de sus propios átomos. Los ácidos de Lewis ilustrativos para uso en los métodos descritos incluyen triflato de cinc, cloruro de zinc, bromuro de magnesio, triflato de magnesio, triflato de cobre, bromuro de cobre (II), cloruro de cobre (II) y cloruro de magnesio. Preferiblemente, el ácido de Lewis es triflato de cinc.

El término "**reactivo nucleofílico**" se refiere a un reactivo que reacciona con centros electropositivos en el N-carboxianhídrido representado por la Fórmula (IIa) para descomponer el N-carboxianhídrido. Ejemplos de reactivos nucleofílicos incluyen agua, un alcohol (metanol, etanol, n-propanol, isopropanol o terc-butanol) y una amina primaria o secundaria (p. ej., metilamina, etilamina, dimetilamina, dietilamina, etc.). El reactivo nucleofílico del método de la invención es agua.

Las condiciones de reacción ejemplares para preparar los ésteres de aminoácidos de maitansinol representados por la Fórmula (Ia) se proporcionan a continuación. Las condiciones específicas se proporcionan en la Ejemplificación.

Aunque se pueden usar cantidades equimolares de maitansinol a un N-carboxianhídrido, más comúnmente se usa N-carboxianhídrido en exceso. Las relaciones molares ejemplares de maitansinol a N-carboxianhídrido varían de 1:1 a 1:10, más comúnmente de 1:2 a 1:7 o de 1:1 a 1:4. En una realización preferida, la relación molar de maitansinol a N-carboxianhídrido es de aproximadamente 1:5.

El ácido de Lewis se usa opcionalmente en los métodos divulgados. Cuando está presente, se usa típicamente en exceso en relación con el maitansinol, por ejemplo, un exceso de hasta 20 veces. Más comúnmente, la relación molar de maitansinol a ácido de Lewis varía de 1:5 a 1:8, más preferiblemente aproximadamente 1: 7. También se pueden usar cantidades menores de ácido de Lewis.

Se usan cantidades suficientes de agentes de secado para eliminar el agua disuelta del disolvente de reacción. La cantidad de agente de secado no es crítica, siempre que la disolución de reacción se vuelva sustancialmente anhidra. El agente de secado se puede usar directamente en el recipiente de reacción o estar contenido en el recipiente por una barrera semipermeable, como un recipiente de vidrio sinterizado.

Un experto en la técnica puede monitorizar fácilmente el tiempo requerido para la reacción usando técnicas que incluyen, pero no están limitadas a, cromatografía líquida de alta presión y cromatografía en capa fina. Una reacción típica se completa después de agitar durante 24 horas, pero se puede realizar a una velocidad más lenta o más rápida dependiendo de varios factores, tales como la temperatura de reacción y las concentraciones de los reactantes.

La reacción se puede realizar entre -20 °C y 80 °C, preferiblemente entre -10 °C y 60 °C, más preferiblemente entre -10 °C y 40 °C, y lo más preferiblemente entre 0 °C y 35 °C.

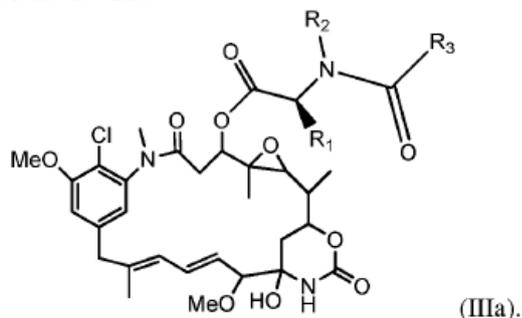
Los disolventes adecuados son fácilmente determinados por un experto en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, disolventes polares apróticos tales como dimetilformamida anhidra, dimetilsulfóxido (DMSO) o dimetilacetamida (DMA), hexanos, éteres (tales como tetrahydrofurano), éter dietílico, dimetoxietano, dioxano, diclorometano o una mezcla de los mismos.

Si está presente un ácido de Lewis en la mezcla de reacción, la mezcla de reacción después de la reacción de maitansinol y el N-carboxianhídrido se pone en contacto preferiblemente con una disolución acuosa que contiene bicarbonato o carbonato o con un secuestrador de metales. Preferiblemente, la mezcla de reacción se hace reaccionar con el reactivo nucleofílico para descomponer el exceso de N-carboxianhídrido antes de que la mezcla de reacción se ponga en contacto con una disolución acuosa que contiene bicarbonato o carbonato o con un secuestrador de metales. Si está presente un ácido de Lewis que comprende un catión metálico en la mezcla de reacción, el catión metálico se elimina preferiblemente de la mezcla de reacción como parte del procesamiento de la reacción. La eliminación del catión metálico se puede lograr poniendo en contacto la mezcla de reacción con una disolución acuosa que contiene bicarbonato o carbonato o con un secuestrador de metales. Preferiblemente, el N-carboxianhídrido se hace reaccionar con el reactivo nucleofílico antes de la eliminación del catión metálico.

La cantidad de un nucleófilo en la etapa b) puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica. Preferiblemente, se usa una cantidad suficiente de nucleófilo para descomponer el N-carboxianhídrido que no ha reaccionado. Esta es típicamente una cantidad equimolar de nucleófilo, sin embargo, también se pueden usar

cantidades en exceso de nucleófilo. Una reacción típica se completa después de agitar 1 hora, pero se puede realizar a una velocidad más lenta o más rápida dependiendo de varios factores, tales como la temperatura.

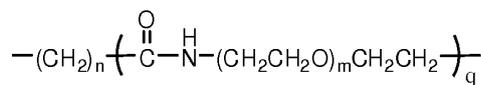
Además, dentro del alcance de la invención está un método para acilar el éster de aminoácido de maitansinol. El método comprende hacer reaccionar un éster de aminoácido de maitansinol representado por la Fórmula (Ia) preparado como se ha descrito anteriormente con un ácido carboxílico, que tiene la fórmula "R<sub>3</sub>COOH", en presencia de un agente de condensación o con un ácido carboxílico activado que tiene la fórmula "R<sub>3</sub>COX", para formar un compuesto representado por la siguiente fórmula:



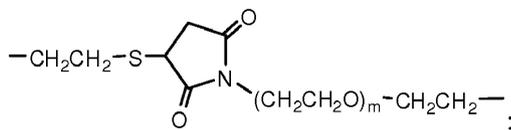
En la Fórmula (IIIa), R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son como se han definido en las Fórmulas (Ia) y (IIa); R<sub>3</sub> es un grupo alquilo o un grupo alquilo sustituido; y X en R<sub>3</sub>COX es un grupo saliente. Preferiblemente, X es un haluro, un grupo alcoxi, un grupo ariloxi, un imidazol, -S-fenilo, en el que fenilo está opcionalmente sustituido con nitro o cloruro, o -OCOR, en el que R es un grupo alquilo C1-C10 lineal, un grupo alquilo C1-C10 ramificado, un grupo alquilo C3-C10 cíclico, o un grupo alqueno C1-C10. En una realización, en la fórmula "R<sub>3</sub>COX" descrito anteriormente, -COX es un éster reactivo; por ejemplo, un éster de N-succinimida opcionalmente sustituido. Los ejemplos de un éster reactivo incluyen, pero no se limitan a, ésteres de N-succinimidilo, N-sulfosuccinimidilo, N-ftalimidilo, N-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonyl-4-nitrofenilo y 3-carboxi-4-nitrofenilo.

Preferiblemente, R<sub>3</sub> es -Y-S-SR<sub>4</sub>, Y es alqueno C1-C10, y R<sub>4</sub> es alquilo C1-C10, arilo o heteroarilo. En otra alternativa, Y es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>- y R<sub>4</sub> es metilo.

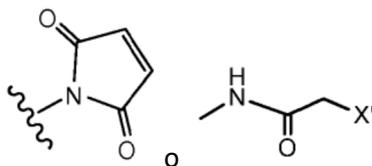
En otra realización, R<sub>3</sub> es -L-E; L es



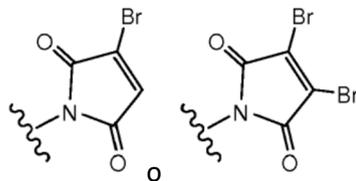
o  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m \text{CH}_2\text{CH}_2 \text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$



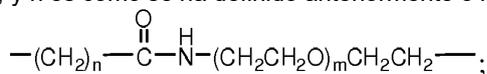
E es



o

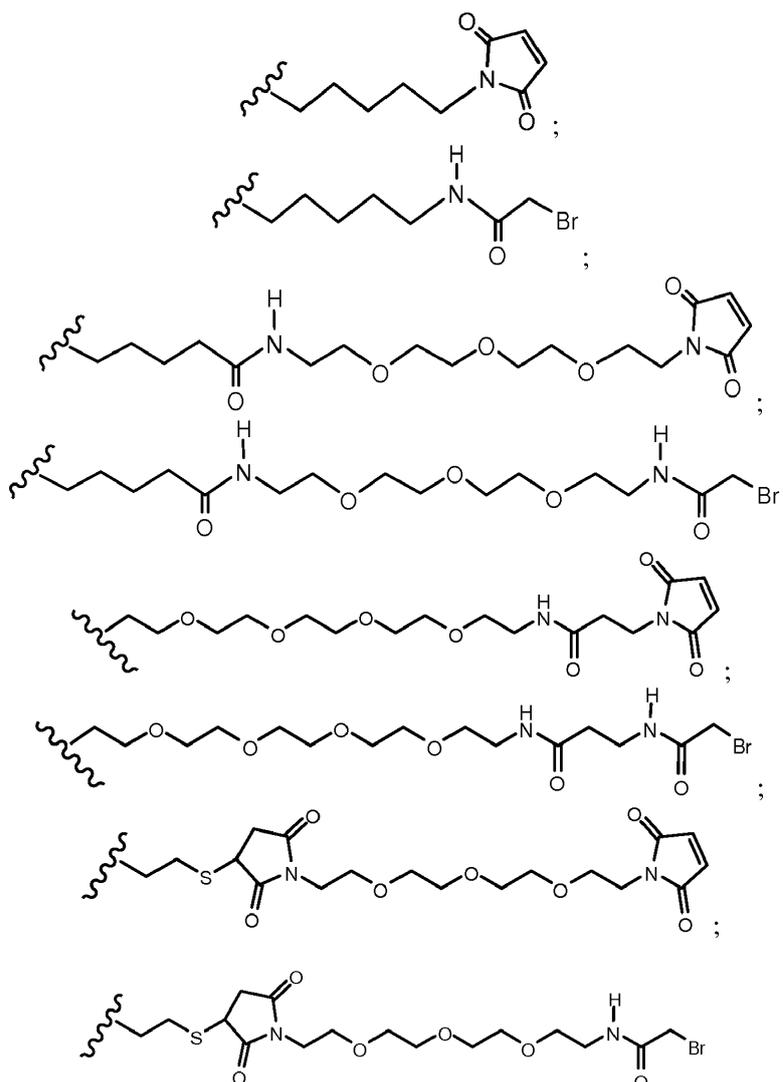


X' es un haluro; n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6; m es 0 o un número entero de 1 a 20; y q es 0 o 1. Alternativamente, L es  $-(\text{CH}_2)_n-$ ; y n es como se ha definido anteriormente o n es 5. En otra alternativa, L es



y n y m son como se han definido anteriormente; o, alternativamente, n es 4 y m es 3.

En otra alternativa más, R<sub>3</sub> se selecciona de las siguientes fórmulas:



5

y

10

El término "**agente de condensación**" es un reactivo que reacciona con el grupo hidroxilo de un ácido carboxílico y lo convierte en un grupo saliente, que puede ser desplazado por una amina o un grupo hidroxilo. Los ejemplos de agentes de condensación adecuados incluyen una carbodiimida (hidrocloruro de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida), un uronio, un éster activo, un fosfonio, 2-alkil-1-alkilcarbonyl-1,2-dihidroquinolina (2-isobutoxi-1-isobutoxicarbonyl-1,2-dihidroquinolina), 2-alcoxi-1-alcoxicarbonyl-1,2-dihidroquinolina (2-etoxi-1-etoxicarbonyl-2-dihidroquinolina), o cloroformato de alquilo (cloroformato de isobutilo). Preferiblemente, el agente de condensación es una carbodiimida. Más preferiblemente, hidrocloruro de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida.

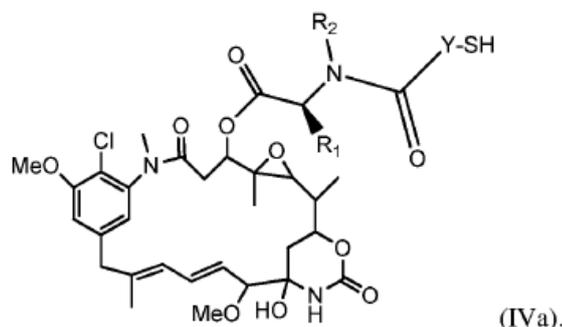
15

20

El término "**grupo saliente**" se refiere a un grupo de restos cargados o no cargados que pueden ser desplazados fácilmente por un nucleófilo, tal como una amina. Dichos grupos salientes son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, haluros, ésteres, alcoxi, hidroxilo, alcoxi, tosilatos, triflatos, mesilatos, nitrilos, azida, un imidazol, carbamato, disulfuros, tioésteres, tioéteres (es decir, -*S*-fenilo opcionalmente sustituido) y compuestos de diazonio. Preferiblemente, el grupo saliente es un haluro, un grupo alcoxi, un grupo arilo, un imidazol, -*S*-fenilo opcionalmente sustituido con -NO<sub>2</sub> o cloro, o -OCOR, en el que R es un grupo alquilo C1-C10 lineal, un grupo alquilo C1-C10 ramificado, un grupo alquilo C3-C10 cíclico, o un grupo alqueno C1-C10. En otra realización preferida, el grupo saliente es el resto en un éster reactivo (por ejemplo, -COX) que puede ser desplazado. Un éster reactivo incluye, pero no se limita a, ésteres de *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo y 3-carboxi-4-nitrofenilo.

25

La invención también incluye un método para usar un éster C3 de maitansinol para preparar un derivado del mismo. El método comprende hacer reaccionar un éster C3 de maitansinol representado por la Fórmula (IIIa) preparado anteriormente con un agente reductor para formar un compuesto representado por la siguiente fórmula:



En la Fórmula (IVa),  $R_1$  y  $R_2$  son como se han definido en las Fórmulas (Ia) y (IIa); e Y es como se ha definido en la Fórmula (IIIa).

El término "agente reductor" es el elemento o compuesto en una reacción de reducción-oxidación que convierte un enlace disulfuro en un grupo hidrosulfuro. Los ejemplos de agentes reductores adecuados incluyen ditioneitol (DTT), (tris(2-carboxietil)fosfina) (TCEP) y  $\text{NaBH}_4$ .

El compuesto de fórmula (IIIa), cuando  $R_3$  es -L-E, o el compuesto de fórmula (IVa) pueden reaccionar con un anticuerpo o un anticuerpo modificado para formar un conjugado anticuerpo-maitansinoide. Véanse, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 7,521,541, 5,208,020, y 7,811,872. Alternativamente, el compuesto de fórmula (IVa) puede reaccionar con un agente de entrecruzamiento bifuncional para formar un conjugado anticuerpo-maitansinoide. Véanse, por ejemplo, US 6,441,163, US 2011/0003969A1 y US 2008/0145374.

"Alquilo" tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un alquilo lineal, ramificado o cíclico.

"Alquilo lineal o ramificado" tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente de cadena ramificada o lineal saturada de uno a veinte átomos de carbono. Los ejemplos de alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-metil-1-propilo,  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , 2-butilo, 2-metil-2-propilo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, 3,3-dimetil-2-butilo, 1-heptilo, 1-octilo, y similares. Preferiblemente, el alquilo tiene de uno a diez átomos de carbono. Más preferentemente, el alquilo tiene uno a cuatro átomos de carbono.

"Alquilenilo" tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un alquilenilo lineal, ramificado o cíclico.

"Alquilenilo lineal o ramificado" tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un radical hidrocarbonado divalente de cadena ramificada o lineal saturada de uno a veinte átomos de carbono. Los ejemplos de alquilo incluyen, pero no se limitan a, metileno, etileno, 1-propileno, 2-propileno, 1-butileno, 2-metil-1-propileno,  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , 2-butileno, 2-metil-2-propileno, 1-pentileno, 2-pentileno, 3-pentileno, 2-metil-2-butileno, 3-metil-2-butileno, 3-metil-1-butileno, 2-metil-1-butileno,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , 1-hexileno, 2-hexileno, 3-hexileno, 2-metil-2-pentileno, 3-metil-2-pentileno, 4-metil-2-pentileno, 3-metil-3-pentileno, 2-metil-3-pentileno, 2,3-dimetil-2-butileno, 3,3-dimetil-2-butileno, 1-heptileno, 1-octileno y similares. Preferiblemente, el alquilenilo tiene uno a diez átomos de carbono. Más preferentemente, el alquilenilo tiene uno a cuatro átomos de carbono.

"Alquenilo lineal o ramificado" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente de cadena lineal o ramificada de dos a veinte átomos de carbono con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace doble carbono-carbono, en donde el radical alquenilo incluye radicales que tienen orientaciones "cis" y "trans", o alternativamente, orientaciones "E" y "Z". Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, etilenilo o vinilo ( $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ), alilo ( $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), y similares. Preferentemente, el alquenilo tiene dos a diez átomos de carbono. Más preferentemente, el alquenilo tiene dos a cuatro átomos de carbono.

"Alquilo cíclico" se refiere a un radical de anillo carbocíclico saturado monovalente. Preferiblemente, el alquilo cíclico es un radical de anillo monocíclico de tres a diez miembros. Más preferiblemente, el alquilo cíclico es ciclohexilo.

"Ariilo" significa un radical hidrocarbonado aromático monovalente de 6-18 átomos de carbono derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático parental. Ariilo incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático fusionado a un anillo saturado, parcialmente insaturado o un anillo carbocíclico o heterocíclico aromático. Los grupos ariilo típicos incluyen, pero no están limitados a, radicales derivados de benceno (fenilo), bencenos sustituidos (p. ej., para-nitrofenilo, orto-nitrofenilo y dinitrofenilo), naftaleno, antraceno, indenilo, indanilo, 1,2-dihidronaftaleno, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo y similares. Preferiblemente, el ariilo es fenilo opcionalmente sustituido (p. ej., fenilo, fenol o fenol protegido).

"Heteroarilo" se refiere a un radical aromático monovalente de 5 o 6 miembros en el anillo, e incluye sistemas de anillos fusionados (al menos uno de los cuales es aromático) de 5-18 átomos, que contienen uno o más heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre. Algunos ejemplos de grupos heteroarilo son piridinilo (p. ej., 2-hidroxipiridinilo), imidazolilo, imidazopiridinilo, pirimidinilo (p. ej., 4-hidroxipirimidinilo), pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, cinnolinilo, indazolilo, indolizínilo, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo y furopiridinilo.

Los sustituyentes adecuados para un grupo alquilo son aquellos que no interfieren significativamente con las reacciones descritas. Los sustituyentes que interfieren con las reacciones descritas pueden protegerse de acuerdo

con métodos bien conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, en T.W. Greene y P.G.M. Wuts "Protective Groups in Organic Synthesis" John Wiley & Sons, Inc., Nueva York 1999. Los sustituyentes ejemplares incluyen arilo (p. ej., fenilo, fenol y fenol protegido), heteroarilo (p. ej., indolilo e imidazolilo) halógeno, guanidinio [-NH(C=NH) NH<sub>2</sub>], -OR<sup>100</sup>, NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>, -NO<sub>2</sub>, NR<sup>101</sup>COR<sup>102</sup>, -SR<sup>100</sup>, un sulfóxido representado por -SOR<sup>101</sup>, una sulfona representada por -SO<sub>2</sub>R<sup>101</sup>, un sulfato -SO<sub>3</sub>R<sup>100</sup>, un sulfonato -OSO<sub>3</sub>R<sup>100</sup>, una sulfonamida representada por -SO<sub>2</sub>NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>, ciano, un azido, -COR<sup>101</sup>, -OCOR<sup>101</sup>, -OCONR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>; R<sup>101</sup> y R<sup>102</sup> cada uno se selecciona independientemente entre H, alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono.

El término "haluro" se refiere a -F, -Cl, -Br o -I.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales o aminoácidos no naturales representados por NH<sub>2</sub>-C(R<sup>aa</sup>R<sup>aa'</sup>)-C(=O)OH, en donde R<sup>aa</sup> y R<sup>aa'</sup> son cada uno independientemente H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heteroarilo o heterociclilo. El término "aminoácido" también se refiere al residuo correspondiente cuando un átomo de hidrógeno se elimina del extremo amino y/o carboxi del aminoácido, tal como -NH-C(R<sup>aa</sup>R<sup>aa'</sup>)-C(=O)O-.

### Ejemplificación

Los ejemplos 3 a 9 no son de la invención.

### Materiales y Métodos

Los parámetros de proceso que se indican a continuación pueden ser adoptados y adaptados por expertos en la técnica para satisfacer sus necesidades particulares.

Todas las reacciones se realizaron bajo una atmósfera de argón con agitación magnética. El tetrahidrofurano y la dimetilformamida se adquirieron como disolventes anhidros de Aldrich. El maitansinol, se produjo como se describe (Widdison et al., *J. Med. Chem.*, 49: 4392-4408 (2006)). El N-carboxianhídrido de N-metil-alanina, (4S)-3,4-dimetil-2,5-oxazolidinona se preparó como se describe (Akssira, M. et al., *J. Marocain de Chimie Heterocyclique*, 1: 44-47 (2002)). Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) (<sup>1</sup>H 400MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz) se obtuvieron en un RMN serie Bruker ADVANCE™. Los datos de HPLC/MS se obtuvieron usando un espectrómetro de masas con trampa de iones Bruker ESQUIRE™ 3000 en línea con una HPLC Agilent serie 1100. El método 1 de HPLC se usó para analizar la DM1. El método 2 de HPLC se usó para todos los demás análisis.

Método de HPLC analítica 1:

Sistema de HPLC Waters con detector UV o equivalente

Columna: YMC-Pack ODS-AQ 250x4.6 mm; 5µm (Parte no. = AQ12S05-2546WT) Flujo: 1 mL / min (Gradiente)

Fase Móvil: A = 1 mL de 85 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en 1 litro de agua ; B = acetonitrilo/Tetrahidrofurano 30:70 (v/v) (Nota: se usó 0.1 % de TFA en lugar de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en la fase móvil A en el análisis de LC / MS

Tabla de gradiente:

	Tiempo, min	Flujo	% de A	% de B
1	0.0	1.00	62	38
2	25	1.00	62	38
3	40	1.00	40	60
4	60	1.00	40	60

Tiempo de procesamiento: 60 minutos + Tiempo posterior: 10 minutos

Detección UV: 252 nm

Volumen de inyección = 5 µL de aproximadamente 1 mg / mL de DM1 en acetonitrilo

Temperatura de la columna = 15 °C (a menos que se indique otra cosa)

Temperatura de la muestra = 2-8 °C

Método de HPLC / MS analítica 2:

Columna: 150 x 4.6 mm C8, tamaño de partícula 5 micrómetros, Zorbax P/N 993967-906

Disolventes: A agua desionizada + 0.1 % de TFA

Disolvente B: Acetonitrilo

Velocidad de flujo 1.0 mL / min Temperatura: Ambiente

Volumen de inyección: 15 µL

Gradiente

Tiempo	% de B
0	25
25	50
26	95
30	95

(continuación)

Tiempo	% de B
31	25
37	25

Los datos se presentaron de 0-25 minutos en trazas de HPLC.

Preparación de la muestra para el método de HPLC analítica 2:

5 Se añadieron partes alícuotas (20 µL) de una mezcla dada a acetonitrilo (1.5 mL) en un vial de automuestreo. El vial se tapó y se agitó, luego se colocó en un inyector automático a 15 °C. Se analizó un volumen de inyección (15 µL) para cada serie de HPLC.

Ejemplo 1. Preparación de DM1-SMe con tamices moleculares 4A añadidos como agente de secado

10 Se añadieron a un matraz de 10 mL maitansinol (50.1 mg, 0.0888 mmoles), (4S)-3,4-dimetil-2, 5-oxazolidindiona (30.2 mg, 0.233 mmoles, 2.6 eq), triflato de cinc (133 mg, 0.366 moles) y tamices moleculares 4A (0.50 g) presecados a 250 °C en vacío y luego enfriados hasta temperatura ambiente. Los contenidos se recogieron en dimetilformamida anhidra (0.75 mL) a la que se añadió diisopropiletilamina (62 µl, 0.357 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Una muestra de la mezcla cruda fue analizada por HPLC, el producto N<sup>2</sup>-desacetil-maitansina representó el 80 % del área total de HPLC. La mezcla de reacción se diluyó con 1:1 de NaHCO<sub>3</sub> saturado:NaCl saturado (1.2 mL) y acetato de etilo (3 mL) se mezcló entonces se filtró con celite, después se lavó con tampón fosfato de potasio (1 mL, 400 mM, pH 7.5). La capa orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y luego se evaporó para formar un sólido amarillo. Al sólido se le añadió ácido 3-metilditiopropanoico (25 mg, 0.16 mmoles), hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (30 mg, 0.16 mmoles) y diclorometano (3 mL). Después de agitar durante 2 horas, la mezcla se diluyó con acetato de etilo (8 mL), se lavó con tampón de fosfato de potasio 1.0 M, pH 6.5 (2 mL) y la disolución acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 8 mL). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se concentraron y se purificaron por cromatografía de sílice 95:5 diclorometano:metanol para proporcionar 51 mg (70 %) de DM1-SMe.

Ejemplo 2. Aumento de escala de 10X del ejemplo 1

25 La reacción en el Ejemplo 1 se realizó en una escala 10 veces mayor dando 490 mg (68 %) de DM1-SMe.

Ejemplo 3. Preparación de DM1-SMe sin agente de secado añadido

30 Se disolvió maitansinol (1.0 g, 1.77 mmoles) en dimetilformamida anhidra (15 mL) en un matraz de 25 mL que se enfrió en un baño de hielo/agua. Después de 2 minutos, se añadieron diisopropiletilamina (DIPEA, 0.92 g 7.07 mmoles) y triflato de cinc (3.8 g, 10.6 mmoles) con agitación magnética, luego se añadió rápidamente (4S)-3,4-dimetil-2,5-oxazolidindiona (0.913 g, 7.07 mmoles) y la mezcla se agitó durante 24 horas. Una muestra de la mezcla cruda fue analizada por HPLC, el producto N<sup>2</sup>-desacetil-maitansina representó el 65 % del área total de HPLC. La mezcla de reacción se diluyó con 1:1 de NaHCO<sub>3</sub> saturado:NaCl saturado (25 mL) y acetato de etilo (40 mL), se mezcla luego se filtra con celite y se lava con NaCl saturado. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y luego se evaporó. El residuo se recogió en diclorometano (30 mL) al que se añadieron rápidamente ácido 3-metilditiopropanoico (1.1 g, 7.0 mmoles) e hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (1.34 g, 7.0 mmoles) y la reacción se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (30 mL), se lavó con tampón de fosfato de potasio 1.0 M (30 mL), pH 6.5, y la disolución acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 40 mL). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se concentraron y se purificaron por cromatografía de sílice 95:5 diclorometano:metanol para proporcionar 698 mg (50 %) de DM1-SMe.

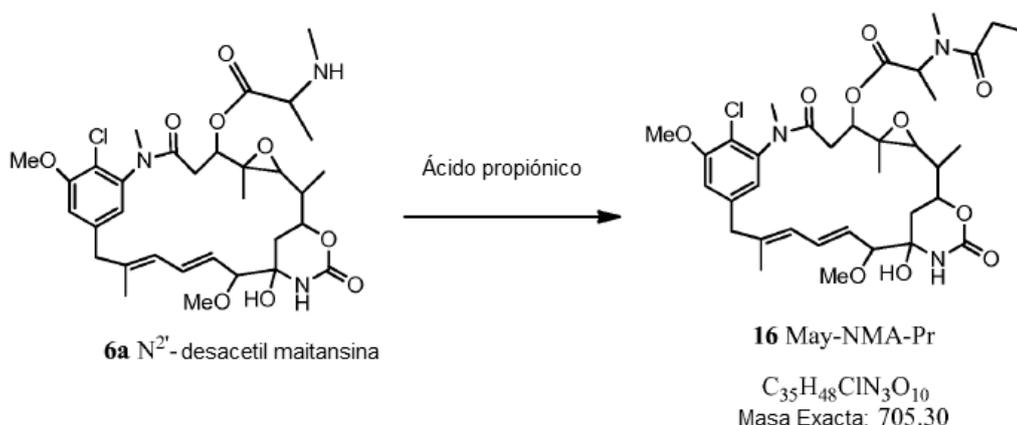
40 Ejemplo 4. Repetición del ejemplo 3

La reacción en el Ejemplo 3 se repitió en la misma escala proporcionando 735 mg (53 %) de DM1-SMe.

Ejemplo 5. Disolución madre de N<sup>2</sup>-desacetil-maitansina cruda

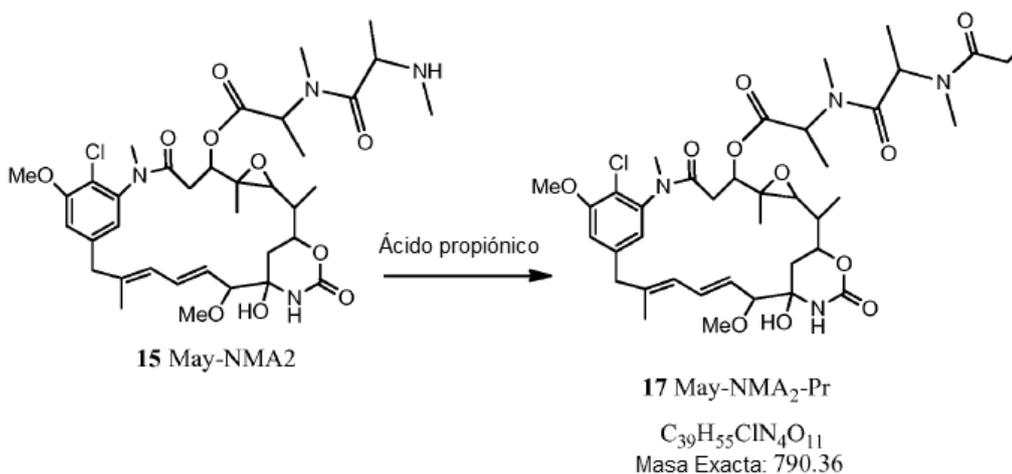
45 Se disolvió maitansinol (0.5 g, 0.89 mmoles) en dimetilformamida anhidra (7 mL) en un matraz de 25 mL que se enfrió en un baño de hielo/agua. Después de 2 minutos, se añadieron diisopropiletilamina (0.5 g, 3.5 mmoles) y triflato de cinc (1.9 g, 5.3 mmoles) con agitación magnética, luego se añadió rápidamente (4S)-3,4-dimetil-2, 5-oxazolidindiona (4.52 g, 3.5 mmoles) y la mezcla se agitó durante 24 horas. Se usaron partes alícuotas (0.5 mL cada una) de esta disolución madre en los siguientes experimentos, por lo que cada parte alícuota se generó a partir de aproximadamente 0.13 mmoles de maitansinol.

Ejemplo 6. Extracción de N<sup>2</sup>-desacetil-maitansina seguida del acoplamiento a ácido propiónico (Control)



5 Se añadió disolución madre de N<sup>2</sup>-desacetil-maitansina (0.50 mL) a un vial con una capacidad de 6 mL que contenía acetato de etilo (1.5 mL) y 1:1 de NaCl:NaHCO<sub>3</sub> saturado (0.75 mL), se tapó rápidamente y se mezcló. La capa orgánica se retuvo y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro (120 mg). La capa orgánica (1.0 mL) se recogió y ácido propiónico (20.0 µl, 0.27 mmoles). La disolución se transfirió luego a un vial que contenía hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (40 mg, 0.209 mmoles). La reacción se dejó progresar durante 2.5 h. después de lo cual se analizó por HPLC.

El siguiente subproducto también se produjo a partir de May-NMA2, un subproducto en la reacción precedente, como se muestra a continuación:



10 La proporción de áreas de porcentaje de HPLC para **17:16** fue 3.0:71.7. MS de **16**(M+ H+) 706 (M + Na<sup>+</sup>) 728; MS de **17** (M+ Na<sup>+</sup>) 813.

Ejemplo 7. Se repitió el experimento del Ejemplo 6.

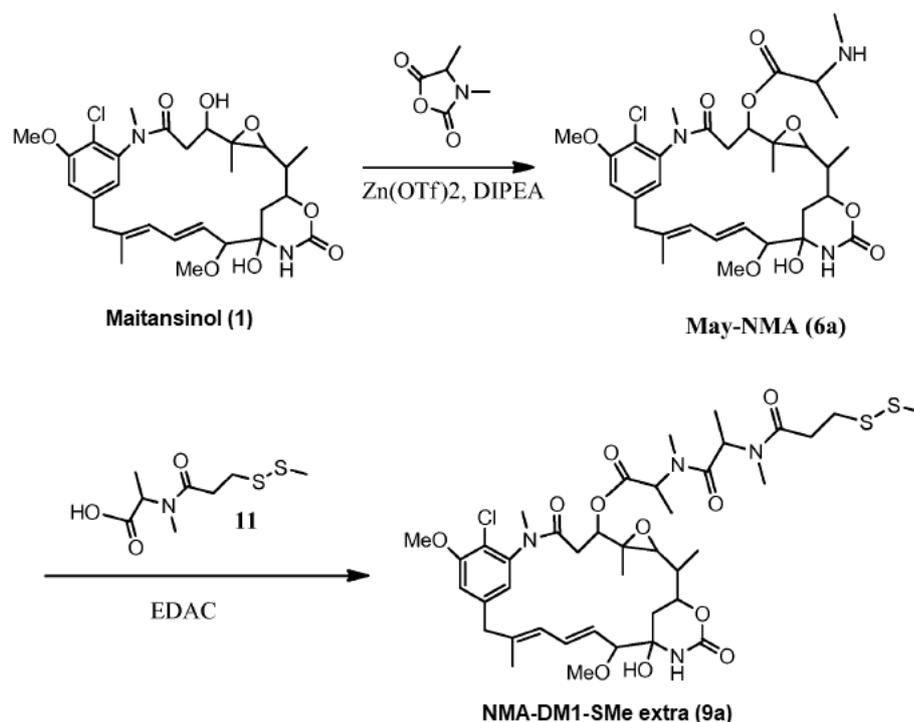
La proporción de áreas de porcentaje de HPLC para **17:16** fue 3.0:70.9.

15 Ejemplo 8. Extracción de N<sup>2</sup>-desacetil-maitansina seguida de una preinactivación con metanol, después acoplamiento con ácido propiónico (Preinactivación para destruir el exceso de **5a**)

Se añadió disolución madre de N<sup>2</sup>-desacetil-maitansina (0.50 mL) a un vial con una capacidad de 6 mL al que se añadió metanol (75 µL, 1.8 mmoles) y el vial se tapó y los contenidos se agitaron magnéticamente durante 1 hora. Se añadieron entonces acetato de etilo (1,5 mL) y 1:1 de NaCl saturado:NaHCO<sub>3</sub> (0.75 mL) y el vial se tapó y se mezcló.

20 La capa orgánica se retuvo y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro (120 mg). La capa orgánica (1.0 mL) se recogió y se añadió ácido propiónico (20.0 µL, 0.27 mmoles). La disolución se transfirió luego a un vial que contenía hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (40 mg, 0.209 mmoles). La reacción se dejó progresar durante 2.5 h. después de lo cual se analizó por HPLC. El pico de HPLC para **17** era apenas detectable, la integración no fue posible. Esta reacción se repitió y de nuevo **17** fue apenas detectable, la integración no fue posible. Por lo tanto, el método de preinactivación produce menos compuestos indeseables. **15** y **17**.

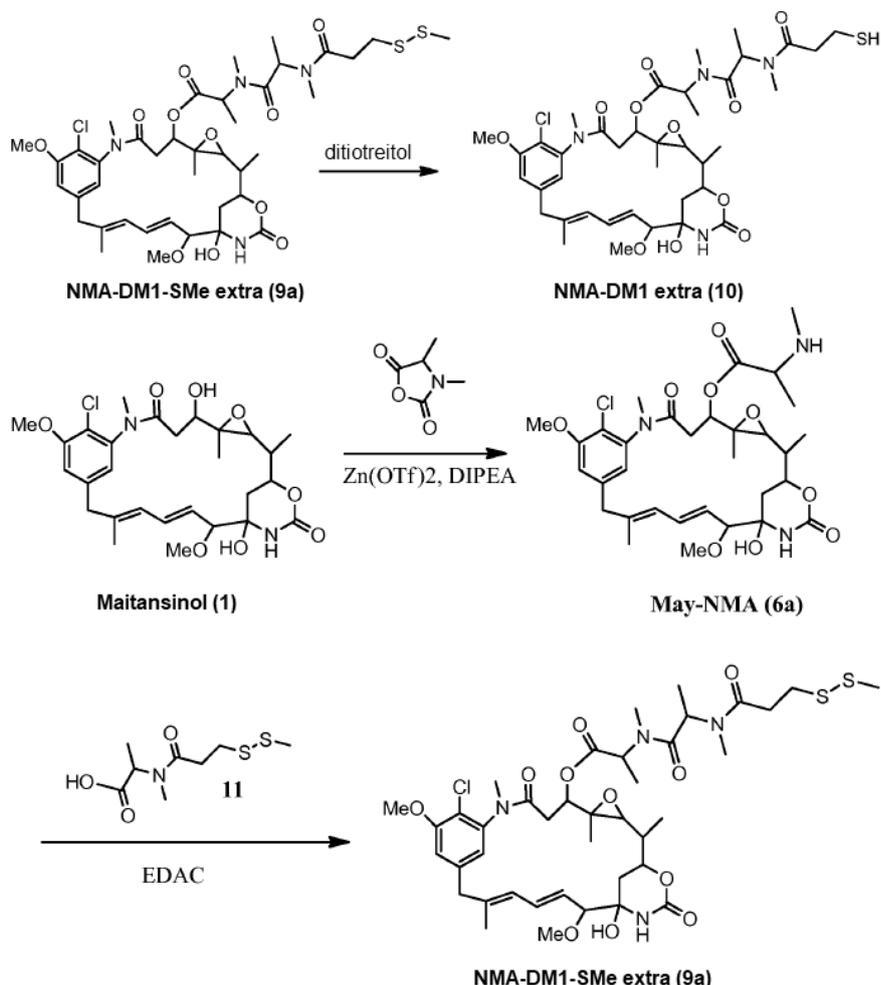
25 Ejemplo 9. Síntesis de NMA-DM1-SMe extra (**9a**)



NMA-DM1-SMe extra (9a)

Se pesó maitansinol (1.2 mg, 2.1 mmoles) en un matraz de 50 mL y se disolvió en una mezcla de dimetilformamida (12 mL) y tetrahidrofurano (6 mL). El matraz se enfrió en un baño de hielo/agua. Después de 5 minutos, se añadieron secuencialmente diisopropiletilamina (1.5 mL, 8,5 mmoles), trifluorometanosulfonato de cinc (4.5 g, 12.6 mmoles) y 2,5-oxazolidindiona, 3,4-dimetilo (4S) (1.1 g, 8.5 mmoles). Después de agitar durante 17 horas, la reacción se extrajo con 1:1 de NaCl acuoso saturado:NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (14 mL) y acetato de etilo (100 mL). La capa orgánica se retuvo y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Se eliminó el agente de secado y se eliminaron aproximadamente 2/3 del disolvente mediante evaporación rotatoria en vacío. Luego se añadió N-metil-N-[(2-metilditio)-1-oxopropil]-L-alanina (1.0 g, 4.2 mmoles) seguido de hidrocioruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (0.889 g, 4.6 mmoles). Se añadió cloruro de metileno (10 mL) para disolver la mezcla. Después de 4 horas, la reacción se extrajo con cloruro de metileno (70 mL) y 1:4 de NaCl acuoso saturado:NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (20 mL). La capa orgánica se retuvo y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria en vacío. El aceite espeso resultante se disolvió en acetonitrilo (3 mL) y aproximadamente 1/2 del material se purificó por HPLC en una columna C8 waters symmetry shield (19 x 150 mm micrómetros, tamaño de partícula de 5 micrómetros). La columna se eluyó con agua desionizada que contenía ácido fórmico al 0,2 % con un gradiente de acetonitrilo (30 % - 60 % de acetonitrilo durante 18 min). La columna se lavó con un 95 % de acetonitrilo durante 5 minutos y luego se volvió a equilibrar con un 30 % de acetonitrilo durante 6 minutos entre operaciones. Los volúmenes de inyección variaron entre 100-800 uL. El maitansinol sin reaccionar eluyó a los 8.5 min, un isómero no deseado de NMA-DM1-SMe extra eluyó a los 13.8 min y el isómero deseado de NMA-DM1-SMe extra eluyó a los 15.1 min. Las fracciones del producto deseado de varias operaciones se combinaron y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria en vacío. El residuo se recogió en un volumen mínimo de acetato de etilo y una impureza menor se eliminó mediante HPLC en una columna de ciano Kromasil (250 mm x 21 mm, tamaño de partícula de 10 micrómetros). La columna se operó con una fase móvil isocrática de hexanos: 2-propanol: acetato de etilo 67:9: 24 a 21 mL/min. El producto deseado eluyó a los 22.6 min, mientras que la impureza eluyó a los 12.6 min. Las fracciones del producto de varias operaciones se combinaron y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria en vacío para proporcionar 95 mg del producto (rendimiento del 10 %). <sup>1</sup>H RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>-d) δ = 7.26, 6.81 (d, J = 1.6 Hz, 1 H), 6.67 (d, J = 11.1 Hz, 1 H), 6.56 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.42 (dd, J = 11.4, 15.2 Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 5.67 (dd, J = 9.1, 15.2 Hz, 1 H), 5.52 - 5.40 (m, 1 H), 5.27 (d, J = 7.1 Hz, 1 H), 4.85 - 4.69 (m, 1 H), 4.26 (t, J = 10.9 Hz, 1 H), 3.96 (s, 3 H), 3.7 (bs, 1), 3.57 (d, J = 12.6 Hz, 1 H), 3.48 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 3.34 (s, 3 H), 3.23 (s, 3 H), 3.10 (d, J = 12.6 Hz, 1 H), 3.03 - 2.90 (m, 3 H), 2.87 (s, 3 H), 2.82 - 2.64 (m, 5 H), 2.63 - 2.50 (m, 1 H), 2.45 - 2.30 (m, 3 H), 2.15 (d, J = 14.1 Hz, 1 H), 1.62 (s, 3 H), 1.57 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 1.45 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 1.29 (d, J = 7.1 Hz, 3 H), 1.26 (d, J = 6.3 Hz, 4 H), 1.18 (d, J = 6.3 Hz, 3 H), 0.79 (s, 3 H) <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 170.86, 170.50, 170.35, 168.69, 156.19, 152.35, 142.2, 140.90, 139.29, 133.27, 128.05, 125.1, 122.07, 119.15, 113.31, 88.72, 80.96, 78.51, 74.23, 66.19, 60.66, 60.13, 56.81, 56.71, 54.97, 47.90, 46.72, 38.99, 36.41, 35.68, 33.19, 32.54, 30.90, 30.02, 23.01, 15.62, 14.75, 14.59, 13.54, 12.35. HRMS calc. para C<sub>40</sub>H<sub>57</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub> (M + Na<sup>+</sup>) m/z = 891.3052; encontrado 891.3049.

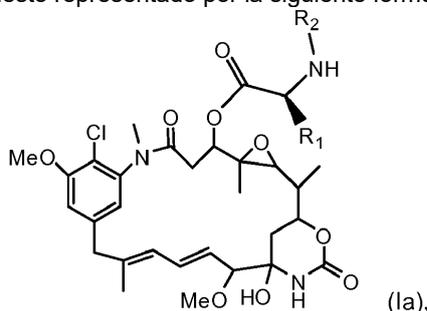
Ejemplo 10. Síntesis de NMA-DM1 extra (10)



Se disolvió N<sup>2</sup>-desacetil-N<sup>2</sup>-(3-metilditio-1-oxopropil-N-metil-L-alanil)-maitansina (95 mg, 0.109 mmoles) en 2:1 de dimetoxietano:tampón de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5, al que se añadió ditiotretitol (110 mg, mmol). Después de 2 horas, la disolución se extrajo con una mezcla de acetato de etilo:cloruro de metileno = 2:1 (5 mL) y NaCl acuoso saturado (1 mL). La capa orgánica se retuvo y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El agente de secado se eliminó mediante filtración en vacío y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria en vacío. El residuo se recogió en un volumen mínimo de 1:1 de acetato de etilo:cloruro de metileno y se purificó por HPLC en una columna de Kromasil ciano (250 mm x 21 mm, tamaño de partícula de 10 micrómetros). La columna se operó con una fase móvil isocrática de 64:19:17 hexanos:2-propanol:acetato de etilo a 21 mL/min. El producto deseado eluyó a los 16 min. Las fracciones del producto de varias operaciones se combinaron y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria para proporcionar 62 mg de producto (rendimiento del 69 %). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.81 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.67 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.43 (dd, J = 15.3 Hz, 11.1 Hz, 1H), 6.26 (s, 1H), 5.67 (dd, J = 15.3 Hz, 9.0 Hz, 1H), 5.47 (q, J = 6.6 Hz, 1H), 5.28-5.22 (m, J = 6.7 Hz, 1H), 4.81 (dd, J = 12.0 Hz, 2.9 Hz, 1H), 4.26 (t, J = 10.5 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.59 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 3.49 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.41 (bs, 1H), 3.36 (s, 3H), 3.24 (s, 3H), 3.11 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 2.98 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 2.85 (s, 3H), 2.84 - 2.80 (m, 1H), 2.79 (s, 3H), 2.76 (s, 1H), 2.68 - 2.61 (m, 2H), 2.58 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 2.17 (dd, J = 14.3 Hz, J = 2.8 Hz, 1H), 1.71 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.62-1.59 (m, 1H), 1.49-1.40 (m, , 1H), 1.31 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.29 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.27-1.23 (m, 1H), 1.20 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.81 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 170.37, 170.30, 170.25, 168.53, 156.07, 152.16, 142.31, 140.74, 139.16, 133.12, 127.09, 125.32, 121.92, 119.92, 113.15, 88.57, 80.83, 78.37, 74.08, 67.01, 59.97, 58.66, 56.56, 53.54, 49.17, 46.58, 38.86, 37.33, 36.25, 35.53, 32.39, 30.81, 29.80, 21.02, 19.87, 15.47, 14.80, 13.4, 12.22. HRMS calc. para C<sub>39</sub>H<sub>55</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>11</sub>S (M + Na<sup>+</sup>) m/z = 845.3174; encontrado 845.3166.

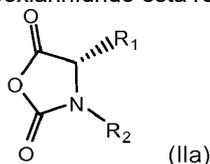
REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un compuesto representado por la siguiente fórmula:



5 en donde R<sub>1</sub> es metilo; y R<sub>2</sub> es metilo, método que comprende:

a) hacer reaccionar maitansinol con un *N*-carboxianhídrido en una mezcla de reacción que comprende además una base y un agente de secado, en donde el *N*-carboxianhídrido está representado por la siguiente fórmula:



formando de esta manera el compuesto de Fórmula (Ia); y

10 b) hacer reaccionar *N*-carboxianhídrido que no ha reaccionado de la mezcla de reacción en la etapa a) con un reactivo nucleofílico, en donde el reactivo nucleofílico es agua.

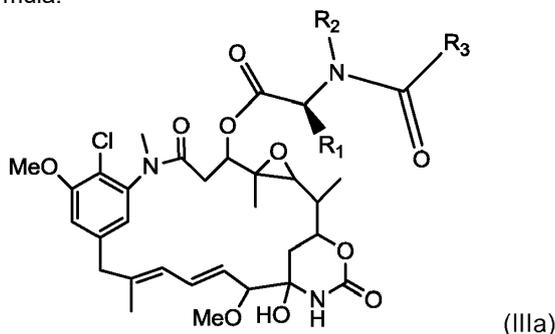
2. El método de la reivindicación 1, en donde la mezcla de reacción en la etapa a) comprende además un ácido de Lewis.

15 3. El método de la reivindicación 2, en donde el ácido de Lewis se selecciona del grupo que consiste en triflato de zinc, cloruro de zinc, bromuro de magnesio, triflato de magnesio, triflato de cobre, bromuro de cobre (II), cloruro de cobre (II) y cloruro de magnesio.

20 4. El método de la reivindicación 3, en donde el ácido de Lewis es triflato de zinc.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el método comprende además poner en contacto la mezcla de reacción después de la etapa b) con una disolución acuosa que contiene bicarbonato o carbonato o poner en contacto la mezcla de reacción con un secuestrador de metales.

25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además la etapa de hacer reaccionar el compuesto de fórmula (Ia) con un ácido carboxílico que tiene la fórmula R<sub>3</sub>COOH en presencia de un agente de condensación o con un ácido carboxílico activado que tiene la fórmula R<sub>3</sub>COX, para formar un compuesto representado por la siguiente fórmula:



30 en donde R<sub>3</sub> es un grupo alquilo o un grupo alquilo sustituido, y X es un grupo saliente.

7. El método de la reivindicación 6, en el que:

35 i) X es un haluro, un grupo alcoxi, un grupo ariloxi, un imidazol, -S-fenilo opcionalmente sustituido con nitro o cloruro, o -OCOR, en el que R es un grupo alquilo C1-C10 lineal, un grupo alquilo C1-C10 ramificado, un grupo alquilo C3-C10 cíclico, o un grupo alqueno C1-C10;

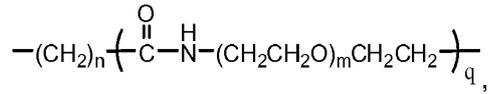
ii) -COX es un éster reactivo;

iii) R<sub>3</sub> es -Y-S-SR<sub>4</sub>, en donde Y es alqueno C1-C10 y R<sub>4</sub> es alquilo C1-C10, arilo o heteroarilo;

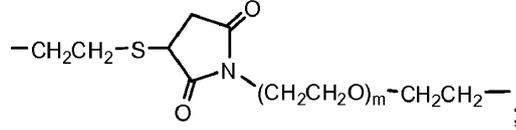
iv) R<sub>3</sub> es -Y-S-SR<sub>4</sub>, en donde Y es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>- y R<sub>4</sub> es -CH<sub>3</sub>;

40 v) R<sub>3</sub> es -L-E;

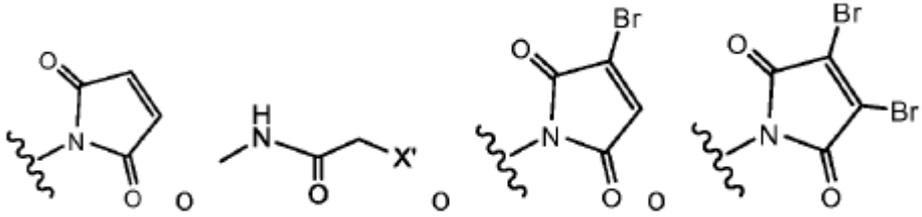
L es



o  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m \text{CH}_2\text{CH}_2 \text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$  o



5 E es

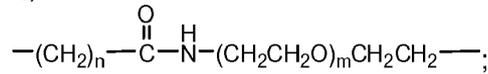


X' es un haluro;

n es 2, 3, 4, 5 o 6;

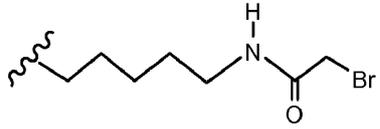
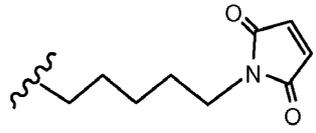
m es 0 o un entero de 1 a 20; y

10 q es 0 o 1, preferiblemente L es  $-(\text{CH}_2)_n-$  o

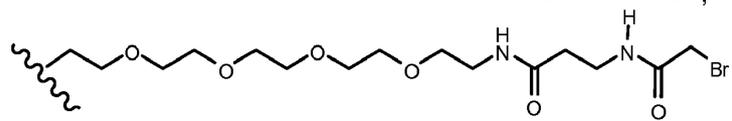
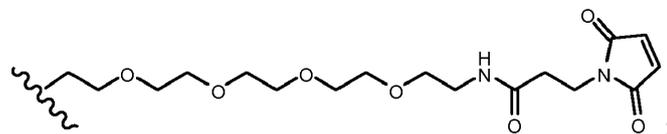
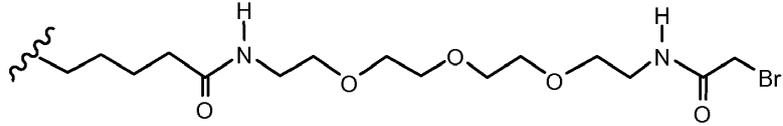
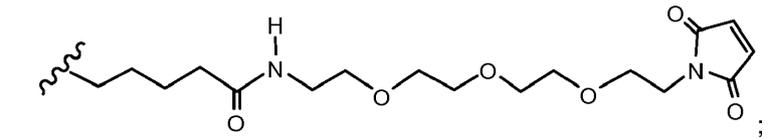


o

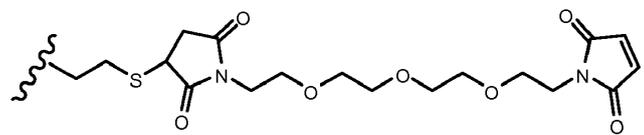
vi) R<sub>3</sub> está representado por uno de los siguientes:



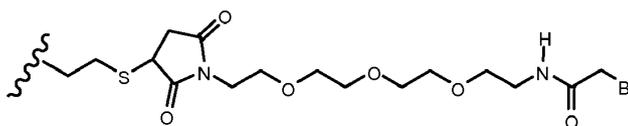
15



20

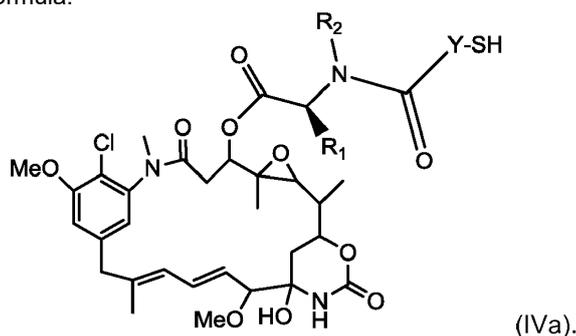


y



8. El método de la reivindicación 7, en el que  $R_3$  es  $-Y-S-SR_4$ , en el que Y es  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  o  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ ;  $R_4$  es  $-\text{CH}_3$ ; y  $-\text{COX}$  es un éster reactivo seleccionado del grupo que consiste en éster de N-succinimidilo, N-sulfosuccinimidilo, N-ftalimidilo, N-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonyl-4-nitrofenilo y 3-carboxi-4-nitrofenilo.

9. El método de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que cuando  $R_3$  es  $-Y-S-SR_4$ , el método comprende además hacer reaccionar el compuesto de fórmula (IIIa) con un agente reductor para formar un compuesto representado por la siguiente fórmula:



10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 y 9, en el que:

- i) el agente de condensación es una carbodiimida, un uronio, un éster activo, un fosfonio, 2-alkil-1-alkilcarbonil-1,2-dihidroquinolina, 2-alcoxi-1-alcoxycarbonil-1,2-dihidroquinolina, o alquilclorofornato; o  
 ii) el agente de condensación es una carbodiimida; o hidrocloreuro de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida.

11. El método de la reivindicación 10, en el que el agente de condensación es hidrocloreuro de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la base es i) una trialkilamina, un alcóxido de metal, un alquil de metal, un aril de metal, un hidruro de metal, una amida de metal o una amida basada en silicio; ii) una trialkilamina; o iii) diisopropiletilamina.

13. El método de la reivindicación 12, en el que la base es diisopropiletilamina.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el agente de secado es i) un tamiz molecular, sulfato de sodio, sulfato de calcio, cloruro de calcio o sulfato de magnesio; o ii) un tamiz molecular; y/o está en la forma de perlas o polvos granulares.

15. El método de la reivindicación 14, en el que el agente de secado es sulfato de sodio.

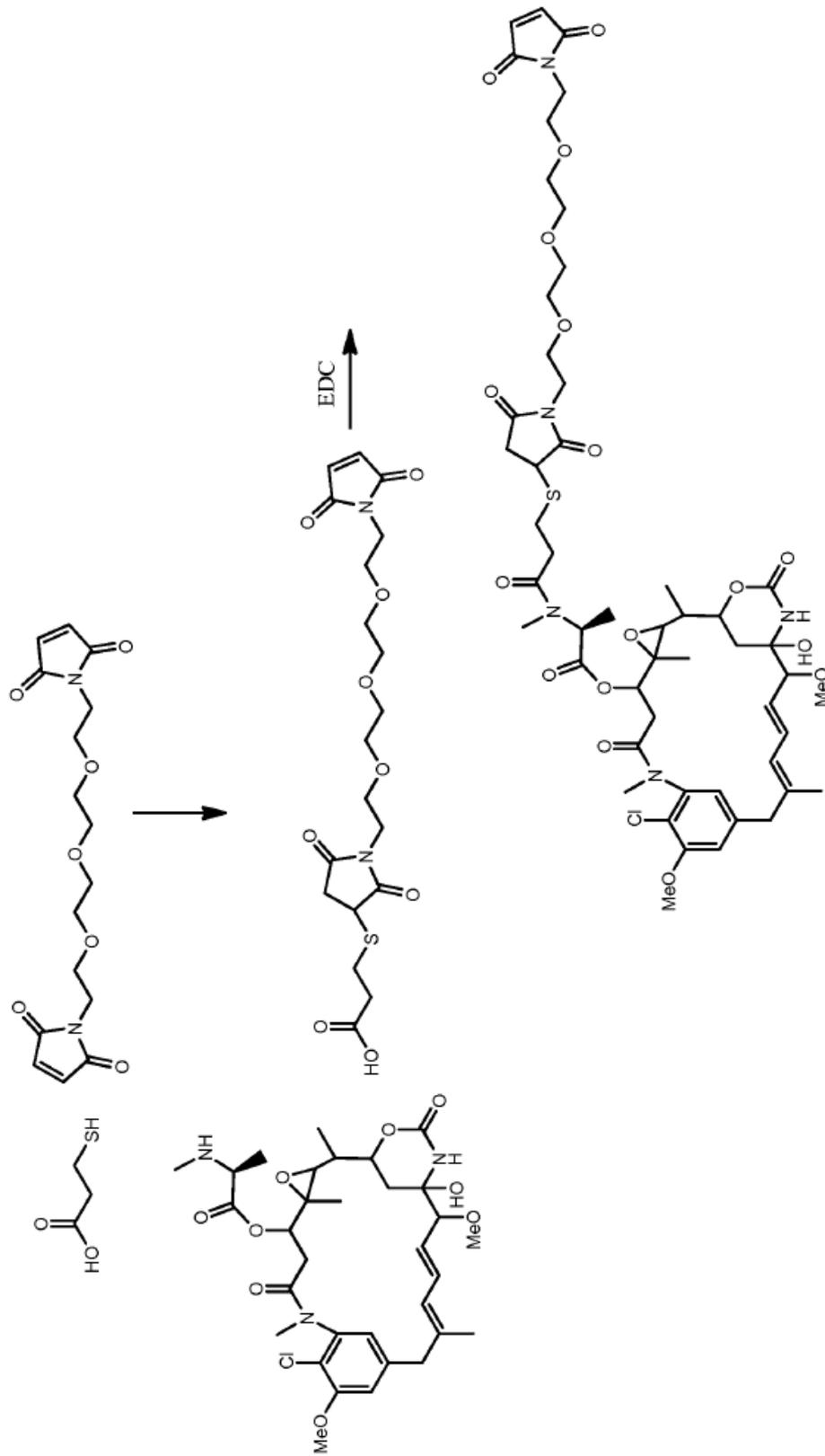


Figura 1

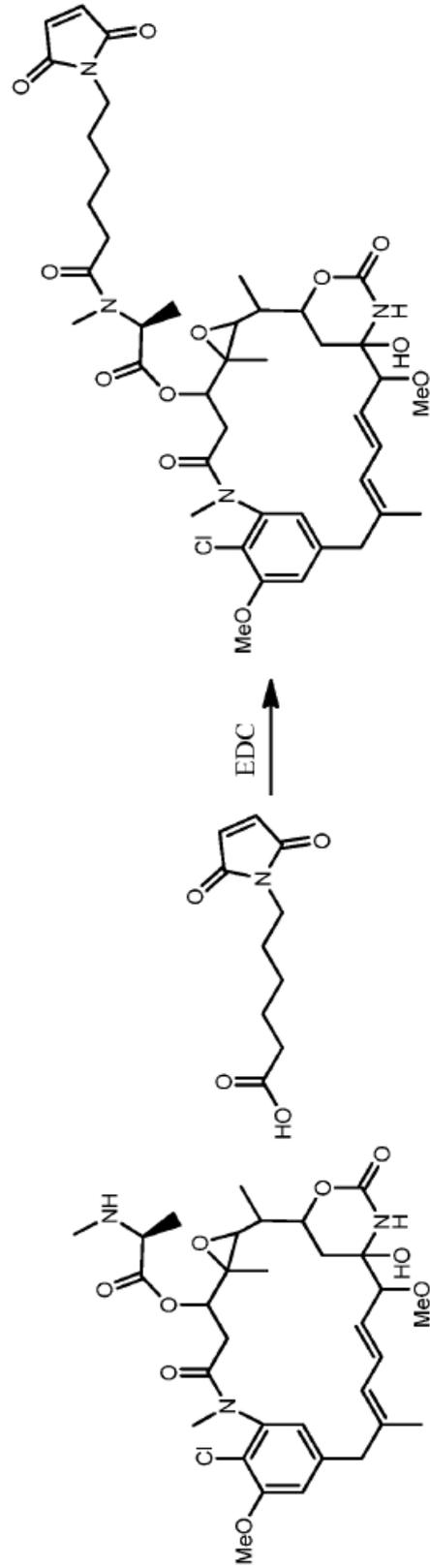


Figura 2

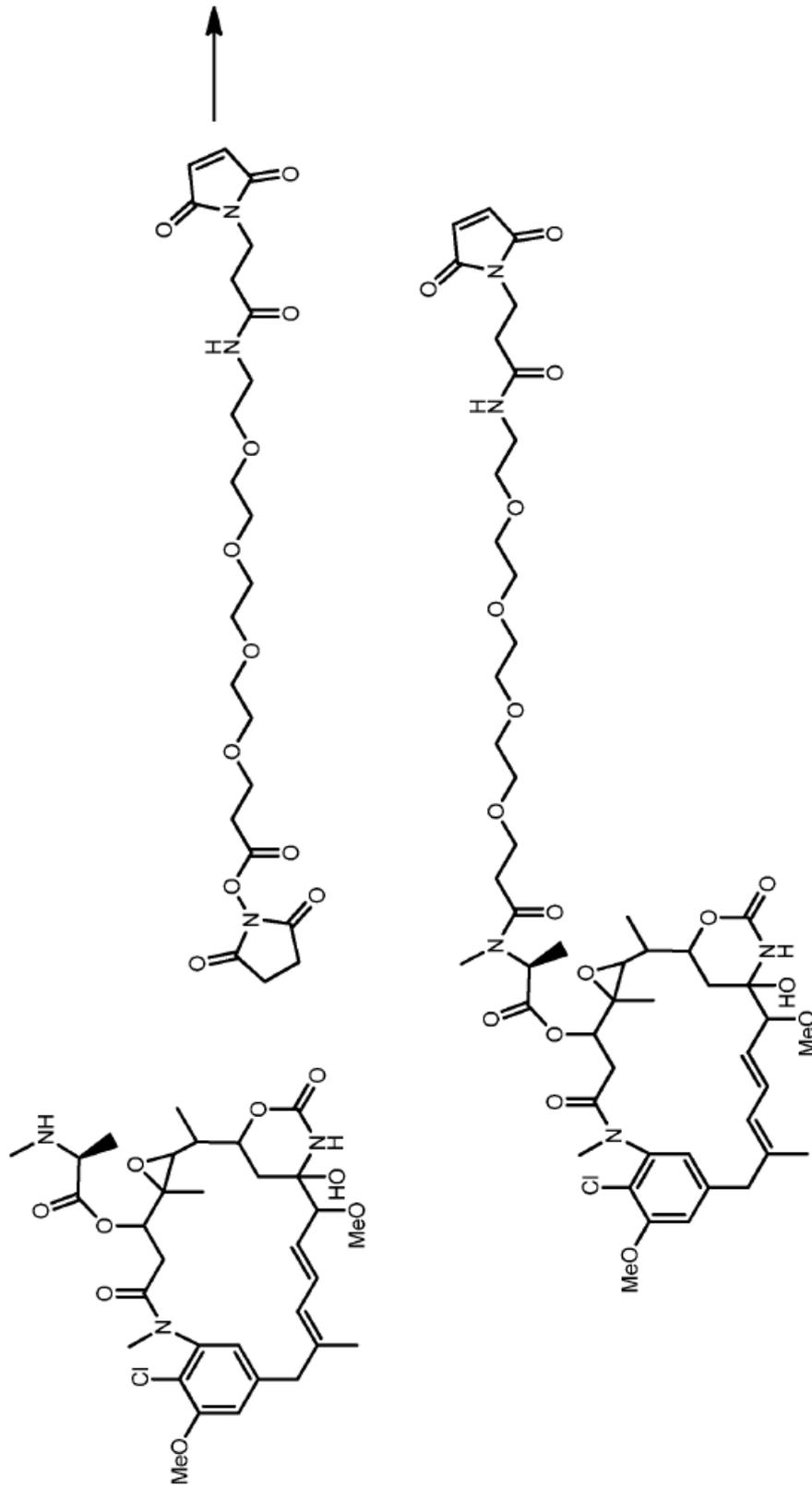


Figura 3

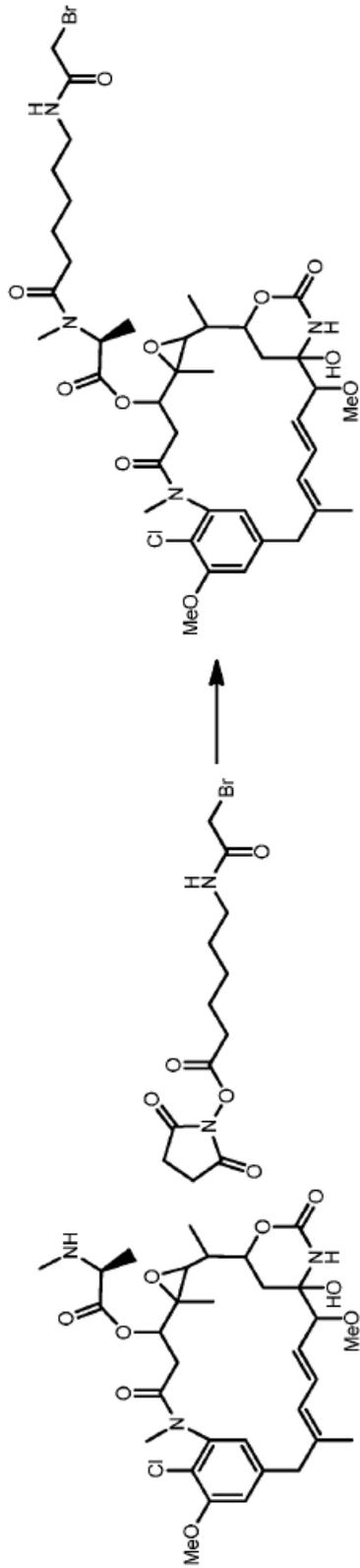


Figura 4