

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 561**

51 Int. Cl.:

C07D 498/18 (2006.01)

C07D 498/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2013 PCT/US2013/061839**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14052537**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2013 E 13774881 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2900676**

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:

13.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 716 561 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

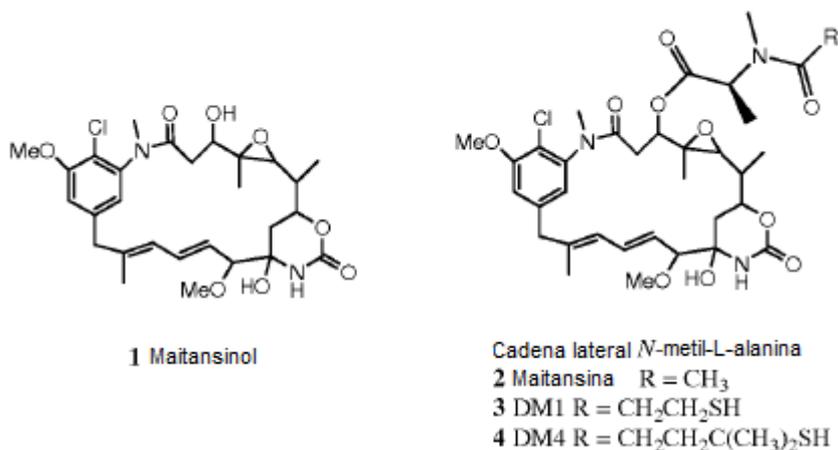
Métodos mejorados para la acilación de maitansinol

Campo de la invención

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

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:

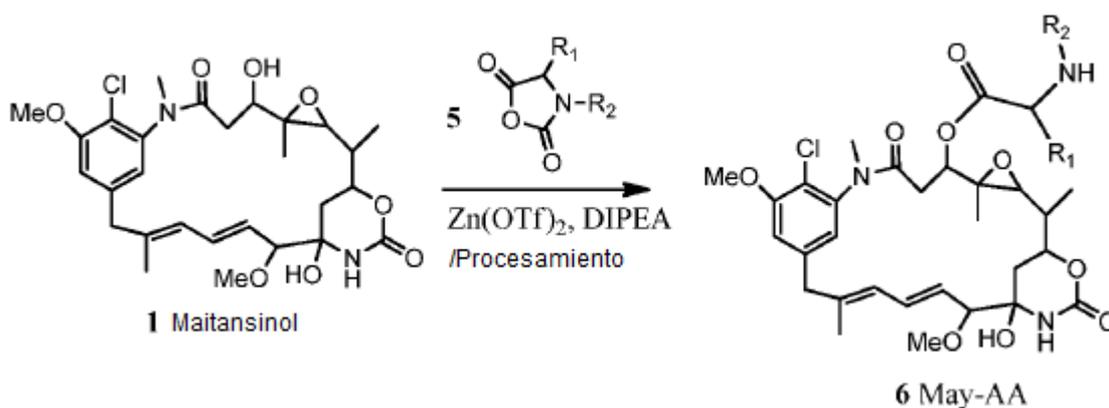


10

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).

15

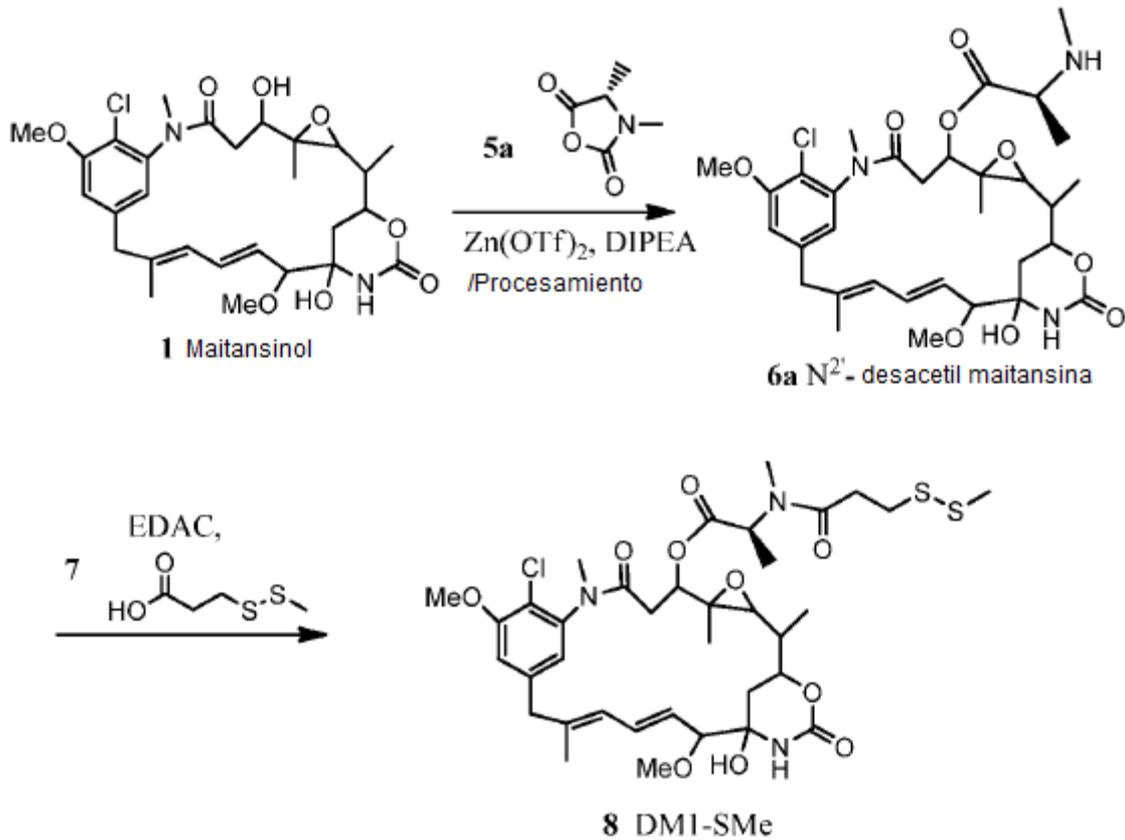
La maitansina (2), sus análogos y cada una de las especies de ansamitocina son ésteres C3 de maitansinol que se pueden preparar por esterificación de maitansinol (1). Las Patentes US Nos. 7,301,019 y 7,598,375 describen métodos para acilar maitansinol (1), con un N-carboxianhídrido de un aminoácido (NCA,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



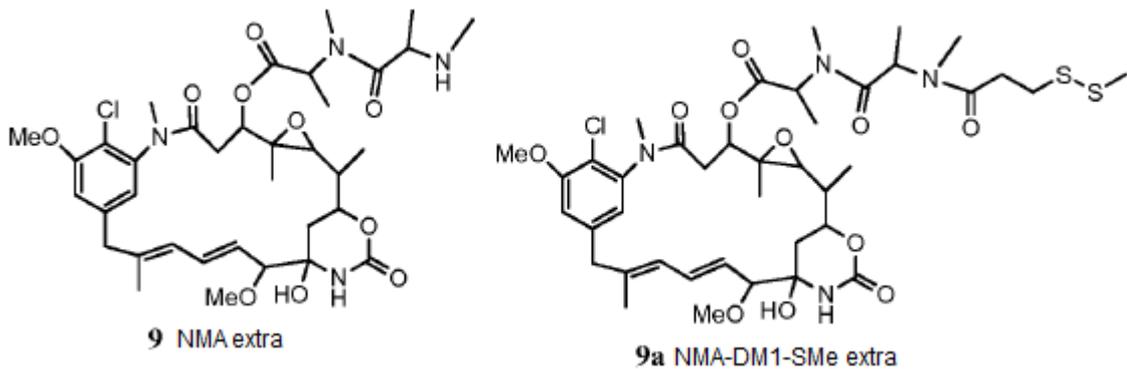
20

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 (4S)-3,4-dimetil-2,5-oxazolidindiona (5a) forma N2'-desacetil-maitansina (6a), que a su vez se puede acoplar al ácido 3-(metilditio) propiónico (7), usando hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDAC) para formar DM1-SMe (8) como se muestra a continuación:

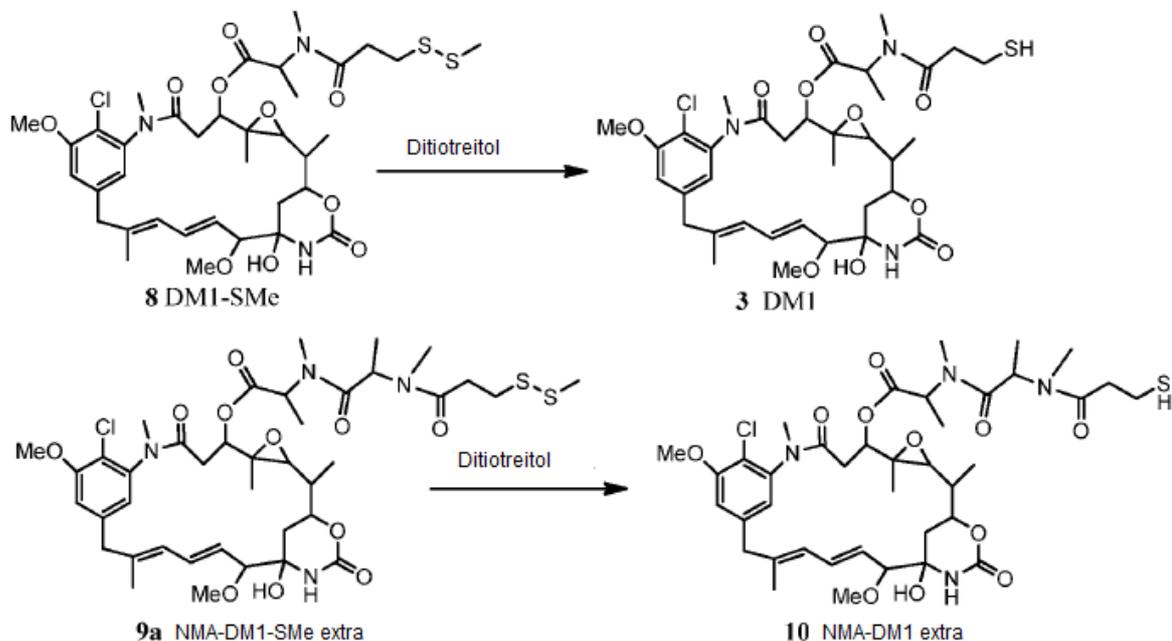
25



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^{2'}-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:



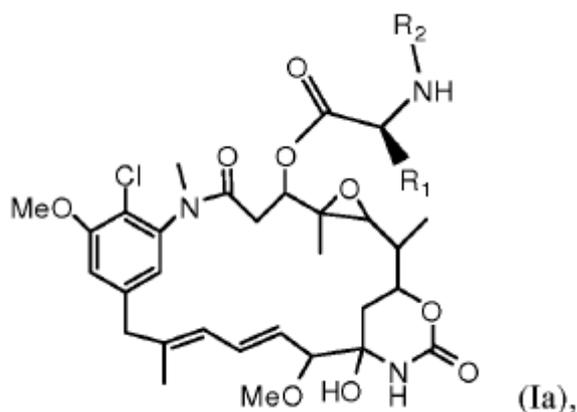
El NMA-DM1 extra (10) es difícil de eliminar de DM1 (3) porque ambos compuestos tienen polaridades similares y proporcionan picos superpuestos en la traza de HPLC de DM1 purificada (3). DM1 (3) y DM4 (4) se usan para preparar conjugados de anticuerpos, varios de los cuales se encuentran actualmente en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

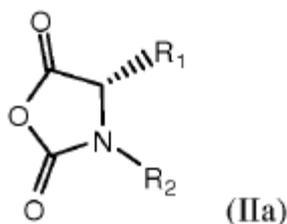
Se ha encontrado ahora que la adición de un agente de secado a la reacción entre maitansinol y un N-carboxianhídrido de un aminoácido incrementa sustancialmente el rendimiento de un éster de aminoácido de maitansinol, como se muestra en los Ejemplos 1-4. También se ha encontrado que la adición de una 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 proporciona un método para preparar un compuesto representado por la siguiente fórmula:



en donde R_1 es metilo; y R_2 es metilo, método que comprende:

- 20 a) hacer reaccionar maitansinol con un N-carboxianhídrido en una mezcla de reacción que comprende además una base y un ácido de Lewis seleccionado del grupo que consiste en 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, en donde el N-carboxianhídrido está representado por la siguiente fórmula:



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

b) hacer reaccionar *N*-carboxianhídrido que no ha reaccionado de la mezcla de reacción en la etapa a) con un reactivo nucleófilo, que es un alcohol seleccionado de metanol, etanol, *n*-propanol, isopropanol y terc-butanol.

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

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.

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

Descripción detallada de la invención

15 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.

En la invención, el método puede comprender hacer reaccionar maitansinol con un *N*-carboxianhídrido representado por la Fórmula (IIa) en una mezcla de reacción que comprende adicionalmente un agente de secado.

20 En una 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).

25 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.

30 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.

35 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.

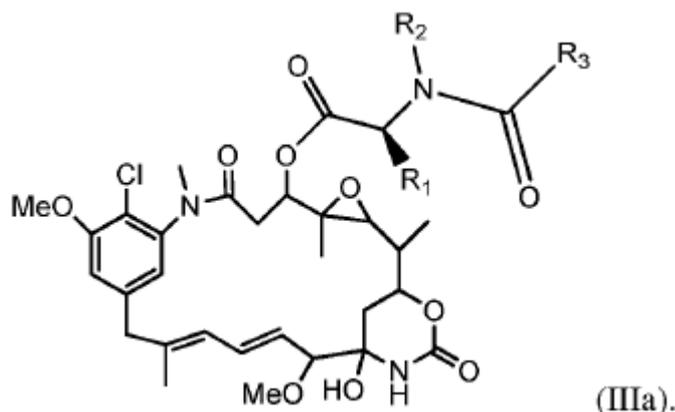
40 En la segunda realización, la mezcla de reacción de la etapa a) comprende además un agente de secado.

45 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, diisopropiletilamina, 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,

- 5 diisopropilamida 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 diisopropilamida.
- 10 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.
- 15 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 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.
- 20 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. El reactivo nucleofílico es como se ha definido anteriormente, es decir, es un alcohol seleccionado de metanol, etanol, n-propanol, isopropanol y terc-butanol.
- 25 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.
- 30 El ácido de Lewis 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.
- 35 Se usan opcionalmente 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.
- 40 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.
- 45 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 tetrahidrofurano), éter dietílico, dimetoxietano, dioxano, diclorometano o una mezcla de los mismos.
- 50 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.
- 55 El catión metálico del ácido de Lewis 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.

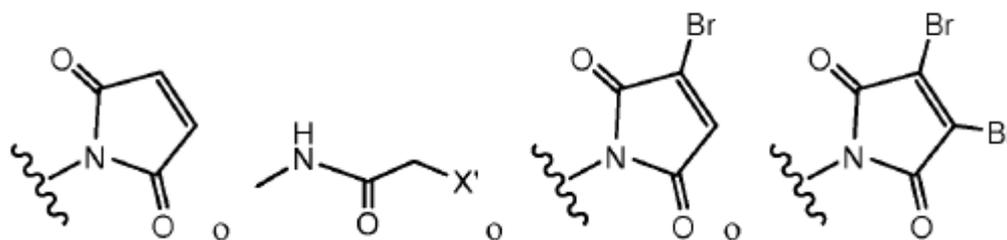
- 5 Además, dentro del alcance de la invención está un método para acilar el éster de aminoácido de maitansinol. El método comprende hacer reaccionar un éster de aminoácido de maitansinol representado por la Fórmula (Ia) preparado como se ha descrito anteriormente con un ácido carboxílico, que tiene la fórmula "R₃COOH", en presencia de un agente de condensación o con un ácido carboxílico activado que tiene la fórmula "R₃COX", para formar un compuesto representado por la siguiente fórmula:



- 10 En la Fórmula (IIIa), R₁ y R₂ son como se han definido en las Fórmulas (Ia) y (IIa); R₃ es un grupo alquilo o un grupo alquilo sustituido; y X en R₃COX 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 "R₃COX" descrito anteriormente, -COX es un éster reactivo; por
- 15 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-sulfonil-4-nitrofenilo y 3-carboxi-4-nitrofenilo.

Preferiblemente, R₃ es -Y-S-SR₄, Y es alqueno C1-C10, y R₄ es alquilo C1-C10, arilo o heteroarilo. En otra alternativa, Y es -CH₂CH₂- o -CH₂CH₂C(CH₃)₂- y R₄ es metilo.

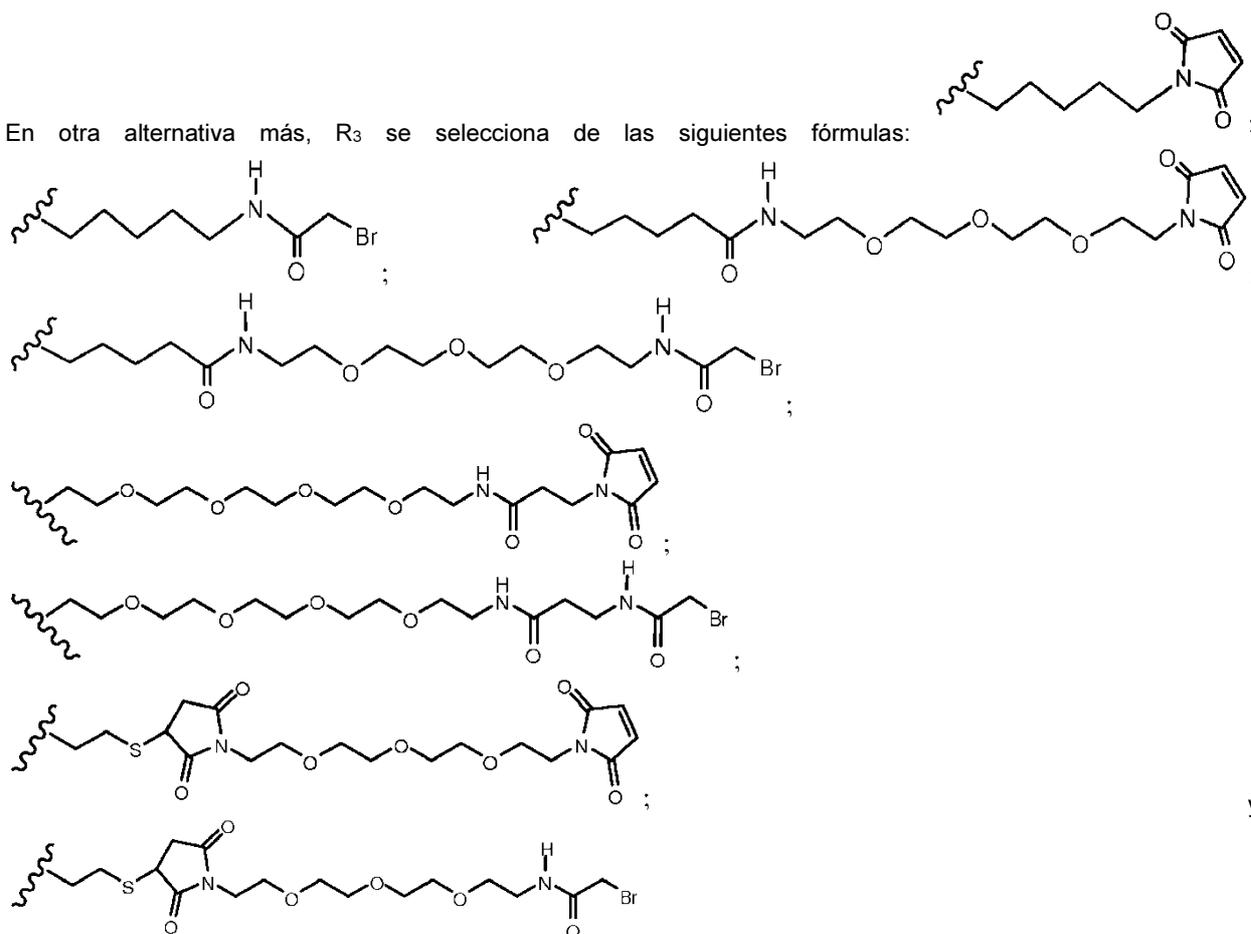
- 20 En otra realización, R₃ es -LE; L es $-(CH_2)_n \left(\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}-\text{N}-(CH_2CH_2O)_m CH_2CH_2 \right)_q$ o $-(CH_2CH_2O)_m CH_2CH_2 NHC(=O)CH_2CH_2-$ o $-(CH_2CH_2O)_m CH_2CH_2 S-$ o $-(CH_2CH_2O)_m CH_2CH_2 NHC(=O)CH_2CH_2-$;



E 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 $-(CH_2)_n-$; y n

- 25 es como se ha definido anteriormente o n es 5. En otra alternativa, L es $-(CH_2)_n \left(\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}-\text{N}-(CH_2CH_2O)_m CH_2CH_2 \right)_q$; y n y m son como se han definido anteriormente; o, alternativamente, n es 4 y m es 3.

En otra alternativa más, R₃ se selecciona de las siguientes fórmulas:

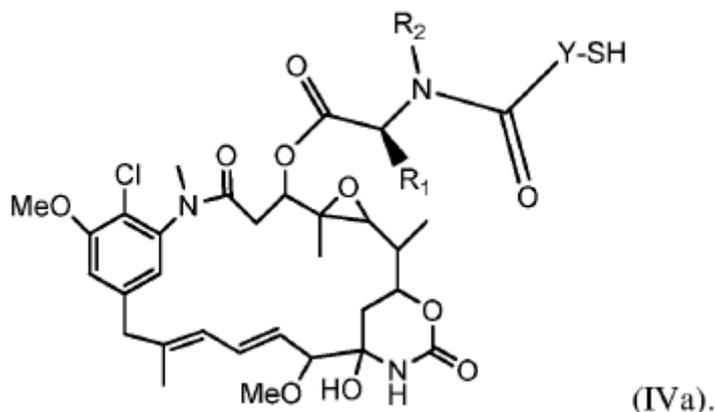


y

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-alcóxi-1-alcóxicarbonyl-1,2-dihidroquinolina (2-etoxi-1-etoxicarbonyl-1,2-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 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 -NO₂ 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), R₁ y R₂ son como se han definido en las Fórmulas (Ia) y (IIa); e Y es como se ha definido en la Fórmula (IIIa).

5 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 NaBH₄.

Los compuestos de fórmula (IIIa), cuando R₃ es -LE, 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 compuesto conector que porta un grupo reactivo que puede reaccionar con un anticuerpo 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.

15 "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, -CH₂CH(CH₃)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, -CH₂CH₂CH(CH₃)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.

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

25 "Alquileno 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, -CH₂CH(CH₃)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, -CH₂CH₂CH(CH₃)₂-, 1-hexilo, 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 alquileno tiene uno a diez átomos de carbono. Más preferentemente, el alquileno tiene uno a cuatro átomos de carbono.

30 "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, etileno o vinilo (-CH=CH₂), alilo (-CH₂CH=CH₂), 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 preferentemente, el alquilo cíclico es ciclohexilo.

40 "Arilo" 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. Arilo incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático fusionado a un anillo saturado, parcialmente insaturado o un anillo carbocíclico o heterocíclico aromático. Los grupos arilo 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 arilo es fenilo opcionalmente sustituido (p. ej., fenilo, fenol o fenol protegido).

5 "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.

15 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)NH₂], -OR¹⁰⁰, NR¹⁰¹R¹⁰², -NO₂, NR¹⁰¹COR¹⁰², -SR¹⁰⁰, un sulfóxido representado por -SOR¹⁰¹, una sulfona representada por -SO₂R¹⁰¹, un sulfato -SO₃R¹⁰⁰, un sulfonato -OSO₃R¹⁰⁰, una sulfonamida representada por -SO₂NR¹⁰¹R¹⁰², ciano, un azido, -COR¹⁰¹, -OCOR¹⁰¹, -OCONR¹⁰¹R¹⁰²; R¹⁰¹ y R¹⁰² cada uno se selecciona independientemente entre H, alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono.

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

25 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales o aminoácidos no naturales representados por NH₂-C(R^{aa}R^{aa})-C(-O)OH, en donde R^{aa} y R^{aa} son cada uno independientemente H, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heteroarilo o heterocíclico. 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^{aa}R^{aa})-C(=O)O-. Los ejemplos específicos siguientes deben considerarse como meramente ilustrativos, y no limitativos el resto de la descripción de ninguna manera en absoluto. Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica puede, en función de la descripción de la presente memoria, utilizar la presente invención en la mayor medida posible. Cualquier mecanismo propuesto a continuación no restringe de ninguna manera el alcance de la invención reivindicada.

Ejemplificación

35 El Ejemplo 8 es un método de la invención. Los ejemplos 1 a 7, 9 y 10 son métodos presentados no como realizaciones de la invención, sino como métodos que son útiles para entender 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.

40 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-oxazolidindiona 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) (¹H 400MHz, ¹³C 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)

50 Flujo: 1 mL / min (Gradiente)

Fase Móvil: A = 1 mL de 85 % de H₃PO₄ en 1 litro de agua ; B = acetonitrilo/Tetrahidrofurano 30:70 (v/v) (Nota: se usó

0.1 % de TFA en lugar de H₃PO₄ en la fase móvil A en el análisis de LC / MS

Tabla de gradiente:

ES 2 716 561 T3

	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

- 5 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

- 10 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
31	25
37	25

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

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

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.

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

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)

5 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 N²-desacetil-maitansina representó el 80 % del área total de HPLC. La mezcla de reacción se diluyó con 1:1 de NaHCO₃ 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

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

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

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 N²-desacetil-maitansina representó el 65 % del área total de HPLC. La mezcla de reacción se diluyó con 1:1 de NaHCO₃ 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.

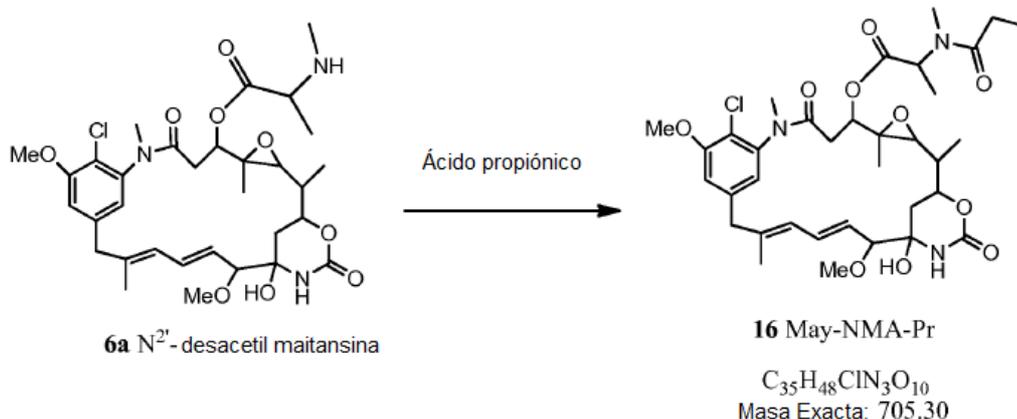
30 Ejemplo 4. Repetición del ejemplo 3

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

Ejemplo 5. Disolución madre de N²-desacetil-maitansina cruda

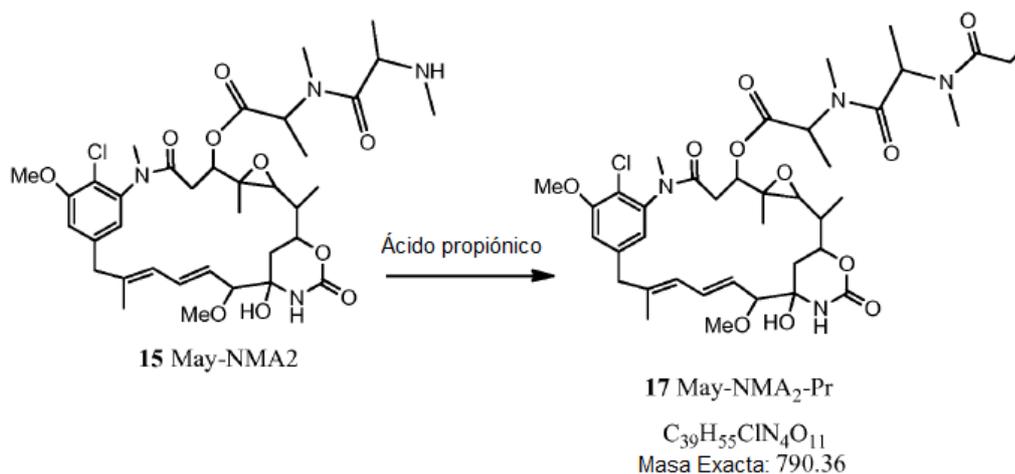
35 Se disolvió maitansinol (0.5 g, 0.89 mmoles) en dimetilformamida anhidra (7 mL) en un matraz de 25 mL que se enfrió en un baño de hielo/agua. Después de 2 minutos, se añadieron diisopropiletilamina (0.5 g, 3.5 mmoles) y triflato de cinc (1.9 g, 5.3 mmoles) con agitación magnética, luego se añadió 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.

40 Ejemplo 6. Extracción de N²-desacetil-maitansina seguida del acoplamiento a ácido propiónico (Control)



5 Se añadió disolución madre de N²-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:NaHCO₃ saturado (0.75 mL), se tapó rápidamente y se mezcló. La capa orgánica se retuvo y se secó sobre Na₂SO₄ 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 hidrocloreuro 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⁺) 728; MS de **17** (M+ Na⁺) 813.

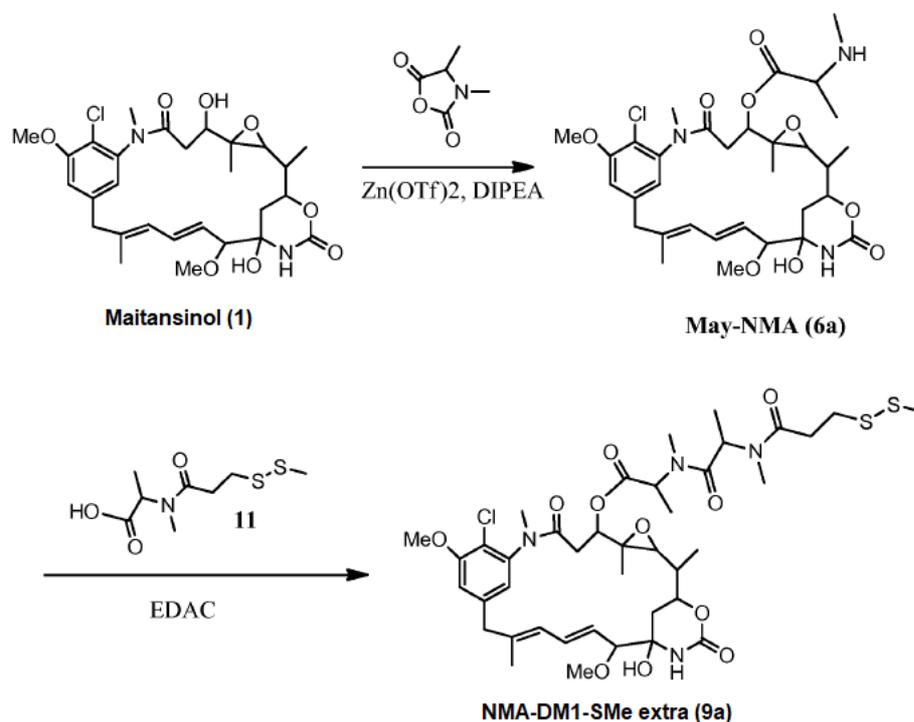
Ejemplo 7. Se repitió el experimento del Ejemplo 6.

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

15 Ejemplo 8. Extracción de N²-desacetil-maitansina seguida de una preinactivación con metanol, después acoplamiento con ácido propiónico (Preinactivación para destruir el exceso de **5a**)

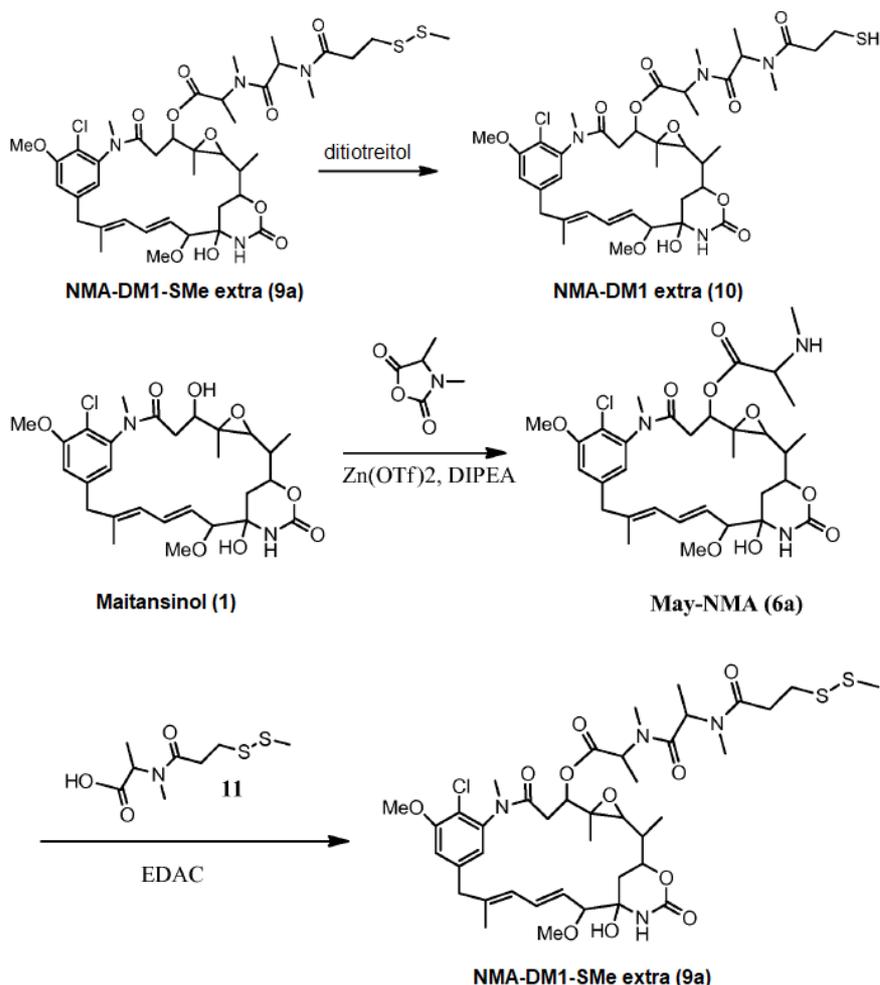
20 Se añadió disolución madre de N²-desacetil-maitansina (0.50 mL) a un vial con una capacidad de 6 mL al que se añadió metanol (75 µL, 1.8 mmoles) y el vial se tapó y los contenidos se agitaron magnéticamente durante 1 hora. Se añadieron entonces acetato de etilo (1.5 mL) y 1:1 de NaCl saturado:NaHCO₃ (0.75 mL) y el vial se tapó y se mezcló. La capa orgánica se retuvo y se secó sobre Na₂SO₄ 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 hidrocloreuro 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-DMI-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:NaHCO₃ acuoso saturado (14 mL) y acetato de etilo (100 mL). La capa orgánica se retuvo y se secó sobre Na₂SO₄ 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 hidrocloruro 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:NaHCO₃ acuoso saturado (20 mL). La capa orgánica se retuvo y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria en vacío. El aceite espeso resultante se disolvió en acetonitrilo (3 mL) y aproximadamente ½ 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 %). ¹H RMN (400MHz, CDCl₃-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, 1 H), 6.42 (dd, J = 11.4, 15.2 Hz, 1 H), 6.30 (s, 1 H), 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, 1 H), 1.45 (d, J = 6.3 Hz, 1 H), 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) ¹³C RMN (CDC13, 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 C₄₀H₅₇ClN₄O₁₁S₂ (M + Na⁺) m/z = 891.3052; encontrado 891.3049.

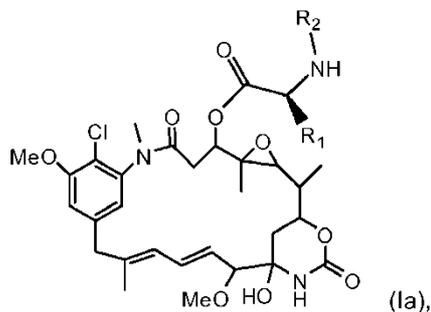
Ejemplo 10. Síntesis de NMA-DM1 extra (10)



Se disolvió N²-desacetil-N²-(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 ditiotreitol (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 Na₂SO₄ 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 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) 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). ¹³C RMN (CDC13, 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 C₃₉H₅₅ClN₄O₁₁S (M + Na⁺) m/z = 845.3174; encontrado 845.3166.

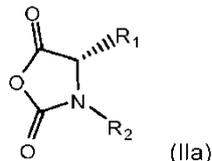
REIVINDICACIONES

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



5 en donde R₁ es metilo; y R₂ 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 ácido de Lewis seleccionado del grupo que consiste en 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, en donde el *N*-carboxianhídrido está representado por la siguiente fórmula:



10

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

b) hacer reaccionar *N*-carboxianhídrido que no ha reaccionado de la mezcla de reacción en la etapa a) con un reactivo nucleofílico, que es un alcohol seleccionado de metanol, etanol, n-propanol, isopropanol y terc-butanol.

15

2. El método de la reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción en la etapa a) comprende además un agente de secado.

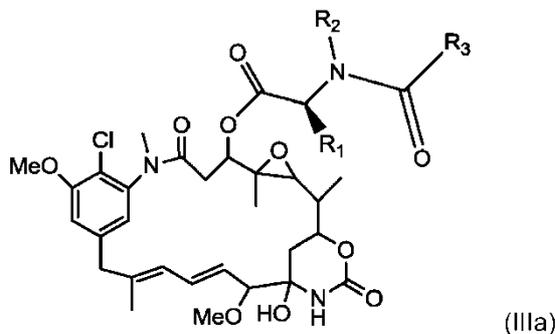
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el reactivo nucleofílico es metanol.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 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.

20

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido de Lewis es triflato de cinc.

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 R₃COOH en presencia de un agente de condensación o con un ácido carboxílico activado que tiene la fórmula R₃COX, para formar un compuesto representado por la siguiente fórmula:



25

en donde R₃ 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:

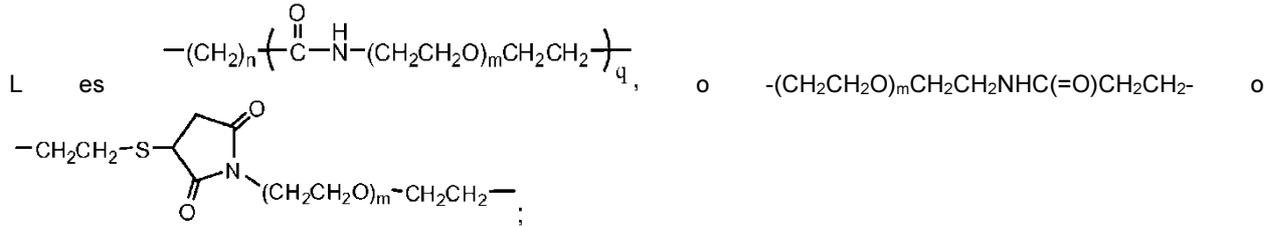
i) X es un haluro, un grupo alcoxi, un grupo ariloxi, un imidazol, -S-fenilo opcionalmente sustituido con nitro o cloruro, o -OCOR, en el que R es un grupo alquilo C1-C10 lineal, un grupo alquilo C1-C10 ramificado, un grupo alquilo C3-C10 cíclico, o un grupo alquenilo C1-C10;

5 ii) -COX es un éster reactivo;

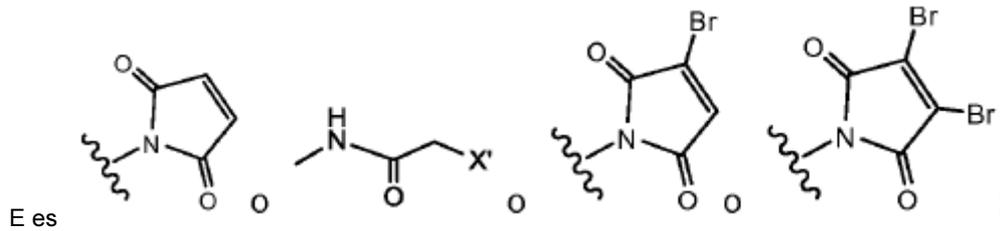
iii) R₃ es -Y-S-SR₄, en donde Y es alquileo C1-C10 y R₄ es alquilo C1-C10, arilo o heteroarilo;

iv) R₃ es -Y-S-SR₄, en donde Y es -CH₂CH₂- o -CH₂CH₂C(CH₃)₂- y R₄ es -CH₃;

v) R₃ es -L-E;



10



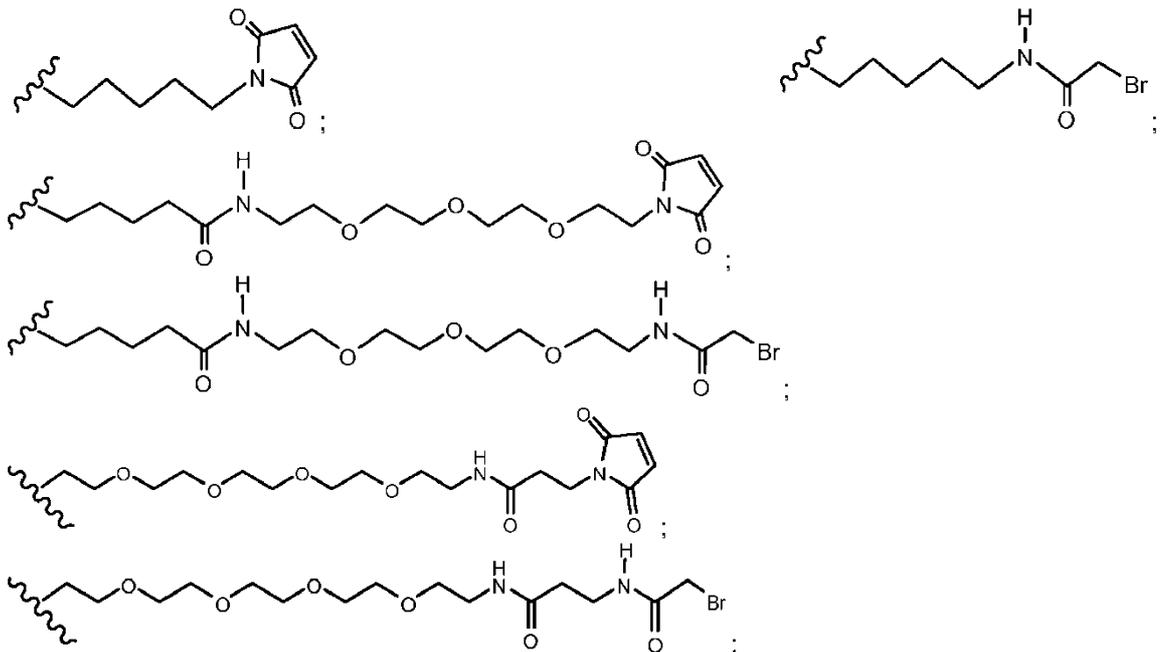
X' es un haluro;

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

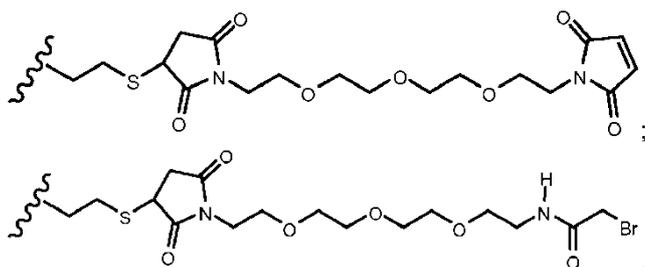
m es 0 o un entero de 1 a 20; y

15 q es 0 o 1, preferiblemente L es $-(CH_2)_n-$ o $-(CH_2)_n \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}-\text{N}-(CH_2CH_2O)_m CH_2CH_2-$;

vi) R₃ está representado por uno de los siguientes:



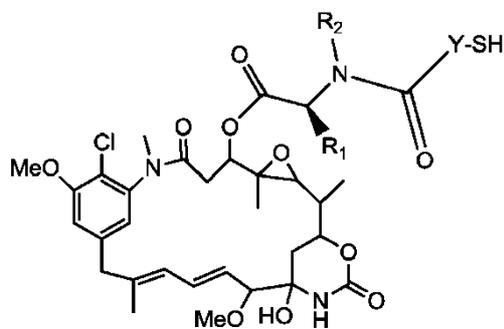
20



y

8. El método de la reivindicación 7, en el que R_3 es $-Y-S-SR_4$, en el que Y es $-CH_2CH_2-$ o $-CH_2CH_2C(CH_3)_2-$; R_4 es $-CH_3$; y $-COX$ 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 (III) con un agente reductor para formar un compuesto representado por la siguiente fórmula:



(IVa).

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-alkoxi-1-alkoxycarbonil-1,2-dihidroquinolina, o alkilclorofornato; 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 alkil 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 2-13, 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.

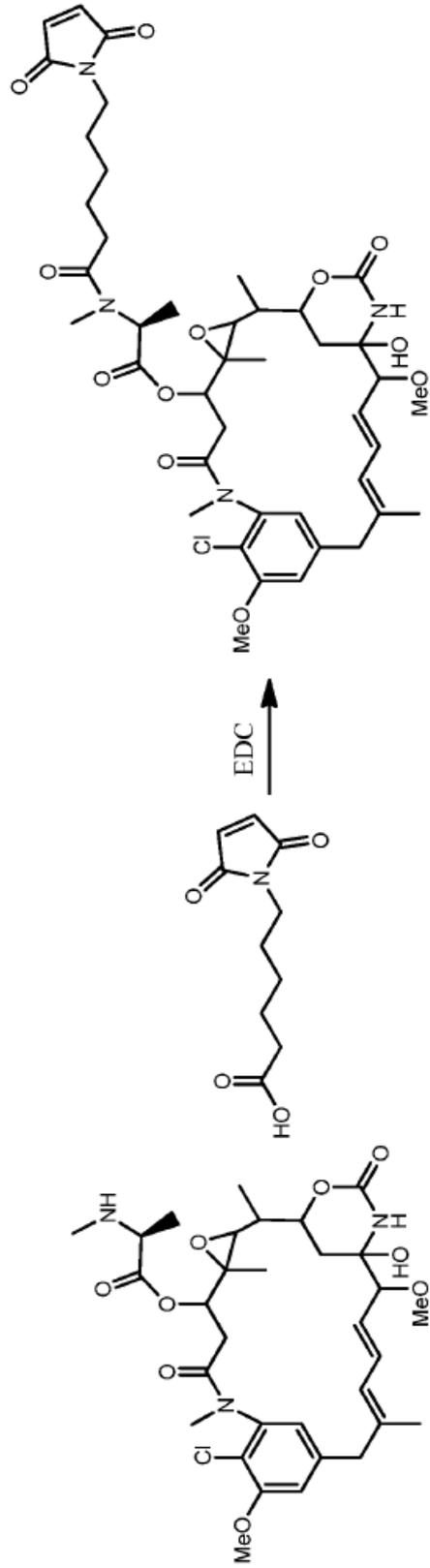


Figura 2

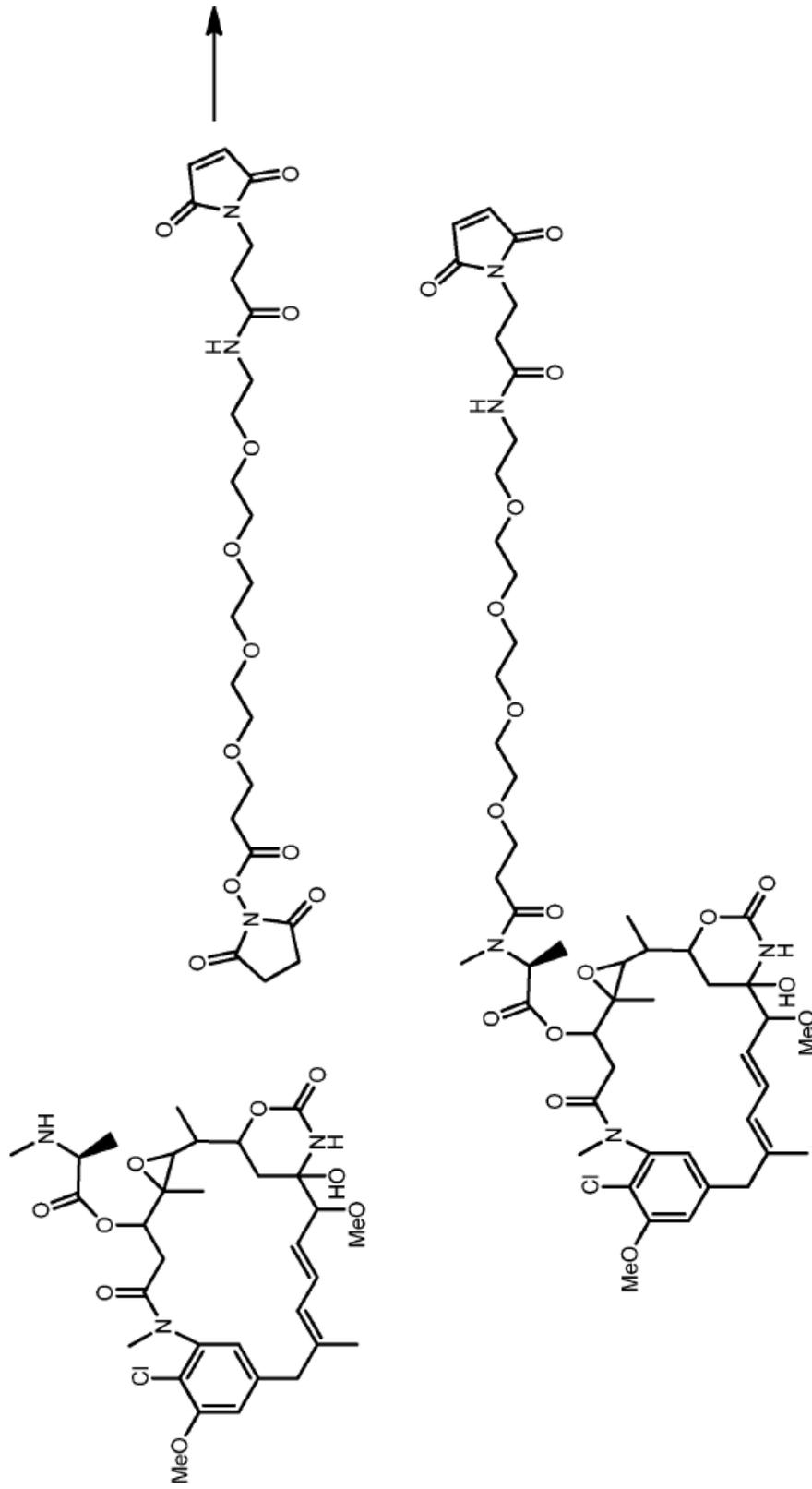


Figura 3

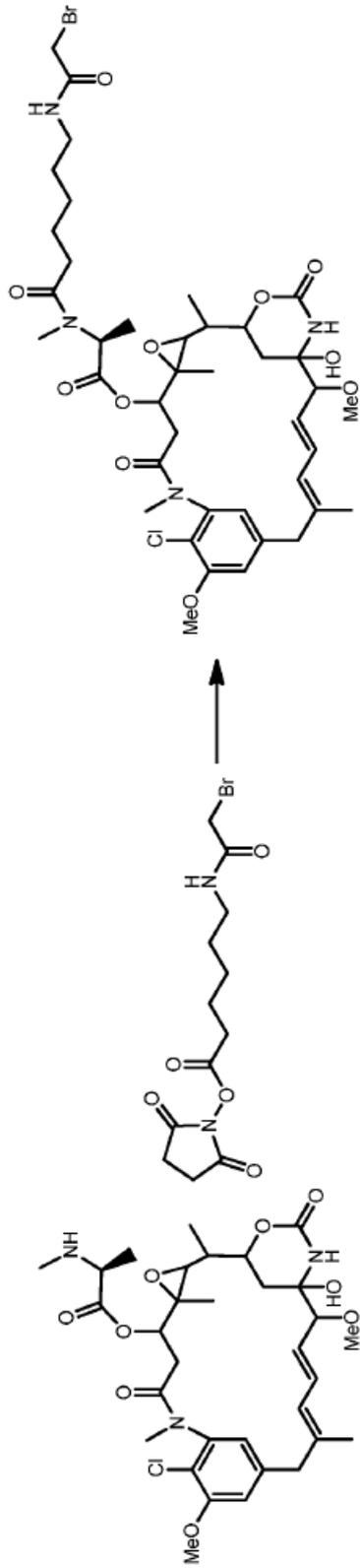


Figura 4