



Brevetto europeo No. 2900676

Domanda di brevetto europeo No. 13774881.0

Data di deposito: 26 settembre 2013

Classificazione Internazionale: C07D498/18, C07D498/16

5 Priorità: Statunitense No. 20126170573 1P del 26 settembre 2012

Titolo: METODO MIGLIORATO PER L'ACILAZIONE DI MAYTANSINOLO

Richiedente: ImmunoGen, Inc.

830 Winter Street

Waltham, MA 02451

10 U.S.A.

Inventori: WIDDISON, Wayne C.

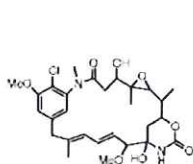
ZHAO, Robert Yongxin

CAMPO DELL'INVENZIONE

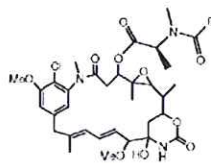
15 [0001] La presente invenzione è un procedimento migliorato per preparare intermedi nella sintesi di maytansinoidi e loro coniugati di anticorpi.

CONTESTO DELL'INVENZIONE

[0002] I maytansinoidi sono composti altamente citotossici, inclusi maytansinolo ed esteri C-3 di maytansinolo (brevetto U.S. n. 4,151,042), come mostrato di seguito:



11 Maytansinolo



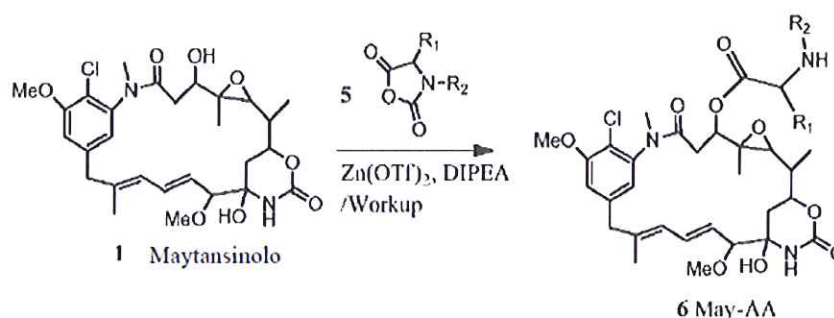
Catena laterale di N-metil-L-alanina

- 2 Maytansinolo R = CH₃
- 3 DM1 R = CH₂CH₂SH
- 4 DM1 R = CH₂CH₂CH₂SH

20

[0003] Gli esteri C-3 di maytansinolo presenti in natura e sintetici possono essere classificati in due gruppi: (a) Maytansina (2) e suoi analoghi (ad esempio, DM1 e DM4), che sono esteri C-3 con N-metil-L-alanina o derivati di N-metil-L-alanina [brevetti U.S. nn. 4,137,230; 4,260,608; 5,208,020; e Chem. Pharm. Bull. 12:3441 (1984)]; (b) Ansamitocine, che sono esteri C-3 con acidi carbossilici semplici (brevetti U.S. nn. 4,248,870; 4,265,814; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,317,821; 4,322,348 e 4,331,598).

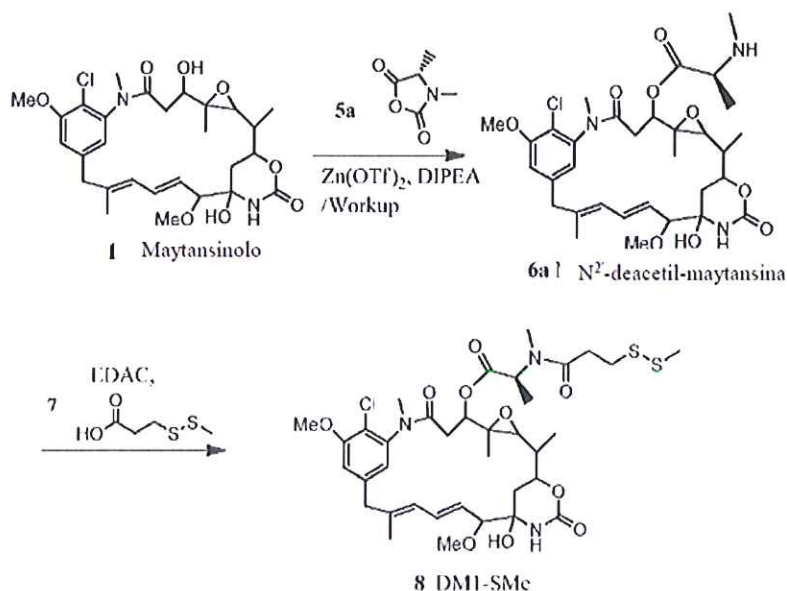
[0004] La maytansina (2), i suoi analoghi e ciascuna delle specie di ansamitocina sono esteri C3 di maytansinolo che possono essere preparati mediante esterificazione di maytansinolo (1). I brevetti U.S. nn. 7,301,019 e 7,598,375 descrivono metodi per acilare maytansinolo (1), con una N-carbossianidride di un amminoacido (NCA, 5), in presenza di una base per formare un estere amminoacidico di maytansinolo (May-AA, 6) come mostrato di seguito:



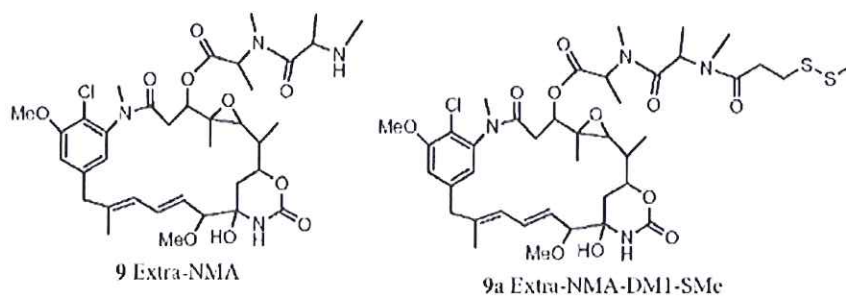
10

[0005] Gli esteri amminoacidici di maytansinolo sono intermedi importanti che possono essere accoppiati agli acidi carbossilici per fornire maytansinoidi. Ad esempio, la reazione di maytansinolo con (4S)-3,4-dimetil-2, 5-ossazolidindione (5a) forma N²'-deacetil-maytansina (6a), che a sua volta può essere accoppiata all'acido 3-(metilditio)propionico (7), utilizzando N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide cloridrato (EDAC) per formare DM1-SMe (8) come mostrato di seguito:

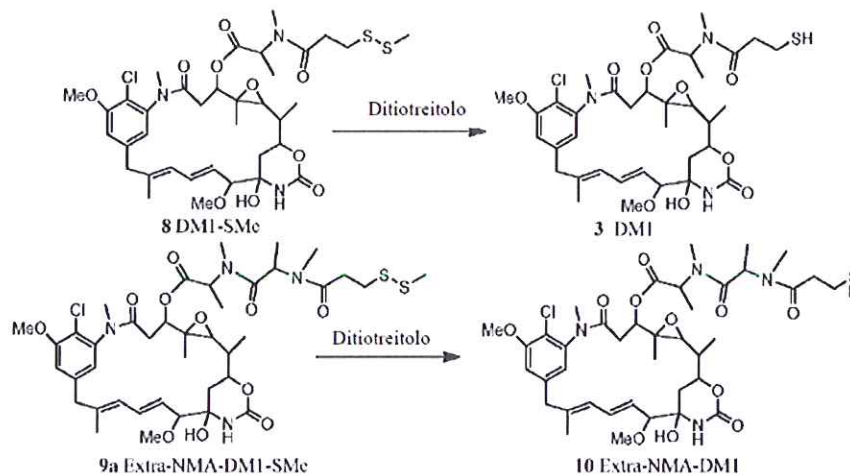
15



[0006] Uno svantaggio significativo della reazione di acilazione che forma esteri amminoacidici di maytansinolo è che forma anche un sottoprodotto comprendente una frazione extra di N-metil-alanile nella catena laterale C3, definita come "extra-NMA" (9). Quando N^{2'}-deacetyl-maytansina è acilata, anche extra NMA (9) è acilata per formare extra NMA-DM1-SMe (9a). Le strutture di extra-NMA (9) ed extra-NMA-DM1-SMe (9a) sono mostrate di seguito:



[0007] DM1 (3) può essere preparato da DM1-SMe (8) mediante riduzione, che converte anche qualsiasi extra-NMA-DM1-SMe (9a) in extra-NMA-DM1 (10) come mostrato di seguito:



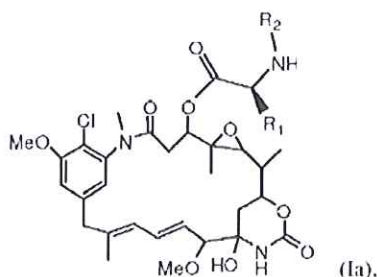
[0008] Extra-NMA-DM1 (10) è difficile da rimuovere da DM1 (3) perché entrambi i composti hanno polarità simili e danno picchi sovrapposti nel tracciato HPLC di DM1 purificato (3). DM1 (3) e DM4 (4) sono utilizzati per preparare coniugati di anticorpi, svariati dei quali sono attualmente in studi clinici.

[0009] Pertanto, sussiste la necessità di migliorare la resa e la robustezza dei procedimenti per preparare tali maytansinoidi e per minimizzare i sottoprodotti formati durante le reazioni utilizzate nella loro preparazione.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

[0010] È stato ora scoperto che l'aggiunta di un agente di essiccamento alla reazione tra maytansinolo e una N-carbossianidride di un amminoacido aumenta sostanzialmente la resa di un estere amminoacidico di maytansinolo, come mostrato negli Esempi 1-4. È stato anche scoperto che l'aggiunta di una fase di pre-spegnimento con un nucleofilo in seguito alla reazione di maytansinolo e una N-carbossianidride di un amminoacido riduce sostanzialmente la formazione di sottoprodotti indesiderabili, come extra-NMA, come mostrato negli Esempi 6-8. Sulla base di queste scoperte, nel presente contesto sono descritti metodi migliorati per preparare un estere amminoacidico di maytansinolo.

[0011] L'invenzione fornisce un metodo per preparare un composto rappresentato dalla seguente formula:



in cui R₁ è metile; e R₂ è metile, il metodo comprendendo:

- 5 a) far reagire maytansinolo con una *N*-carbossianidride in una miscela di reazione comprendente inoltre una base e un acido di Lewis scelto dal gruppo costituito da triflato di zinco, cloruro di zinco, bromuro di magnesio, triflato di magnesio, triflato di rame, bromuro di rame (II), cloruro di rame (II) e cloruro di magnesio, in cui la *N*-carbossianidride è rappresentata dalla seguente formula:



formando così il composto di Formula (Ia);

- 10 b) far reagire *N*-carbossianidride non reagita dalla miscela di reazione nella fase a) con un reagente nucleofilo, che è un alcol scelto tra metanolo, etanolo, *n*-propanolo, isopropanolo e *terz*-butanolo.

[0012] Tutte le variabili in Formula (IIa) sono come definite in Formula (Ia).

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

[0013]

- 15 Le Figure 1-2 sono schemi che mostrano l'acilazione di N2'-deacetil-maytansina con un acido carbossilico e un agente condensante.



Le Figure 3-4 sono schemi che mostrano l'acilazione di N2'-deacetil-maytansina con un acido carbossilico attivato.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

5 [0014] La presente invenzione si riferisce a metodi per preparare un estere amminoacidico rappresentato dalla Formula (Ia) da maytansinolo e la N-carbossianidride rappresentata dalla Formula (IIa). L'estere amminoacidico può essere ulteriormente esterificato per preparare maytansinoidi come DM1 e DM4 e poi ulteriormente elaborato in coniugati di anticorpi di maytansinoide.

[0015] Nell'invenzione, il metodo può comprendere far reagire maytansinolo con una N-carbossianidride rappresentata dalla Formula (IIa) in una miscela di reazione comprendente inoltre un agente di essiccamento.

10 [0016] In una forma di realizzazione preferita, maytansinolo e la N-carbossianidride vengono prima fatti reagire e la miscela di reazione viene poi messa a contatto con una soluzione acquosa contenente bicarbonato o carbonato o mettendo a contatto la miscela di reazione con un decontaminante di metalli. Si possono utilizzare decontaminanti di metalli noti nella tecnica (si veda, ad esempio, il capitolo 9 in "The Power of Functional Resin in Organic Synthesis" di Aubrey Mendoca, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008). Esempi di decontaminanti di metalli includono, 15 tuttavia senza limitazioni, decontaminante di metalli polimerico e a base di silice (ad esempio, QuadraPure™ e QuadraSil™ di Sigma-Aldrich, SiliaMetS® di SiliCycle, Smopex® di Johnson Matthey e decontaminanti di metalli Biotage), decontaminanti a base di carbonio (ad esempio, QuadraPure™ C di Sigma-Aldrich).

[0017] In un'altra forma di realizzazione preferita, maytansinolo e la N-carbossianidride vengono prima fatti reagire e il catione metallico dall'acido di Lewis viene poi rimosso dalla miscela di reazione. Ad esempio, il catione 20 metallico dall'acido di Lewis viene rimosso dalla miscela di reazione mettendo a contatto la miscela di reazione con una soluzione acquosa contenente bicarbonato o carbonato o mettendo a contatto la miscela di reazione con un decontaminante di metalli.

[0018] In una forma di realizzazione preferita, la miscela di reazione della fase a) comprende inoltre un acido di Lewis. Gli acidi di Lewis preferiti comprendono un catione metallico.

25 [0019] In un'altra forma di realizzazione preferita, la miscela di reazione dopo la fase b) viene messa a contatto



con una soluzione acquosa contenente bicarbonato o carbonato o con un decontaminante di metalli.

[0020] In un'altra forma di realizzazione preferita, il catione metallico dall'acido di Lewis viene rimosso dalla miscela di reazione dopo aver eseguito la fase b), vale a dire dopo la reazione del nucleofilo con la N-carbossianidride non reagita. Ad esempio, il catione metallico dall'acido di Lewis viene rimosso dalla miscela di reazione mettendo a
5 contatto la miscela di reazione con una soluzione acquosa contenente bicarbonato o carbonato o mettendo a contatto la miscela di reazione con un decontaminante di metalli.

[0021] In una seconda forma di realizzazione, la miscela di reazione della fase a) comprende inoltre un agente di essiccamento.

[0022] Il termine "base" si riferisce a una sostanza che può accettare ioni idrogeno (protoni) o donare una coppia
10 di elettroni di valenza. Le basi esemplificative sono non nucleofile e non reattive alla N-carbossianidride rappresentata dalla Formula (II). Esempi di basi adatte includono una trialchilammina (ad esempio, diisopropilettilammina, trietilammina e 1,8-Diazabicycloundec-7-ene), un alcossido metallico (ad esempio, terz-butossido di sodio e terz-butossido di potassio), un alchilmetallo (ad esempio, terz-butillitio, metillitio, n-butillitio, terz-butillitio, litio diisopropilammide, sodio pentilico e 2-fenilisopropil-potassio), un arilmetallo (ad esempio, fenillitio), un idruro di
15 metallo (ad esempio, idruro di sodio), un'ammide di metallo (ad esempio, ammide di sodio, ammide di potassio, litio diisopropilammide e litio tetrametilpiperidide) e un'ammide a base di silicio [ad esempio, sodio bis(trimetilsilil)ammide e potassio bis(trimetilsilil)ammide]. Preferibilmente, la base è una trialchilammina Più preferibilmente, la base è diisopropilettilammina.

[0023] Il termine "agente di essiccamento" si riferisce a un agente che può rimuovere l'acqua da una soluzione.
20 Esempi di un agente di essiccamento adatto includono, tuttavia senza limitazioni, setacci molecolari, solfato di sodio, solfato di calcio, cloruro di calcio e solfato di magnesio. Le forme fisiche degli agenti di essiccamento includono, tuttavia senza limitazioni, biglie o polveri granulari. Preferibilmente, l'agente di essiccamento è setaccio molecolare. In alternativa, l'agente di essiccamento è solfato di sodio.

[0024] Il termine "acido di Lewis" si riferisce a una sostanza acida che può impiegare una coppia solitaria di
25 elettroni da un'altra molecola nel completamento del gruppo stabile di uno dei suoi stessi atomi. Gli acidi di Lewis per



l'uso nei metodi descritti includono triflato di zinco, cloruro di zinco, bromuro di magnesio, triflato di magnesio, triflato di rame, bromuro di rame (II), cloruro di rame (II) e cloruro di magnesio. Preferibilmente, l'acido di Lewis è triflato di zinco.

5 [0025] Il termine "reagente nucleofilo" si riferisce a un reagente che reagisce con centri elettropositivi nella N-carbossianidride rappresentata dalla Formula (IIa) per decomporre la N-carbossianidride. Il reagente nucleofilo è come sopra definito, vale a dire è un alcol scelto tra metanolo, etanolo, n-propanolo, isopropanolo e terz-butanolo.

[0026] Le condizioni di reazione esemplificative per preparare gli esteri amminoacidici di maytansinolo rappresentati dalla Formula (Ia) sono fornite di seguito. Condizioni specifiche sono fornite in Esempificazione.

10 [0027] Sebbene possano essere utilizzate quantità equimolari tra maytansinolo e una N-carbossianidride, più comunemente la N-carbossianidride è utilizzata in eccesso. Rapporti molari esemplificativi tra maytansinolo e N-carbossianidride variano da 1:1 a 1:10, più comunemente da 1:2 a 1:7 o da 1:1 a 1:4. In una forma di realizzazione preferita, il rapporto molare tra maytansinolo e N-carbossianidride è di circa 1:5.

15 [0028] L'acido di Lewis è tipicamente utilizzato in eccesso rispetto al maytansinolo, ad esempio, fino a un eccesso di 20 volte. Più comunemente, il rapporto molare tra maytansinolo e acido di Lewis varia da 1:5 a 1:8, più preferibilmente circa 1:7. È possibile utilizzare anche quantità minori di acido di Lewis.

[0029] Quantità sufficienti di agenti di essiccamento sono opzionalmente utilizzate per rimuovere l'acqua disciolta dal solvente di reazione. La quantità di agente di essiccamento non è fondamentale, a condizione che la soluzione di reazione sia resa sostanzialmente anidra. L'agente di essiccamento può essere utilizzato direttamente nel recipiente di reazione o essendo contenuto nel recipiente da una barriera semipermeabile, come un contenitore di vetro sinterizzato.

20 [0030] Il tempo richiesto per la reazione può essere facilmente monitorato da un esperto della tecnica utilizzando tecniche incluse, tuttavia senza limitazioni, cromatografia liquida ad alta pressione e cromatografia su strato sottile. Una reazione tipica viene completata dopo agitazione per 24 ore ma può essere effettuata a velocità minore o maggiore a seconda di vari fattori, come temperatura di reazione e concentrazioni dei reagenti.

25 [0031] La reazione può essere effettuata tra -20 °C e 80 °C, preferibilmente tra -10 °C e 60 °C, più preferibilmente tra -10 °C e 40 °C e in maniera assolutamente preferita tra 0 °C e 35 °C.



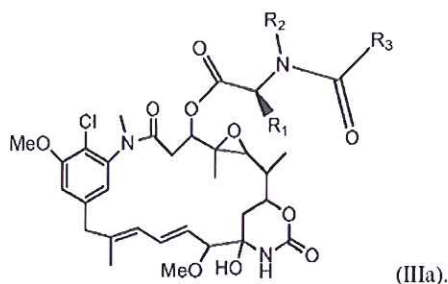
[0032] Solventi adatti sono facilmente determinati da un esperto della tecnica con competenza ordinaria, e includono, tuttavia senza limitazioni, solventi aprotici polari come dimetilformammide anidra, dimetilsolfossido (DMSO) o dimetilacetammide (DMA), esani, eteri (come tetraidrofurano, dietilere, dimetossietano, diossano), diclorometano o una loro miscela.

5 [0033] La miscela di reazione dopo la reazione di maytansinolo e la N-carbossianidride viene preferibilmente messa a contatto con una soluzione acquosa contenente bicarbonato o carbonato o con un decontaminante di metalli. Preferibilmente, la miscela di reazione viene fatta reagire con il reagente nucleofilo per decomporre la N-carbossianidride in eccesso prima che la miscela di reazione venga messa a contatto con una soluzione acquosa contenente bicarbonato o carbonato o con un decontaminante di metalli.

10 [0034] Il catione metallico dell'acido di Lewis viene preferibilmente rimosso dalla miscela di reazione come parte del work-up di reazione. La rimozione del catione metallico può essere ottenuta mettendo a contatto la miscela di reazione con una soluzione acquosa contenente bicarbonato o carbonato o con un decontaminante di metalli. Preferibilmente, la N-carbossianidride viene fatta reagire con il reagente nucleofilo prima della rimozione del catione metallico.

15 [0035] La quantità di un nucleofilo nella fase b) può essere facilmente determinata da un esperto della tecnica. Preferibilmente, una quantità sufficiente di nucleofilo viene utilizzata per decomporre la N-carbossianidride non reagita. Si tratta in genere di una quantità equimolare di nucleofilo, tuttavia, possono anche essere utilizzate quantità in eccesso di nucleofilo. Una reazione tipica viene completata dopo 1 ora di agitazione ma può essere effettuata a velocità minore o maggiore a seconda di vari fattori, come la temperatura.

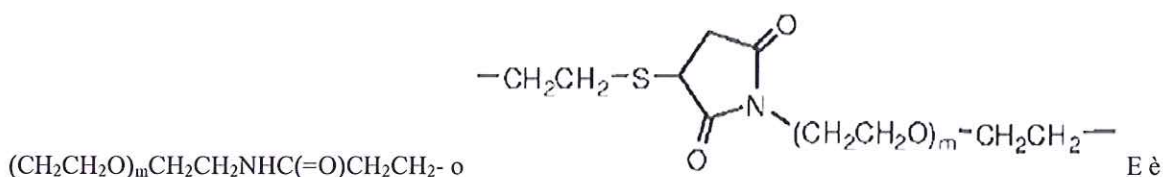
20 [0036] Inoltre, nell'ambito dell'invenzione vi è un metodo di acilazione dell'estere amminoacidico di maytansinolo. Il metodo comprende la reazione di un estere amminoacidico di maytansinolo rappresentato dalla Formula (Ia) preparato come descritto sopra con un acido carbossilico, avente la formula " R_3COOH ", in presenza di un agente condensante o con un acido carbossilico attivato avente la formula " R_3COX ", per formare un composto rappresentato dalla seguente formula:

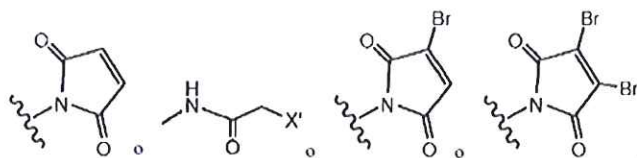


[0037] Nella Formula (IIIa), R₁ e R₂ sono come definiti nelle Formule (Ia) e (IIa); R₃ è un gruppo alchile o un gruppo alchile sostituito; e X in R₃COX è un gruppo uscente. Preferibilmente, X è un alogenuro, un gruppo alcossi, un gruppo arilossi, un imidazolo, -S-fenile, in cui fenile è opzionalmente sostituito con nitro o cloruro, o -OCOR, in cui R è un gruppo alchile C1-C10 lineare, un gruppo alchile C1-C10 ramificato, un gruppo alchile C3-C10 ciclico o un gruppo alchenile C1-C10. In una forma di realizzazione, nella formula "R₃COX" sopra descritta, -COX è un estere reattivo; ad esempio un estere di N-succinimide opzionalmente sostituito. Esempi di un estere reattivo includono, tuttavia senza limitazioni, esteri di N-succinimide, N-solfosuccinimide, N-ftalimide, N-solfoftalimide, 2-nitrofenile, 4-nitrofenile, 2,4-dinitrofenile, 3-solfonil-4-nitrofenile e 3-carbossi-4-nitrofenile.

[0038] Preferibilmente, R₃ è -Y-S-SR₄, Y è alchilene C1-C10, e R₄ è alchile, arile o eteroarile C1-C10. In un'altra alternativa, Y è -CH₂CH₂- o -CH₂CH₂C(CH₃)₂- e R₄ è metile.

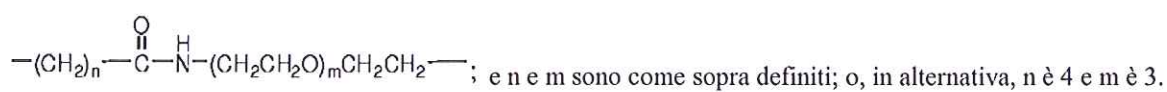
[0039] In un'altra forma di realizzazione, R₃ è -L-E; L è $-(CH_2)_n \left(\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{N} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m \text{CH}_2\text{CH}_2 \right)_q$ o -



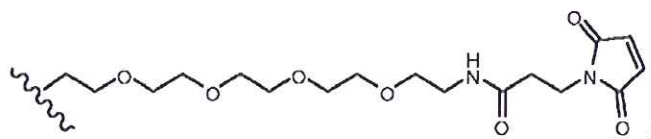
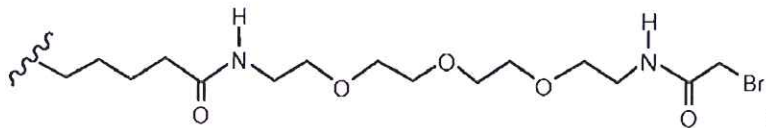
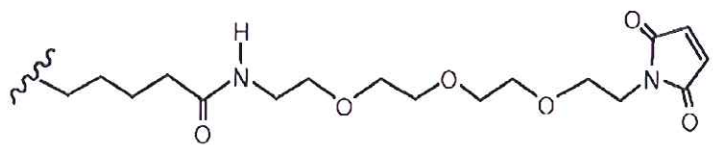
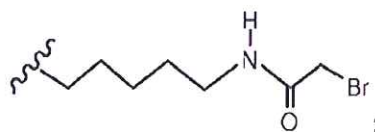
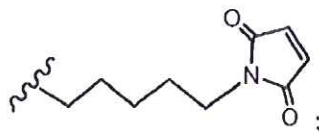


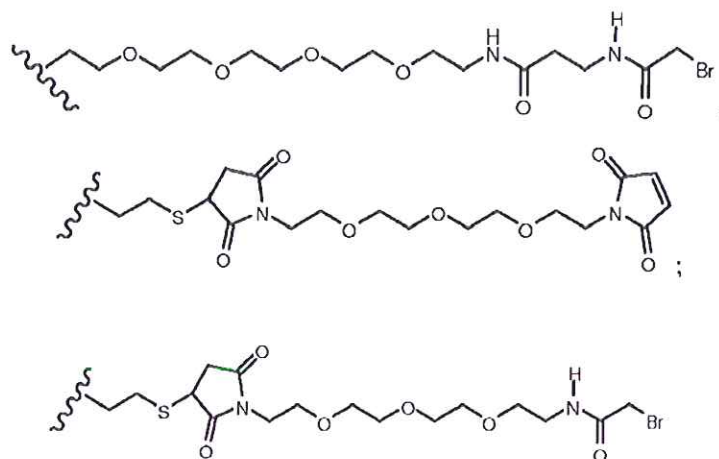
; X' è un alogenuro; n è 1, 2, 3, 4, 5 o 6; m è 0 o un numero

intero da 1 a 20; e q è 0 o 1. In alternativa, L è $-(CH_2)_n-$; e n è come definito sopra o n è 5. In un'altra alternativa, L è



[0040] In ancora un'altra alternativa, R₃ è scelto dalle seguenti formule:





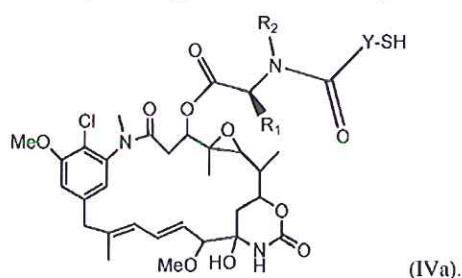
e

- 5 [0041] Il termine "agente condensante" è un reagente che reagisce con il gruppo idrossile di un acido carbossilico e lo converte in un gruppo uscente, che può essere spostato da un'ammina o un gruppo idrossile. Esempi di agenti condensanti adatti includono una carbodiimide (*N*-(3-dimetilamminopropil)-*N'*-etilcarbodiimide cloridrato), un uronio, un estere attivo, un fosfonio, 2-alchil-1-alchilcarbonil-1,2-diidrochinolina (2-isobutossi-1-isobutossicarbonil-1,2-diidrochinolina), 2-alcossi-1-alcossicarbonil-1,2-diidrochinolina (2-etossi-1-etossicarbonil-1,2-diidrochinolina) o
- 10 alchilcloroformiato (isobutilcloroformiato). Preferibilmente, l'agente condensante è una carbodiimide. Più preferibilmente, *N*-(3-dimetilamminopropil)-*N'*-etilcarbodiimide cloridrato.

- 15 [0042] Il termine "gruppo uscente" si riferisce a un gruppo di frazione caricata o non caricata che può essere facilmente spostato da un nucleofilo, come un'ammina. Tali gruppi uscenti sono ben noti nella tecnica e includono, tuttavia senza limitazioni, alogenuri, esteri, alcossi, idrossile, alcossi, tosilati, triflati, mesilati, nitrili, azoturo, un imidazolo, carbammato, disolfuri, tioesteri, tioeteri (vale a dire, -S-fenile opzionalmente sostituito) e composti di diazonio. Preferibilmente, il gruppo uscente è un alogenuro, un gruppo alcossi, un gruppo arilossi, un imidazolo, -S-fenile opzionalmente sostituito con -NO₂ o Cloro, o -OCOR, in cui R è un gruppo alchile C1-C10 lineare, un gruppo alchile C1-C10 ramificato, un gruppo alchile C3-C10 ciclico o un gruppo alchenile C1-C10. In un'altra forma di realizzazione preferita, il gruppo uscente è la frazione in un estere reattivo (ad esempio, -COX) che può essere spostata. Un estere

reattivo include, tuttavia senza limitazioni, estere di N-succinimidile, N-solfosuccinimidile, N-ftalimidile, N-solfoftalimidile, 2-nitrofenile, 4-nitrofenile, 2,4-dinitrofenile, 3-solfonil-4-nitrofenile o 3-carbossi-4-nitrofenile.

[0043] L'invenzione include anche un metodo per utilizzare un estere C3 di maytansinolo per preparare un suo derivato. Il metodo comprende la reazione di un estere C3 di maytansinolo rappresentato dalla Formula (IIIa) preparato sopra con un agente riducente per formare un composto rappresentato dalla seguente formula:



[0044] Nella Formula (IVa), R_1 e R_2 sono come definiti nelle Formule (Ia) e (IIa); e Y è come definito nella Formula (IIIa).

[0045] Il termine "agente riducente" è l'elemento o composto in una reazione di riduzione-ossidazione che converte un legame disolfuro in un gruppo idrosolfuro. Esempi di agenti riducenti adatti includono ditioneitolato (DTT), (tris(2-carbossietil)fosfina) (TCEP) e NaBH_4 .

[0046] I composti di formula (IIIa), quando R_3 è -L-E, o il composto di formula (IVa) possono reagire con un anticorpo o un anticorpo modificato per formare un coniugato anticorpo-maytansinoide. Si vedano, ad esempio, brevetti U.S.m. 7,521,541, 5,208,020 e 7,811,872. In alternativa, il composto di formula (IVa) può reagire con un reticolante bifunzionale per formare un composto legante che porta un gruppo reattivo che può reagire con un anticorpo per formare un coniugato anticorpo-maytansinoide. Si vedano, ad esempio, US 6,441,163, US 2011/0003969A1 e US 2008/0145374.

[0047] "Alchile" come utilizzato nel presente contesto si riferisce a un alchile lineare, ramificato o ciclico.

[0048] "Alchile lineare o ramificato" come utilizzato nel presente contesto si riferisce a un radicale idrocarburico monovalente saturo a catena lineare o ramificata da uno a venti atomi di carbonio. Esempi di alchile includono, tuttavia senza limitazioni, metile, etile, 1-propile, 2-propile, 1-butile, 2-metil-1-propile, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 2-butile, 2-metil-2-



propile, 1-pentile, 2-pentile, 3-pentile, 2-metil-2-butile, 3-metil-2-butile, 3-metil-1-butile, 2-metil-1-butile, -CH₂CH₂CH(CH₃)₂, 1-esile, 2-esile, 3-esile, 2-metil-2-pentile, 3-metil-2-pentile, 4-metil-2-pentile, 3-metil-3-pentile, 2-metil-3-pentile, 2,3-dimetil-2-butile, 3,3-dimetil-2-butile, 1-eptile, 1-ottile e simili. Preferibilmente, l'alchile ha da uno a dieci atomi di carbonio. Più preferibilmente, l'alchile ha da uno a quattro atomi di carbonio.

5 [0049] "Alchilene" come utilizzato nel presente contesto si riferisce a un alchilene lineare, ramificato o ciclico.

[0050] "Alchilene lineare o ramificato" come utilizzato nel presente contesto si riferisce a un radicale idrocarburico bivalente saturo a catena lineare o ramificata da uno a venti atomi di carbonio. Esempi di alchile includono, tuttavia senza limitazioni, metilene, etilene, 1-propilene, 2-propilene, 1-butilene, 2-metil-1-propilene, -CH₂CH(CH₃)₂-, 2-butilene, 2-metil-2-propilene, 1-pentilene, 2-pentilene, 3-pentilene, 2-metil-2-butilene, 3-metil-2-butilene, 3-metil-1-butilene, 2-metil-1-butilene, -CH₂CH₂CH(CH₃)₂-, 1-esilene, 2-esilene, 3-esilene, 2-metil-2-pentilene, 3-metil-2-pentilene, 4-metil-2-pentilene, 3-metil-3-pentilene, 2-metil-3-pentilene, 2,3-dimetil-2-butilene, 3,3-dimetil-2-butilene, 1-eptilene, 1-ottilene e simili. Preferibilmente, l'alchilene ha da uno a dieci atomi di carbonio. Più preferibilmente, l'alchilene ha da uno a quattro atomi di carbonio.

15 [0051] "Alchenile lineare o ramificato" si riferisce a un radicale idrocarburico monovalente a catena lineare o ramificata da due a venti atomi di carbonio con almeno un sito di insaturazione, vale a dire un doppio legame carbonio-carbonio, in cui il radicale alchenilico include radicali aventi orientamenti "cis" e "trans" o, in alternativa, orientamenti "E" e "Z". Esempi includono, tuttavia senza limitazioni, etilenile o vinile (-CH=CH₂), allile (-CH₂CH=CH₂) e simili. Preferibilmente, l'alchenile ha da due a dieci atomi di carbonio. Più preferibilmente, l'alchenile ha da due a quattro atomi di carbonio.

20 [0052] "Alchile ciclico" si riferisce a un radicale di anello carbociclico saturo monovalente. Preferibilmente, l'alchile ciclico è un radicale di anello monociclico da tre a dieci elementi. Più preferibilmente, l'alchile ciclico è cicloesile.

25 [0053] "Arile" indica un radicale idrocarburico aromatico monovalente da 6-18 atomi di carbonio derivato dalla rimozione di un atomo di idrogeno da un singolo atomo di carbonio di un sistema anulare aromatico progenitore. Arile include radicali biciclici comprendenti un anello aromatico fuso a un anello saturo, parzialmente insaturo o anello aromatico carbociclico o eterociclico. Gruppi arile tipici includono, tuttavia senza limitazioni, radicali derivati da benzene



(fenile), benzeni sostituiti (ad esempio, para-nitrofenile, orto-nitrofenile e dinitrofenile), naftalene, antracene, indenile, indanile, 1,2-diidronaftalene, 1,2,3,4-tetraidronaftile e simili. Preferibilmente, l'arile è fenile opzionalmente sostituito (ad esempio fenile, fenolo o fenolo protetto).

[0054] "Eteroarile" si riferisce a un radicale aromatico monovalente di anelli a 5 o 6 elementi e include sistemi
5 anulari fusi (almeno uno dei quali è aromatico) di 5-18 atomi, contenenti almeno uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo. Esempi di gruppi eteroarile sono piridinile (ad esempio, 2-idrossipiridinile), imidazolile, imidazopiridinile, pirimidinile (ad esempio, 4-idrossipirimidinile), pirazolile, triazolile, pirazinile, tetrazolile, furile, tienile, isossazolile, tiazolile, ossazolile, isotiazolile, pirrolile, chinolinile, isochinolinile, indolile, benzimidazolile, benzofuranile, cinnolinile, indazolile, indolizinile, ftalazinile, piridazinile, triazinile, isoindolile, pteridinile, purinile,
10 ossadiazolile, triazolile, tiadiazolile, furazanile, benzofurazanile, benzotiofenile, benzotiazolile, benzossazolile, chinazolinile, chinossalinile, naftiridinile e furopiridinile.

[0055] Sostituenti adatti per un gruppo alchile sono quelli che non interferiscono significativamente con le reazioni descritte. I sostituenti che interferiscono con le reazioni descritte possono essere protetti secondo metodi ben noti a un esperto della tecnica con competenza ordinaria, ad esempio, in TW Greene e P. G. M. Wuts "Protective Groups in
15 Organic Synthesis" John Wiley & Sons, Inc., New York 1999. Sostituenti esemplificativi includono arile (ad esempio, fenile, fenolo e fenolo protetto), eteroarile (ad esempio, indolile e imidazolile) alogeno, guanidinio $[-NH(C=NH)NH_2]$, $-OR^{100}$, $NR^{101}R^{102}$, $-NO_2$, $-NR^{101}COR^{102}$, $-SR^{100}$, un solfossido rappresentato da $-SOR^{101}$, un solfone rappresentato da $-SO_2R^{101}$, un solfato $-SO_3R^{100}$, un solfonato $-OSO_3R^{100}$, una solfonammide rappresentata da $-SO_2NR^{101}R^{102}$, ciano, un azido, $-COR^{101}$, $-OCOR^{101}$, $-CONR^{101}R^{102}$, R^{101} e R^{102} sono ciascuno indipendentemente scelti tra H, alchile, alchenile
20 o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio.

[0056] Il termine "alogenuro" si riferisce a -F, -Cl, -Br o -I.

[0057] Il termine "amminoacido" si riferisce agli amminoacidi presenti in natura o agli amminoacidi non presenti in natura rappresentati da $NH_2-C(R^{aa}R^{aa'})-C(-O)OH$, in cui R^{aa} e $R^{aa'}$ sono ciascuno indipendentemente H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, arile,
25 eteroarile o eterociclice. Il termine "amminoacido" si riferisce anche al corrispondente residuo quando un atomo di



idrogeno viene rimosso dall'ammina e/o dall'estremità carbossilica dell'amminoacido, come $\text{-NH-C(R}^{aa}\text{R}^{aa}\text{)-C(-O)O-}$. Gli esempi specifici di seguito devono essere considerati meramente illustrativi, e non limitativi della parte restante della descrizione in qualsiasi modo. Senza ulteriore elaborazione, si ritiene che un esperto della tecnica possa, sulla base della descrizione nel presente contesto, utilizzare la presente invenzione nella sua massima misura. Qualsiasi meccanismo proposto di seguito non limita in alcun modo l'ambito dell'invenzione rivendicata.

ESEMPLIFICAZIONE

[0058] L'Esempio 8 è un metodo dell'invenzione. Gli Esempi da 1 a 7, 9 e 10 sono metodi presentati non come forme di realizzazione dell'invenzione ma come metodi che sono utili per comprendere l'invenzione.

Materiali e metodi

10 [0059] I parametri di processo forniti di seguito possono essere adottati e adattati dagli esperti della tecnica per soddisfare le loro esigenze specifiche.

[0060] Tutte le reazioni sono state effettuate in un'atmosfera di argon con agitazione magnetica. Tetraidrofurano e dimetilformammide sono stati acquistati come solventi anidri da Aldrich. Maytansinolo è stato prodotto come descritto [Widdison et al., J. Med. Chem., 49:4392-4408 (2006)]. La N-carbossianidride di N-metil-alanina, (4S)-3,4-dimetil-2, 5-ossazolidindione è stata preparata come descritto [Akssira, M. et al., J. Marocain de Chimie Heterocyclique, 1: 44-47 (2002)]. Gli spettri di risonanza magnetica nucleare (NMR) (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz) sono stati ottenuti su un macchinario per NMR Bruker serie ADVANCE™. I dati HPLC/MS sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro di massa a trappola ionica Bruker ESQUIRE™ 3000 in linea con HPLC Agilent serie 1100. Il metodo HPLC 1 è stato utilizzato per analizzare DM1. Il metodo HPLC 2 è stato utilizzato per tutte le altre analisi.

20 Metodo analitico HPLC 1:

[0061]

Sistema HPLC Water con rivelatore UV o equivalente

Colonna: YMC-Pack ODS-AQ 250x4,6 mm; 5 μm (nr. pezzo = AQ12S05-2546WT)

Flusso: 1 mL/min (Gradiente)

25 Fase mobile: A = 1 ml di H_3PO_4 all'85% in 1 litro d'acqua; B = acetonitrile/Tetraidrofurano 30:70 (v/v) (Nota: è



stato utilizzato TFA allo 0,1% invece di H3PO4 nella fase mobile A nell'analisi LC/MS

Tabella gradiente:

	Tempo, minuti	Flusso	%A	%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

Tempo di ciclo: 60 minuti + tempo successivo: 10 minuti

Rilevamento UV: 252 nm

5 Volume di iniezione = 5 μ L di circa 1 mg/ml di DM1 in acetonitrile

Temperatura della colonna = 15 °C (salvo diversamente indicato)

Temperatura del campione = 2-8 °C

Metodo analitico HPLC/MS 2:

[0062]

10 Colonna: 150 x 4,6 mm C8, granulometria 5 micron, Zorbax P/N 993967-906

Solventi: A Acqua deionizzata + TFA allo 0,1%

Solvente B: Acetonitrile

Portata 1,0 mL/min Temperatura: Ambiente

Volume di iniezione: 15 μ L

15 Gradiente

Tempo	%B
0	25



Tempo	%B
25	50
26	95
30	95
31	25
37	25

[0063] I dati sono stati visualizzati da 0-25 minuti nei tracciati HPLC.

Preparazione del campione per il metodo analitico HPLC 2:

5 [0064] Aliquote (20 μ L) di una data miscela sono state addizionate ad acetonitrile (1,5 mL) in un fiala di autocampionatore. La fiala è stata tappata e agitata, poi posta in un autocampionatore a 15 °C. Un volume di iniezione (15 μ l) è stato analizzato per ogni ciclo di HPLC.

Esempio 1. Preparazione di DM1-SMe con setacci molecolari 4A aggiunti come agente di essiccamento

10 [0065] Maytansinolo (50,1 mg, 0,0888 mmol), (4S) -3,4-dimetil-2, 5-ossazolidindione (30,2 mg, 0,233 mmol, 2,6 eq), triflato di zinco (133 mg, 0,366 mol) e setacci molecolari 4A (0,50 g) pre-essiccati a 250 °C sottovuoto poi raffreddati a temperatura ambiente sono stati addizionati in una beuta da 10 ml. I contenuti sono stati prelevati in dimetilformammide anidra (0,75 mL) a cui è stata addizionata diisopropiletilammina (62 μ L, 0,357 mmol). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 24 ore. Un campione della miscela grezza è stato analizzato mediante HPLC, il prodotto N²-deacetil-maytansina costituiva l'80% dell'area HPLC totale. La miscela di reazione è stata diluita con 1:1 NaHCO₃ saturo:NaCl saturo (1,2 mL) ed etilacetato (3 mL) miscelata poi filtrata con celite, successivamente lavata con
 15 tampone di fosfato di potassio (1 mL, 400 mM, pH 7,5). Lo strato organico è stato essiccato con solfato di magnesio anidro, filtrato poi fatto evaporare per formare un solido giallo. Al solido sono stati addizionati acido 3-metilditiopropanoico (25 mg, 0,16 mmol), N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide cloridrato (30 mg, 0,16



mmol) e diclorometano (3 mL). Dopo agitazione per 2 ore, la miscela è stata diluita con etilacetato (8 mL), lavata con tampone fosfato di potassio pH 6,5, 1,0 M (2 mL) e la soluzione acquosa è stata estratta con etilacetato (2 x 8 mL). Gli strati organici sono stati combinati, essiccati su solfato di magnesio anidro, concentrati e purificati mediante cromatografia su silice 95:5 diclorometano:metanolo a dare 51 mg (70%) di DM1-SMe.

5 Esempio 2. Aumento 10X dell'esempio 1

[0066] La reazione nell'Esempio 1 è stata eseguita su una scala 10 volte maggiore dando 490 mg (68%) di DM1-SMe.

Esempio 3. Preparazione di DM1-SMe senza agente di essiccamento aggiunto

10 [0067] Maytansinolo (1,0 g, 1,77 mmol) è stato disciolto in dimetilformammide anidra (15 mL) in una beuta da 25 mL che è stata raffreddata in un bagno di ghiaccio/acqua. Dopo 2 minuti, diisopropiletilammmina (DIPEA, 0,92 g, 7,07 mmol) e triflato di zinco (3,8 g, 10,6 mmol) sono stati addizionati con agitazione magnetica, poi (4S)-3,4-dimetil-2, 5-ossazolidindione (0,913 g, 7,07 mmol) è stato rapidamente addizionato e la miscela è stata agitata per 24 ore. Un campione della miscela grezza è stato analizzato mediante HPLC, il prodotto N²-deacetil-maytansina costituiva il 65% dell'area HPLC totale. La miscela di reazione è stata diluita con 1:1 NaHCO₃ saturo:NaCl saturo (25 mL) ed etilacetato (40 mL)

15 miscelata poi filtrata con celite, e lavata con NaCl saturo. Lo strato organico è stato essiccato con solfato di sodio anidro, filtrato poi fatto evaporare. Il residuo è stato prelevato in diclorometano (30 mL) a cui sono stati rapidamente addizionati

20 acido 3-metilditiopropanico (1,1 g, 7,0 mmol) e N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide cloridrato (1,34 g, 7,0 mmol) e la reazione è stata agitata in argon a temperatura ambiente per 2 ore. La miscela è stata diluita con etilacetato (30 mL), lavata con tampone di fosfato di potassio 1,0 M (30 mL), pH 6,5 e la soluzione acquosa è stata estratta con etilacetato (2 x 40 mL). Gli strati organici sono stati combinati, essiccati su solfato di sodio anidro, concentrati e purificati mediante cromatografia su silice 95:5 diclorometano:metanolo a dare 698 mg (50%) di DM1-SMe.

Esempio 4. Ripetizione dell'esempio 3

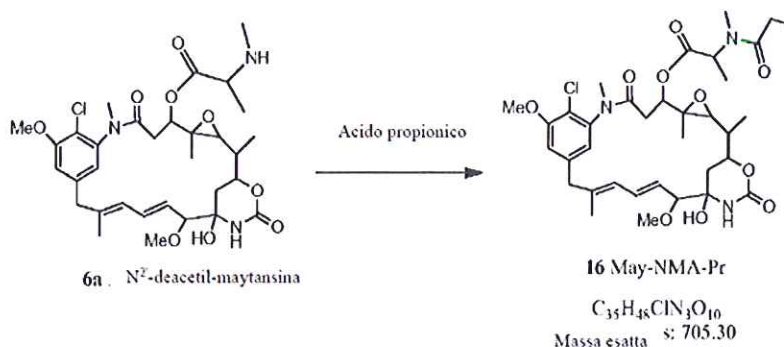
[0068] La reazione nell'Esempio 3 è stata ripetuta sulla stessa scala dando 735 mg (53%) di DM1-SMe.

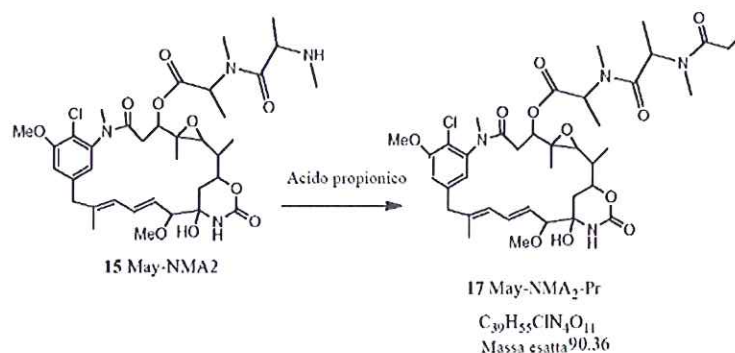
Esempio 5. Soluzione madre di N²-deacetil-maytansina grezza

25 [0069] Maytansinolo (0,5 g, 0,89 mmol) è stato disciolto in dimetilformammide anidra (7 mL) in una beuta da

25 mL che è stata raffreddata in un bagno di ghiaccio/acqua. Dopo 2 minuti diisopropilettilammina (0,5 g, 3,5 mmol) e triflato di zinco (1,9 g, 5,3 mmol) sono stati addizionati con agitazione magnetica, poi (4S)-3,4-dimetil-2, 5-ossazolidindione (4,52 g, 3,5 mmol) è stato rapidamente addizionato e la miscela è stata agitata per 24 ore. Aliquote (0,5 mL ciascuna) di questa soluzione madre sono state utilizzate nei seguenti esperimenti, pertanto ciascuna aliquota è stata generata da approssimativamente 0,13 mmol di maytansinolo.

5 Esempio 6. Estrazione di N²-deacetil-maytansina seguita da accoppiamento con acido propionico (Controllo) [0070]





[0073] Il rapporto tra le aree percentuali HPLC per 17:16 era 3,0:71,7. MS di 16 (M+ H+) 706 (M + Na⁺) 728; MS di 17 (M+ Na⁺) 813.

Esempio 7. L'esperimento dell'Esempio 6 è stato ripetuto:

5 [0074] Il rapporto tra le aree percentuali HPLC per 17:16 era 3,0:70,9.

Esempio 8. Estrazione di N²-deacetil-maytansina seguita da un pre-spegnimento con metanolo successivamente dall'accoppiamento ad acido propionico (Pre-spegnimento per distruggere 5a in eccesso)

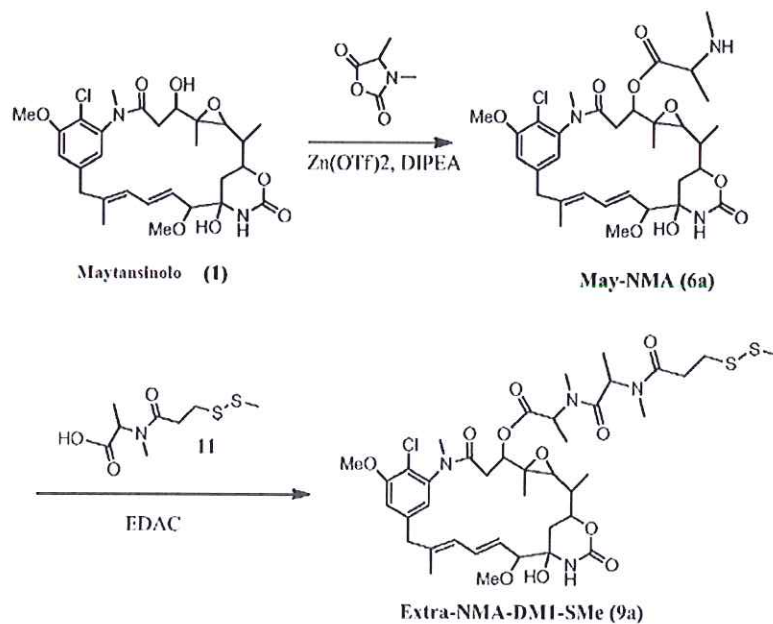
[0075] La soluzione madre di N²-deacetil-maytansina (0,50 mL) è stata addizionata a una fiala dalla capacità di 6 mL a cui è stato addizionato metanolo (75 μL, 1,8 mmol) e la fiala è stata tappata e i contenuti sono stati agitati magneticamente per 1 ora. Sono stati poi addizionati etilacetato (1,5 mL) e 1:1 NaCl saturo:NaHCO₃ (0,75 mL) e la fiala è stata tappata e miscelata. Lo strato organico è stato conservato ed essiccato su Na₂SO₄ anidro (120 mg). Lo strato organico (1,0 mL) è stato prelevato ed è stato addizionato acido propionico (20,0 μL, 0,27 mmol). La soluzione è stata poi trasferita in una fiala contenente N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide cloridrato (40 mg, 0,209 mmol). La reazione è stata lasciata progredire per 2,5 ore dopo di che è stata analizzata mediante HPLC. Il picco di HPLC per 17 era appena rilevabile, l'integrazione non è stata possibile. Questa reazione è stata ripetuta e nuovamente 17 era appena rilevabile, l'integrazione non è stata possibile. Pertanto, il metodo di pre-spegnimento produce meno composti indesiderabili 15 e 17.

10

15

Esempio 9. Sintesi di extra-NMA-DMI-SMe (9a)

[0076]



[0077] Maytansinolo (1,2 mg, 2,1 mmol) è stato pesato in una beuta da 50 mL e disciolto in una miscela di dimetilformammide (12 mL) e tetraidrofurano (6 mL). La beuta è stata raffreddata in un bagno di ghiaccio/acqua. Dopo 5 minuti diisopropiletilammina (1,5 mL, 8,5 mmol), zinco trifluorometansolfonato (4,5 g, 12,6 mmol) e 2,5-ossazolidindione, 3,4-dimetil (4S) (1,1 g, 8,5 mmol) sono stati addizionati sequenzialmente. Dopo agitazione per 17 ore la reazione è stata estratta con 1:1 NaCl acquoso saturo:NaHCO₃ acquoso saturo (14 mL) ed Etileacetato (100 mL). Lo strato organico è stato conservato ed essiccato su Na₂SO₄ anidro. L'agente di essiccamento è stato rimosso e approssimativamente 2/3 del solvente sono stati rimossi mediante evaporazione rotante sottovuoto. Poi è stata addizionata N-metil-N-[(2-metilditio)-1-ossopropil]-L-alanina (1,0 g, 4,2 mmol) seguita da N-(3-dimetilamminopropil)-N-etilcarbodiimmide cloridrato (0,889 g, 4,6 mmol). Metilene cloruro (10 mL) è stato addizionato per disciogliere la miscela.



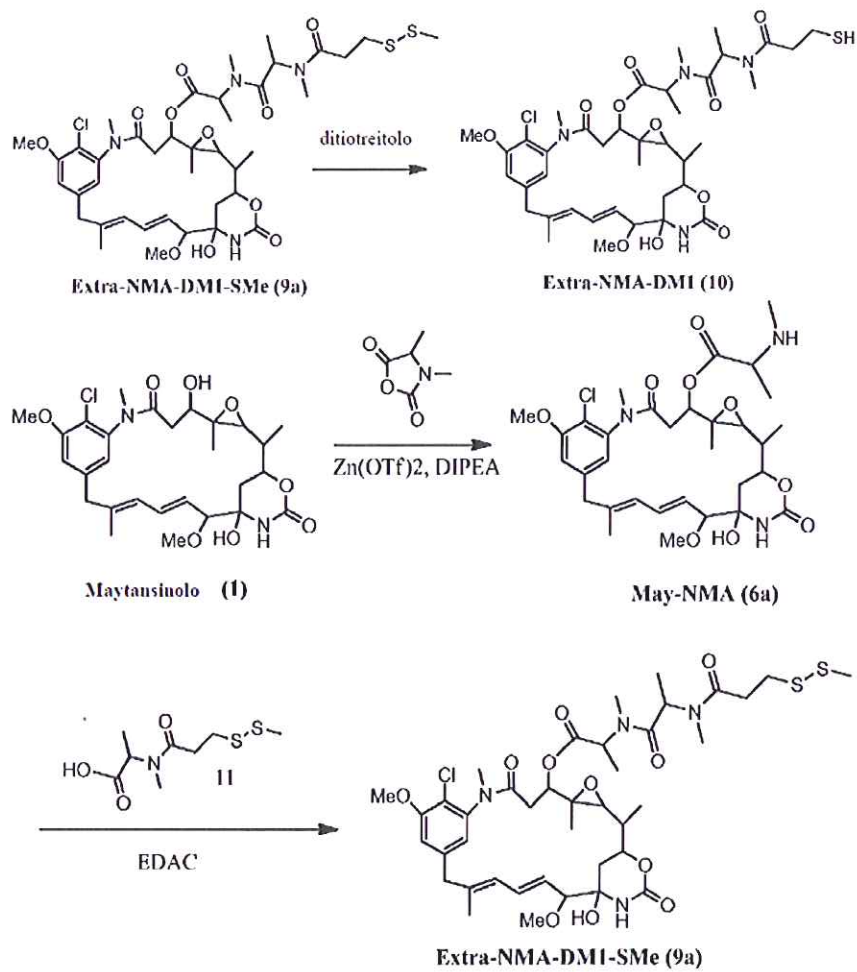
Dopo 4 ore la reazione è stata estratta con metilene cloruro (70 mL) e 1:4 NaCl acquoso saturo:NaHCO₃ acquoso saturo (20 mL). Lo strato organico è stato conservato ed essiccato su Na₂SO₄ anidro. Il solvente è stato rimosso mediante evaporazione rotante sottovuoto. L'olio denso risultante è stato disciolto in acetonitrile (3 mL) e approssimativamente ½ del materiale è stata purificata mediante HPLC su una colonna waters symmetry shield C8 (19 x 150 mm micron, granulometria di 5 micron). La colonna è stata eluita con acqua deionizzata contenente acido formico allo 0,2% con un gradiente di acetonitrile (acetonitrile al 30%-60% per 18 minuti). La colonna è stata sciacquata con acetonitrile al 95% per 5 minuti e poi riequilibrata con acetonitrile al 30% per 6 minuti tra i cicli. I volumi di iniezione variavano tra 100 e 800 µL. Maytansinolo non reagito ha eluito a 8,5 minuti, un isomero indesiderato di Extra-NMA-DM1-SMe ha eluito a 13,8 minuti e l'isomero desiderato di Extra-NMA-DM1-SMe ha eluito a 15,1 minuti. Le frazioni del prodotto desiderato da svariati cicli sono state combinate e il solvente è stato rimosso mediante evaporazione rotante sottovuoto. Il residuo è stato prelevato in un volume minimo di etilacetato e un'impurità secondaria è stata rimossa mediante HPLC su una colonna di ciano Kromasil (250 mm x 21 mm, granulometria di 10 micron). La colonna è stata ciclata con una fase mobile isocratica di 67:9:24 esani:2-propanolo:etilacetato a 21 mL/min. Il prodotto desiderato ha eluito a 22,6 minuti mentre l'impurità ha eluito a 12,6 minuti. Le frazioni del prodotto provenienti da svariati cicli sono state combinate e il solvente è stato rimosso mediante evaporazione rotante sottovuoto a fornire 95 mg di prodotto (resa del 10%).

¹H NMR (400 MHz, 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 NMR (CDCl₃, 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. per C₄₀H₅₇ClN₄O₁₁S₂ (M + Na⁺) m/z = 891,3052; scoperto 891,3049

Esempio 10. Sintesi di extra-NMA-DM1 (10)

[0078]

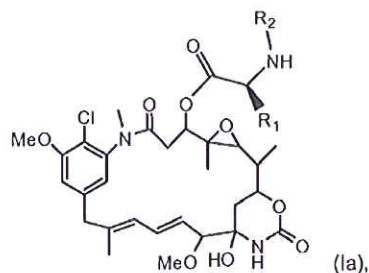




[0079] N²-Deacetyl-N²-(3-metilditio-1-ossopropil-N-metil-L-alanil)-maytansina (95 mg, 0,109 mmol) è stata disciolta in 2:1 dimetossietano: tampone di fosfato di potassio 100 mM pH 7,5 a cui è stato addizionato ditiotreitolo (110 mg, mmol). Dopo 2 ore la soluzione è stata estratta con una miscela di etilacetato:metilene cloruro= 2: 1 (5 mL) e NaCl acquoso saturo (1 mL). Lo strato organico è stato conservato ed essiccato su Na₂SO₄ anidro. L'agente di essiccamento è stato rimosso mediante filtrazione a vuoto e il solvente è stato rimosso mediante evaporazione rotante sottovuoto. Il residuo è stato prelevato in un volume minimo di 1:1 etilacetato:metilene cloruro e purificato mediante HPLC su una colonna di ciano Kromasil (250 mm x 21 mm, granulometria di 10 micron). La colonna è stata ciclata con una fase mobile isocratica di 64:19:17 esani:2-propanolo:etilacetato a 21 mL/min. Il prodotto desiderato ha eluito a 16 minuti. Le frazioni provenienti da svariati cicli sono state combinate e il solvente è stato rimosso mediante evaporazione rotante sottovuoto a fornire 62 mg di prodotto (resa del 69%). ¹H NMR (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 NMR (CDCl₃, 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. per C₃₉H₅₅ClN₄O₁₁S (M + Na⁺) m/z = 845,3174; scoperto 845,3166.

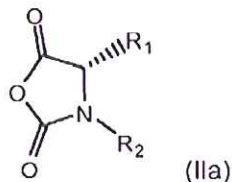
RIVENDICAZIONI

1. Metodo per preparare un composto rappresentato dalla seguente formula:



in cui R_1 è metile; e R_2 è metile, il metodo comprendendo:

5 a) far reagire maytansinolo con una *N*-carbossianidride in una miscela di reazione comprendente inoltre una base e un acido di Lewis scelto dal gruppo costituito da triflato di zinco, cloruro di zinco, bromuro di magnesio, triflato di magnesio, triflato di rame, bromuro di rame (II), cloruro di rame (II) e cloruro di magnesio, in cui la *N*-carbossianidride è rappresentata dalla seguente formula:



10 formando così il composto di Formula (Ia);

b) far reagire *N*-carbossianidride non reagita dalla miscela di reazione nella fase a) con un reagente nucleofilo, che è un alcol scelto tra metanolo, etanolo, n-propanolo, isopropanolo e terz-butanolo.

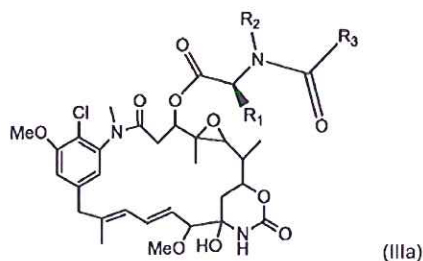
2. Il metodo della rivendicazione 1, in cui la miscela di reazione nella fase a) comprende inoltre un agente di essiccamento.

15 3. Il metodo della rivendicazione 1 o rivendicazione 2, in cui il reagente nucleofilo è metanolo.

4. Il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui il metodo comprende inoltre mettere a contatto la

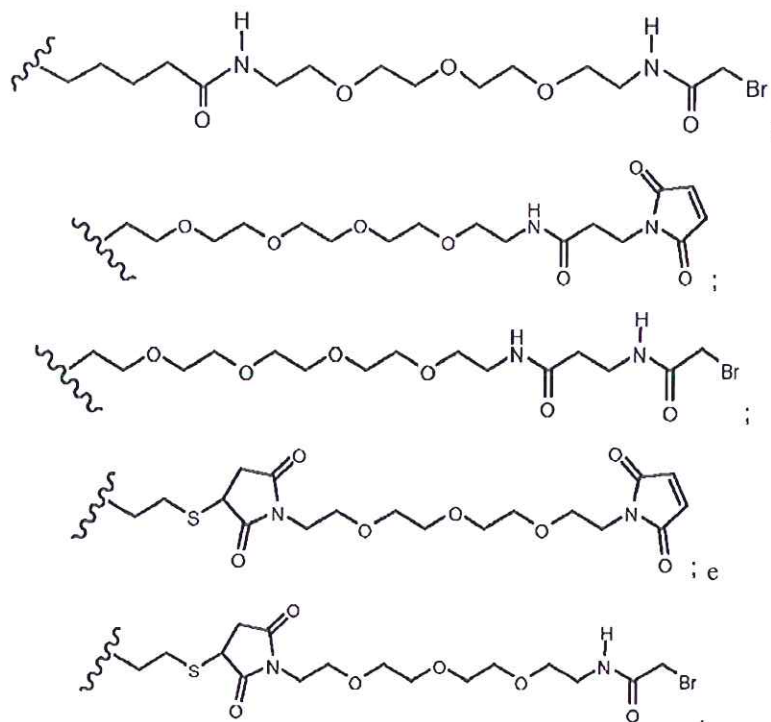
miscela di reazione dopo la fase b) con una soluzione acquosa contenente bicarbonato o carbonato o mettere a contatto la miscela di reazione con un decontaminante di metalli.

5. Il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, in cui l'acido di Lewis è triflato di zinco.
6. Il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, comprendente inoltre la fase di far reagire il composto di formula (Ia) con un acido carbossilico avente la formula R_3COOH in presenza di un agente condensante o con un acido carbossilico attivato avente la formula R_3COX , per formare un composto rappresentato dalla seguente formula:



in cui R_3 è un gruppo alchile o un gruppo alchile sostituito e X è un gruppo uscente.

7. Il metodo della rivendicazione 6, in cui:
- 10 i) X è un alogenuro, un gruppo alcossi, un gruppo arilossi, un imidazolo, -S-fenile opzionalmente sostituito con nitro o cloruro, o -OCOR, in cui R è un gruppo alchile C1-C10 lineare, un gruppo alchile C1-C10 ramificato, un gruppo alchile C3-C10 ciclico o un gruppo alchenile C1-C10;
- ii) -COX è un estere reattivo;
- iii) R_3 è -Y-S-SR₄, in cui Y è alchilene C1-C10 e R₄ è alchile, arile o eteroarile C1-C10;
- 15 iv) R_3 è -Y-S-SR₄, in cui Y è -CH₂CH₂- o -CH₂CH₂C(CH₃)₂- e R₄ è -CH₃;
- v) R_3 è -L-E;

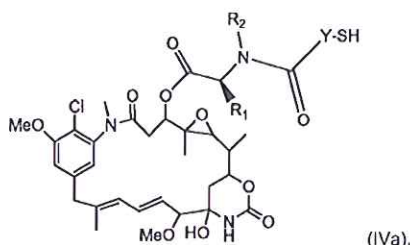


5

8. Il metodo della rivendicazione 7, in cui R_3 è $-Y-S-SR_4$, in cui Y è $-CH_2CH_2-$ o $-CH_2CH_2C(CH_3)_2-$; R_4 è $-CH_3$; e $-COX$ è un estere reattivo scelto dal gruppo costituito da estere di N-succinimidile, N-solfosuccinimidile, N-ftalimidile, N-solfoftalimidile, 2-nitrofenile, 4-nitrofenile, 2,4-dinitrofenile, 3-solfonil-4-nitrofenile e 3-carbossi-4-nitrofenile.

9. Il metodo della rivendicazione 7 o rivendicazione 8, in cui quando R_3 è $-Y-S-SR_4$, il metodo comprende inoltre far reagire il composto di formula (III) con un agente riducente per formare un composto rappresentato dalla seguente formula:

10



10. Il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 6-7 e 9, in cui:
- i) l'agente condensante è una carbodiimide, un uronio, un estere attivo, un fosfonio, 2-alchil-1-alchilcarbonil-1,2-diidrochinolina, 2-alcossi-1-alcossicarbonil-1,2-diidrochinolina, o alchilcloroformiato;
 - 5 ii) l'agente condensante è una carbodiimide; o *N*-(3-dimetilamminopropil)-*N'*-etilcarbodiimide cloridrato.
11. Il metodo della rivendicazione 10, in cui l'agente condensante è *N*-(3-dimetilamminopropil)-*N'*-etilcarbodiimide cloridrato.
12. Il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-11, in cui la base è i) una trialchilamina, un alcossido di metallo, un alchilmetallo, un arilmetallo, un idruro di metallo, un'ammide di metallo o un'ammide a base di silicio; ii) una
- 10 trialchilamina; o iii) diisopropilettilammina.
13. Il metodo della rivendicazione 12, in cui la base è diisopropilettilammina.
14. Il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 2-13, in cui l'agente di essiccamento è i) un setaccio molecolare, solfato di sodio, solfato di calcio, cloruro di calcio o solfato di magnesio; o ii) un setaccio molecolare; e/o è sotto forma di biglie o polveri granulari.
- 15 15. Il metodo della rivendicazione 14, in cui l'agente di essiccamento è solfato di sodio.

Il sottoscritto dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale.

20

D.ssa Federica TRUPIANO (USBM-CPI-026 BM)



TAVOLA I

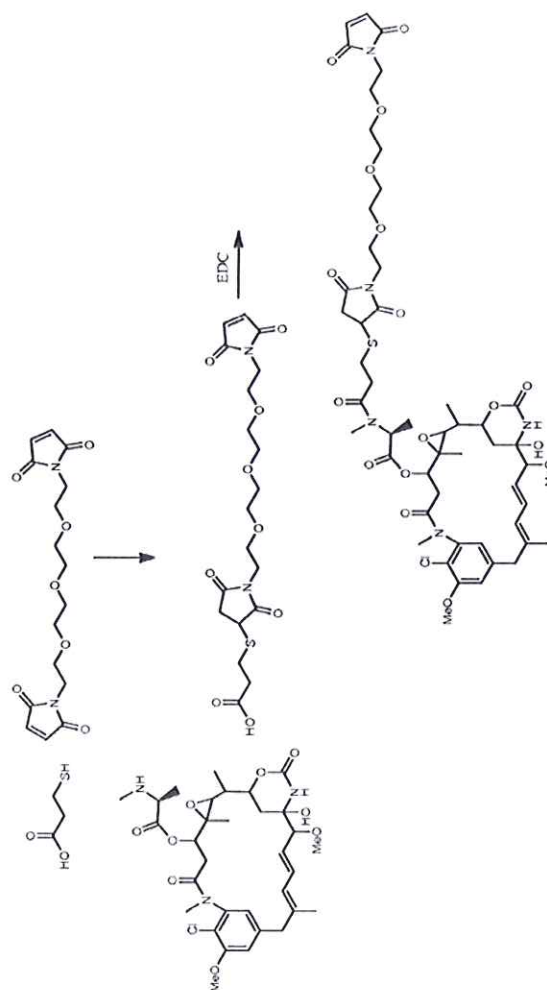


Figura 1



TAVOLA II

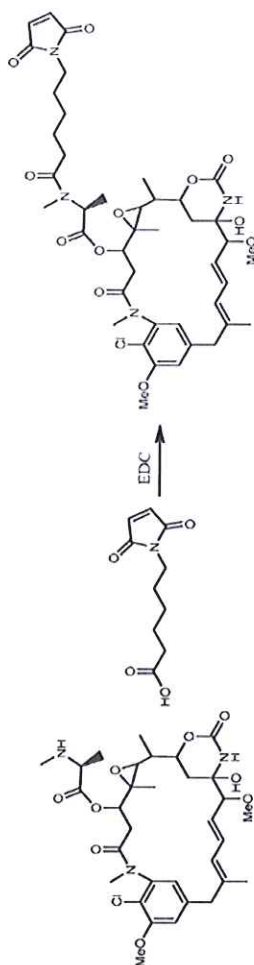


Figura 2



TAVOLA III

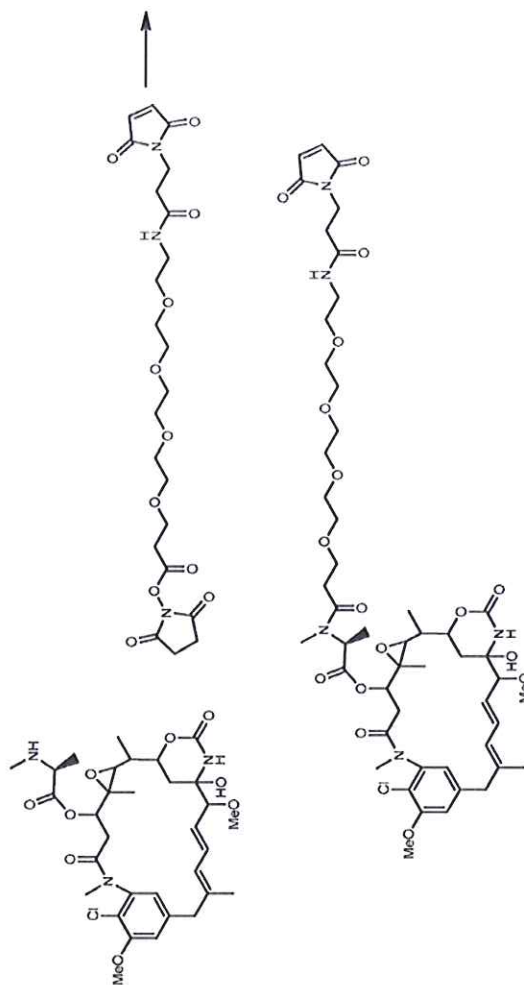


Figura 3



TAVOLA IV

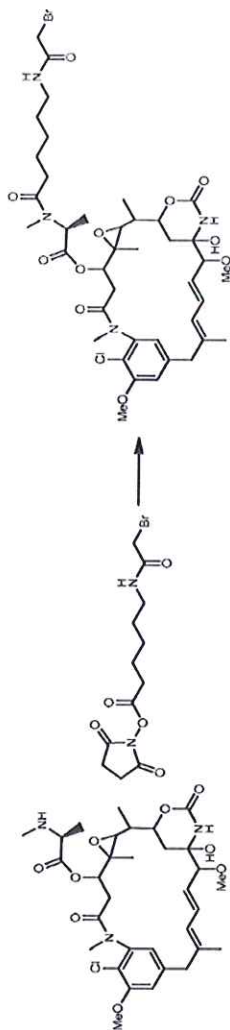


Figura 4