República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015006505-8 B1

(22) Data do Depósito: 26/09/2013

(45) Data de Concessão: 15/03/2022

(54) Título: MÉTODOS DE PREPARO DE INTERMEDIÁRIOS NA SÍNTESE DE MAITANSINOIDES

(51) Int.Cl.: C07D 498/18; C07D 498/16; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 26/09/2012 US 61/705,731.

(73) Titular(es): IMMUNOGEN, INC..

(72) Inventor(es): WAYNE C. WIDDISON; ROBERT YONGXIN ZHAO.

(86) Pedido PCT: PCT US2013061839 de 26/09/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/052537 de 03/04/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/03/2015

(57) Resumo: MÉTODOS APRIMORADOS PARA ACILAÇÃO DE MAITANSINOL. A presente invenção refere-se a um método de preparo de éster de aminoácido de maitansinol representado pela seguinte fórmula através da reação de maitansinol com um N-carboxianidrido de um aminoácido (NCA) na presença de um agente secante. É descrito também um método aprimorado para preparar um éster de aminoácido de maitansinol em que um nucleófilo é acrescentado à mistura de reação após a conclusão da reação entre maitansinol e um N-carcoxianidrido de um aminoácido.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS DE PREPARO DE INTERMEDIÁRIOS NA SÍNTESE DE MAITANSINOIDES"**.

REFERÊNCIA AO PEDIDO RELACIONADO

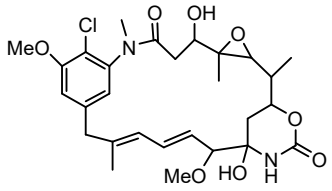
[001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade da data de depósito, sob 35 U.S.C. § 119(e), do pedido de patente provisório n° US 61/705.731, depositado a 26 de Setembro de 2012, cujo conteúdo encontra-se aqui incorporado em sua totalidade para referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

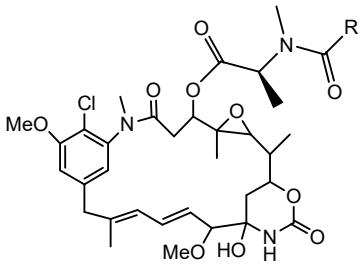
[002] A presente invenção é um processo aprimorado para preparar intermediárias na síntese de maitansinoides e anticorpos conjugados destes.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] Maitansinoides são compostos altamente citotóxicos, incluindo maitansinol e ésteres C-3 de maitansinol (Patente US n° 4.151.042), como mostrado abaixo:



1 Maitansinol

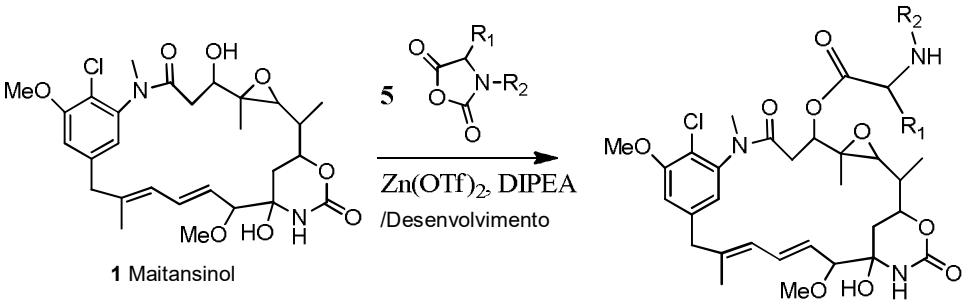


cadeia lateral de *N*-metil-L-lanina
2 Maitansina R = CH_3
3 DM1 R = CH_2CH_2SH
4 DM4 R = $CH_2CH_2C(CH_3)_2SH$

[004] Os ésteres C-3 de ocorrência natural e sintéticos podem ser classificados em dois grupos: (a) Maitansina (**2**) e seus análogos (por exemplo, DM1 e DM4), que são ésteres C-3 com N-metil-L-alanina ou derivados de N-metil-L-alanina (Patente US n°s. 4.137.230; 4.260.608; 5.208.020; e *Chem. Pharm. Bull.* 12:3441 (1984)); (b) Ansamitocinas, que são ésteres C-3 com ácidos carboxílicos simples (Patentes US n° 4.248.870; 4.265.814; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.317.821;

4.322.348; e 4.331.598).

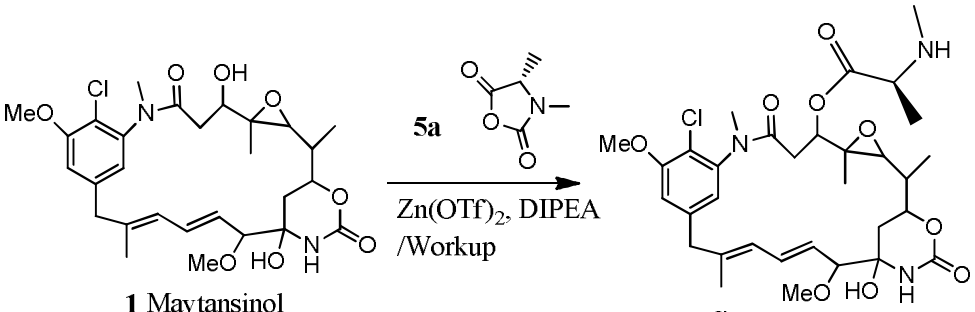
[005] Maitansina (**2**), seus análogos e cada uma das espécies de ansamitocina são ésteres C3 de maitansinol que podem ser preparados pela esterificação de maitansinol (**1**). As Patentes US n° 7.301.019 e 7.598.375 descrevem métodos de acilar o maitansinol (**1**), com um N-carboxianidrido de um aminoácido (NCA, **5**), na presença de uma base para formar um éster de aminoácido de maitansinol (May-AA, **6**) como mostrado abaixo:



1 Maitansinol

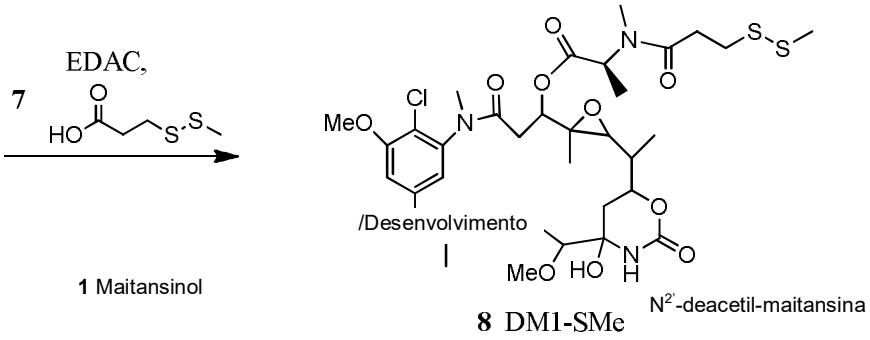
6 May-AA

[006] Ésteres de aminoácidos de maitansinol são valorosos intermediários que podem ser acoplados a ácidos carboxílicos para render maitansinoides. Por exemplo, a reação do maitansinol com (4S)-3,4-dimetil-2, 5-oxazolidinediona (**5a**) forma N2'-deacetil-maitansina (**6a**), que, por sua vez, pode ser acoplado a ácido 3-(metilditio)propiônico (**7**), usando cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodi-imida (EDAC) para formar DM1-SMe (**8**) conforme mostrado abaixo:

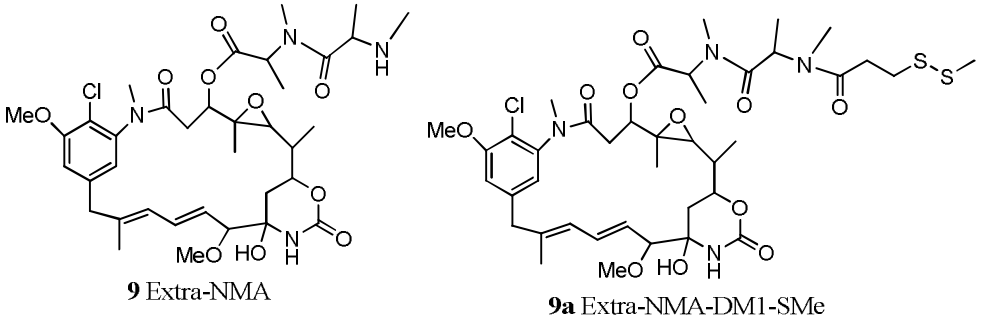


1 Maytansinol

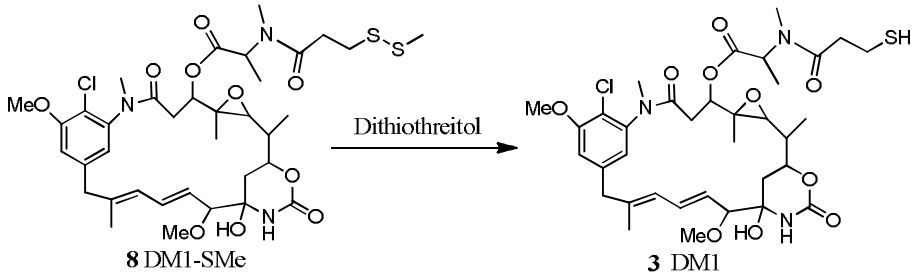
6a $N^{2'}$-deacetyl maytansine

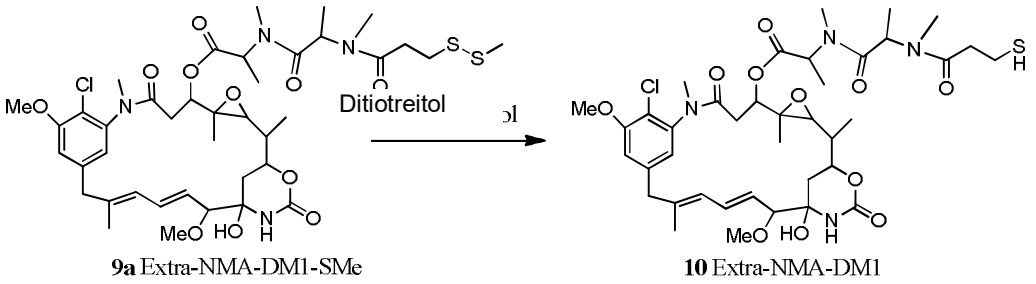


[007] Uma significativa desvantagem da reação de acilação que forma ésteres de aminoácidos de maitansinol é que produz-se igualmente um produto colateral compreendendo uma molécula extra de N-metil-alanila na cadeia lateral C3, referido como "NMA-extra" (**9**). Quando se acila N2'-deacetil-matansina, acila-se igualmente NMA-extra (**9**) para formar NMA-DM1-SMe (**9a**). As estruturas de NMA-extra (**9**) e NMA-DM1-SMe-extra (**9a**) são mostradas abaixo:



[008] DM1 (**3**) pode ser preparado de DM1-SMe (**8**) por redução, que também converte qualquer NMA-DM1-SMe-extra (**9a**) em NMA-DM1-extra (**10**) como mostrado abaixo:





9a Extra-NMA-DM1-SMe **10** Extra-NMA-DM1

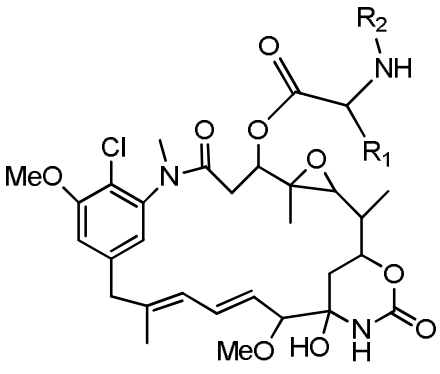
[009] NMA-DM1 extra (**10**) é difícil de remover de DM1 (**3**) porque ambos os compostos têm polaridades similares e dão picos sobrepostos no traço HPLC do DM1 (**3**) purificado. DM1 (**3**) e DM4 (**4**) são usados na preparação de anticorpos conjugados, diversos dos quais encontram-se atualmente sob testagem.

[0010] Portanto, há uma necessidade de aprimorar a produção e a robusteza dos processos para preparo de tais maitansinoides e minimizar produtor colaterais formados durante reações usadas em sua preparação.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0011] Descobriu-se agora que a adição de um agente secante à reação entre maitansinol e um N-carboxianidrido de um aminoácido aprimora substancialmente a produção de um éster de aminoácido de maitansinol, conforme evidenciado nos Exemplo 1-4. Descobriu-se igualmente que o acréscimo de uma etapa de pré-esgotamento com um nucleofílico após a reação de maitansinol e N-carboxianidrido de um aminoácido reduz substancialmente a formação de produtos colaterais indesejáveis, como NMA extra, conforme evidenciado nos Exemplos 6-8. Com base nestas descobertas, métodos aprimorados de preparo de ésteres de aminoácido de maitansinol são descritos neste documento.

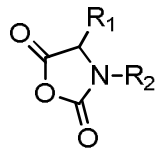
[0012] Uma primeira modalidade da invenção é um método de preparar um éster de aminoácido de maitansinol representado pela Fórmula (**I**):



(I),

[0013] em que R_1 é hidrogênio, um grupo alquila C1-C10 opcionalmente substituído ou uma corrente lateral de aminoácido, contanto que, se a corrente lateral do aminoácido tiver um grupo funcional, o grupo funcional seja protegido opcionalmente; e R_2 é hidrogênio ou um grupo alquila C1-C10 opcionalmente substituído.

[0014] O método compreende reagir maitansinol com um N-carboxianidrido em uma mistura de reação que compreenda, adicionalmente, uma base e um agente secante. O N-carboxianidrido é representado pela seguinte Fórmula:



(II).

[0015] Todas as variáveis na Fórmula (II) são conforme definidas na Fórmula (I).

[0016] Uma segunda modalidade da invenção é um método de preparar um éster de aminoácido de maitaninol representado pela Fórmula (I), compreendendo: a) reagir matansinol com um N-carboxianidrido representado pela Fórmula (II) em uma mistura de reação que compreenda adicionalmente uma base; e b) reagir N-carboxianidrido não reagido da etapa a) com um reagente nucleofílico. Todas as variáveis nas Fórmulas (I) e (II) são conforme definidas na primeira modalidade da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

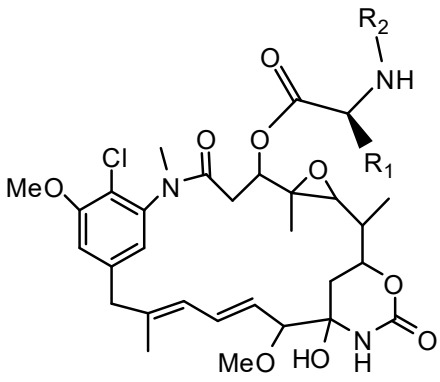
[0017] As figuras 1-2 são esquemas mostrando a acilação de N2'-

deacetil-maitansina com um ácido carboxílico e um agente condensador.

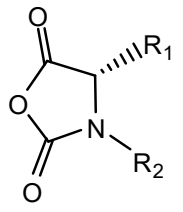
[0018] As figuras 3-4 são esquemas mostrando a acilação de N2'-deacetil-maitansina com um ácido carboxílico ativado.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0019] A presente invenção é direcionada a métodos para preparar um éster de aminoácido representando pela Fórmula (I) de maitansinol e do N-carboxianidrido representados pela Fórmula (II). O éster de aminoácido pode ser ainda mais esterificado para preparar maitansinoides como DM1 e DM4 e elaborados ainda mais até tornarem-se anticorpos conjugados de maitansinoides. Preferivelmente, o éster de aminoácido é representado pela Fórmula (Ia) e o N-carboxianidrido é representado pela Fórmula (IIa):



(Ia); e



(IIa).

[0020] As variáveis nas Fórmulas (Ia) e (IIa) são conforme descritas para as Fórmulas (I) e (II).

[0021] Preferivelmente, no caso das Fórmulas (I), (II), (Ia) e (IIa), o R_1 é a cadeia lateral de um aminoácido de ocorrência natural, contanto que, se a cadeia lateral tiver um grupo funcional reativo, o grupo funcional seja protegido opcionalmente; e R_2 é metila. Alternativamente, R_1 é alquila e R_2 é metila. Mais preferivelmente, R_1 e R_2 são metila.

[0022] Na primeira modalidade da invenção, o método compreende reagir maitansinol com um N-carboxianidrido representando pela Fórmula (II) ou (IIa) em uma mistura de reação compreendendo adicionalmente uma base e um agente secante.

[0023] Em uma modalidade preferencial, a mistura de reação compreendendo adicionalmente um ácido de Lewis. Ácidos preferenciais de Lewis compreendem um cátion de metal.

[0024] Em outra modalidade preferencial, maitansinol e N-carboxianidrido são reagidos primeiro, e a mistura de reação é, em seguida, posta em contato com uma solução aquosa contendo bicarbonato ou carbonato ou colocando em contato a reação de mistura com um sequestrante de metal. Sequestrantes de metais conhecidos no âmbito da técnica podem ser utilizados (ver, por exemplo, capítulo 9 de "The Power of Functional Resin in Organic Synthesis" de Aubrey Mendoca, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008). Exemplos de sequestradores de metais incluem, mas não se limitam a, sequestradores à base de polímeros e sílica (por exemplo, QuadraPure™ e QuadraSil™ de Sigma-Aldrich, SiliaMetS® de SiliCycle, Smopex® de Johnson Matthey e sequestradores de metal Biotage), sequestradores à base de carbono (por exemplo, QuadraPure™ C de Sigma-Aldrich).

[0025] Em outra modalidade preferencial, maitansinol e N-carboxianidrido são primeiro reagidos e o cátion de metal do ácido de Lewis é removido em seguida da mistura de reação. Por exemplo, o cátion de metal do ácido de Lewis é removido da mistura de reação ao colocar em contato a mistura de reação e uma solução aquosa contendo bicarbonato ou carbonato ou colocando em contato a mistura de reação com um sequestrador de metais.

[0026] Em uma segunda modalidade, o método compreende: a) reagir o maitansinol com um N-carboxianidrido representando pela Fórmula (II) ou (IIa) em uma mistura de reação que compreenda

adicionalmente uma base; b) reagir o N-carboxianidrido não reagido da etapa a) com um reagente nucleofílico.

[0027] Em uma modalidade preferencial, a mistura de reação da etapa a) compreende ainda um ácido de Lewis. Ácidos preferenciais de Lewis compreendem um cátion de metal.

[0028] Em outra modalidade preferencial, a mistura de reação após a etapa b) é colocada em contato com uma solução aquosa contendo bicarbonato ou carbonato ou com um sequestrador de metal.

[0029] Em outra modalidade preferencial, o cátion de metal do ácido de Lewis é removido da mistura de reação uma vez desempenhada a etapa b), isto é, após a reação no nucleófilo com o N-carboxianidrido não reagido. Por exemplo, o cátion de metal do ácido de Lewis é removido da mistura de reação ao colocar em contato a mistura de reação e uma solução aquosa contendo bicarbonato ou carbonato ou colocando em contato a mistura de reação com um sequestrador de metais.

[0030] Em mais outra modalidade preferencial, a mistura de reação da etapa a) compreende ainda um agente secante.

[0031] O termo "**base**" refere-se a uma substância que possa aceitar íons de hidrogênio (prótons) ou doar um par de elétrons de valência. As bases exemplares são não nucleofílicas e não reativas ao N-carboxianidrido representado pela Fórmula (II). Exemplos de bases adequadas incluem uma trialquilamina (por exemplo, di-isopropiletilamina, trietilamina, e 1,8-Diazabiciclоundec-7-eno), um alcóxido de metal (por exemplo, terc-butóxido de sódio e terc-butóxido de potássio), um metal alquila (por exemplo, terc-butilítio, metil lítio, n-butil lítio, terc-butil lítio, di-isopropilamina de lítio, pentil sódio, e 2-fenil isopropil-potássio), um metal arila (por exemplo, fenil lítio), um hidreto de metal (por exemplo, hidreto de sódio), uma amida de metal (por exemplo, amida de sódio, amida de potássio, di-isopropilamida de lítio

e tetrametilpiperidida de lítio), e uma amida à base de silicone (por exemplo, sódio bis(trimetilsilil)amida e potássio bis(trimetillsilil)amida). Preferivelmente, a base é um uma trialquilamina. Mais preferivelmente, a base é a di-isopropiletilamina.

[0032] O termo "**agente secante**" refere-se a um agente que possa remover água de uma solução. Exemplos de um agente secante adequado incluem, mas não se limitam a, peneiras moleculares, sulfato de sódio, sulfato de cálcio, cloreto de cálcio e sulfato de magnésio. As formas físicas de agentes secantes incluem, mas não se limitam a, grânulos e pós. Preferivelmente, o agente secante é uma peneira molecular. Alternativamente, o agente secante é sulfato de sódio.

[0033] O termo "**Ácido de Lewis**" refere-se a uma substância ácida que possa empregar um par isolado de elétrons de uma outra molécula ao completar o grupo estável de um de seus átomos. Ácidos de Lewis exemplares para uso nos métodos divulgados incluem triflato de zinco, cloreto de zinco, brometo de magnésio, triflato de magnésio, triflato de cobre, brometo de cobre (II), cloreto de cobre (II), e cloreto de magnésio. Preferivelmente, o ácido de Lewis é triflato de zinco.

[0034] O termo "**reagente nucleofílico**" refere-se a um reagente que reage com centros eletropositivos no N-carboxianidrido representado pela Fórmula (II) para decompor o N-carboxinanidrido. Exemplos de reagente nucleofílico adequado incluem água, um álcool (metano, etanol, n-propanol, isopropanol ou terc-butanol) e uma amina primária ou secundária (por exemplo, metilamina, etilamina, dimetilamina, detilamina, etc.). Preferivelmente, o reagente nucleofílico é um álcool. Alternativamente, o reagente nucleofílico é água.

[0035] Condições de reação exemplares para o preparo de ésteres de aminoácido de maitansinol representados pela Fórmula (I) são fornecidas abaixo. Condições específicas são fornecidas na Exemplificação.

[0036] Embora quantidades equimolares de maitansinol para um N-carboxianidrido possam ser usadas, é mais comum que se use N-carboxianidrido em excesso. Razões molares exemplares de maitansinol para N-carboxianidrido variam de 1:1 a 1:10, mais geralmente 1:2 a 1:7 ou 1:1 a 1:4. Em uma modalidade preferencial, a razão molar de maitansinol para N-carboxianidrido é cerca de 1:5.

[0037] O ácido de Lewis é usado opcionalmente nos métodos divulgados. Quando presente, é geralmente usado em excesso em relação ao maitansinol, por exemplo, até 20 vezes a mais. Mais geralmente, a razão molar de maitansinol a ácido de Lewis varia de 1:5 a 1:8, mais preferivelmente cerca de 1:7. Quantidades menores de ácido de Lewis podem também ser usadas.

[0038] Quantidades suficientes de agentes secantes são usadas para remover água dissolvida do solvente de reação. A quantidade de agente secante não é crítica, contanto que a solução de reação torne-se substancialmente anidra. O agente secante pode ser usado diretamente no recipiente de reação ou sendo contido no recipiente por uma barreira semipermeável, como um contêiner de vidro sinterizado.

[0039] O tempo necessitado para esta reação pode ser facilmente monitorado por alguém versado na técnica, usando técnicas que incluem, mas não se limitam a, cromatografia líquida de alta pressão e cromatografia em camada delgada. Completa-se uma reação típica após 24 horas de mistura, mas ela pode ser realizada em velocidade maior ou menor, dependendo de vários fatores, tais como temperatura da reação e concentrações de reagentes.

[0040] A reação pode ser realizada entre -20°C até 80°C, preferivelmente entre -10°C e 60°C, mais preferivelmente entre -10°C a 40°C, e mais preferencialmente entre 0°C e 35°C.

[0041] Solventes adequados são prontamente determinados por alguém de conhecimento mediano da técnica, e incluem, mas não são

limitados a, solventes polares apróticos como formamida de anidro-dimetila, sulfóxido de dimetila, (DMSO) ou dimetilacetamida (DMA), hexanos, éteres (como tetra-hidrofurano, éter dietil, dimetoxietano, dioxano), diclorometano, ou uma mistura destes.

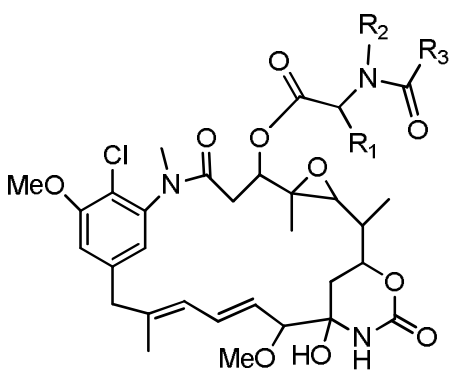
[0042] Se um ácido de Lewis encontra-se presente na mistura de reação, a mistura de reação após a reação de maitansinol e o N-carboxianidrido é colocada preferencialmente em contato com uma solução aquosa contendo bicarbonato ou carbonato com um sequestrador de metal. Preferivelmente, a mistura de reação é reagida com o reagente nucleofílico para decompor o excesso de N-carboxianidrido antes de a mistura de reação ser colocada em contato com uma solução aquosa contendo bicarbonato ou carbonato com um sequestrador de metal.

[0043] Se um ácido de Lewis encontra-se presente compreendendo um cátion de metal na reação de mistura, o cátion de metal será, de preferência, removido da mistura de reação como parte da manipulação da reação. A remoção do cátion de metal pode ser alcançada ao colocar-se em contato a mistura de reação com uma solução aquosa contendo bicarbonato ou sequestrado de metal. Preferivelmente, o N-carboxianidrido é reagido com o nucleofílico reagente antes da remoção do cátion de metal.

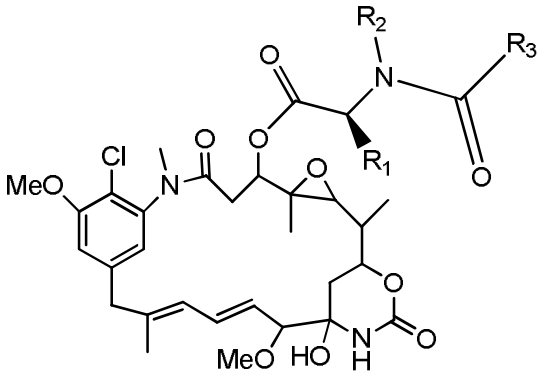
[0044] A quantidade de nucleófilo na etapa b) pode ser prontamente determinada por uma pessoa versada na técnica. Preferivelmente, uma quantidade suficiente de nucleófilo é usada para decompor o N-carboxianidrido não reagido. Esta é tipicamente uma quantidade equimolar de nucleófilo, porém, quantidades excessivas de nucleófilo podem ser usadas. Completa-se uma reação típica após 1 hora de mistura, mas ela pode ser realizada em velocidade maior ou menor, dependendo de vários fatores, tais como temperatura.

[0045] Também, dentro do escopo da invenção da invenção há um

método de acilar o éster de aminoácido de maitansinol. O método compreende reagir um éster de aminoácido de maitansinol (I) representado pela Fórmula (I) ou Fórmula (Ia), preparadas como descritas acima com um ácido carboxílico, tendo a Fórmula "R_3COOH", na presença de um agente condensador ou com um ácido carboxílico ativado que tem a Fórmula "R_3COX", para formar um composto representando por alguma das seguintes, respectivamente:



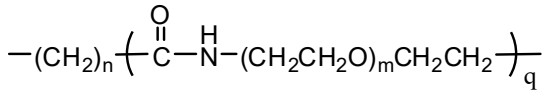
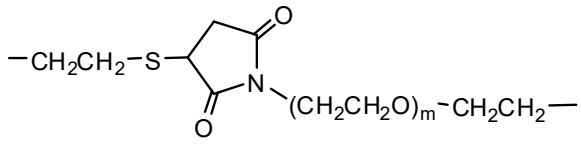
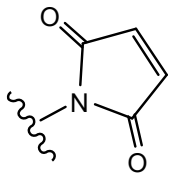
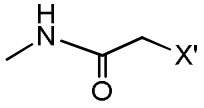
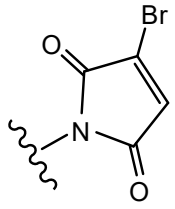
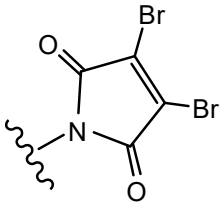
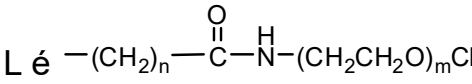
(III) e



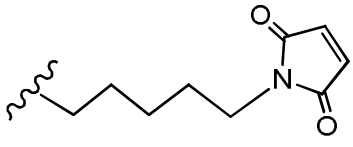
(IIIa).

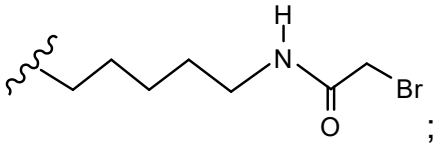
[0046] Na Fórmula (III) ou (IIIa), R_1 e R_2 são conforme definidas nas Fórmulas (I), (II), (Ia), e (IIa); R_3 é um grupo alquila ou um grupo alquila substituído; e X em R_3COX é um grupo de saída. Preferivelmente, X é um haleto, um grupo alcóxi, um grupo um arilóxi, um imidazol, - S-fenila, em que a fenila é substituída opcionalmente com nitro ou cloreto, ou -OCOR, em que R é um grupo alquila linear C1-C10, um grupo alquila ramificado C1-C10, um grupo alquila cíclico C3-C10 ou um grupo alquenila C1-C10. Em uma modalidade, na Fórmula "R_3COX" descrita cima, o -COX é um éster reativo; por exemplo um éster de N-sucinimida opcionalmente substituído. Exemplos de éster reativo incluem, mas não se limitam a, N-succinimidila, N-sulfosuccinimidila, N-ftalimidila, N-sulfoftalimidila, 2-nitrofenila, 4-nitrofenila, 2,4-dinitrofenila, e ésteres de 3-sulfonil-4-nitrofenila e 3-carbóxi-4-nitrofenila.

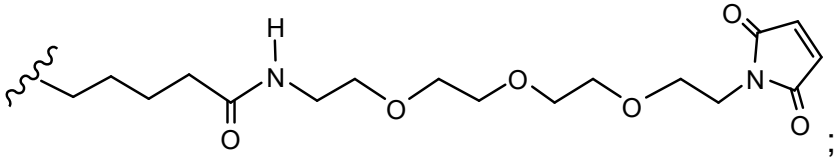
[0047] Preferivelmente, R_3 é -Y–S-SR_4, Y é alquileno C1-C10, e R_4 é alquila, arila ou heteroarila C1-C10. Em outra alternativa, Y é -CH_2CH_2- ou -$CH_2CH_2C(CH_3)_2$- e R_4 é metila.

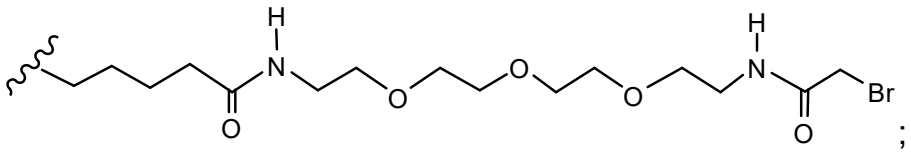
[0048] Em outra modalidade, R_3 é –L-E; L é  ou –$(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2NHC(=O)CH_2CH_2$- ou  ; E é  ou  ou  ou  ; X’ é um haleto; n é 1, 2, 3, 4, 5 ou 6; m é 0 ou um número inteiro de 1 a 20; e q é 0 ou 1. Alternativamente, L é –$(CH_2)_n$-; e n é tal como definido acima ou n é 5. Em outra alternativa, L é  ; e n e m são conforme definidos acima; ou, alternativamente, n é 4 e m é 3.

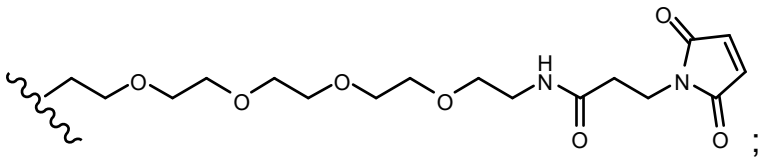
[0049] Em mais outra alternativa, R_3 é selecionado dentre as seguintes Fórmulas:

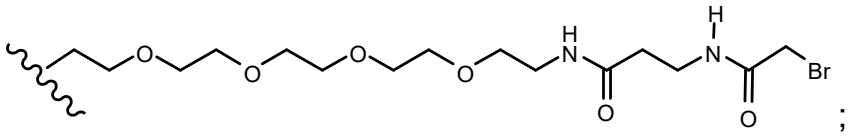
 ;

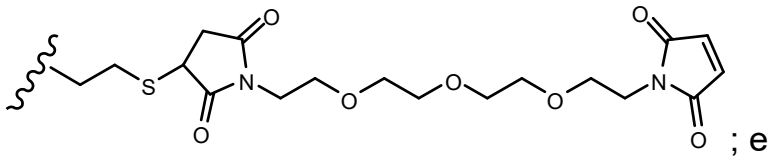
 ;

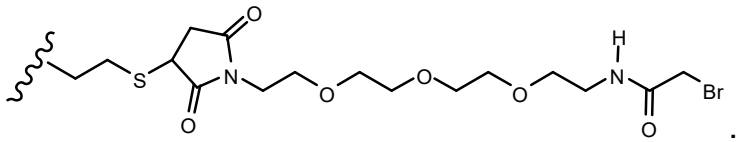
 ;


;


;


;


; e

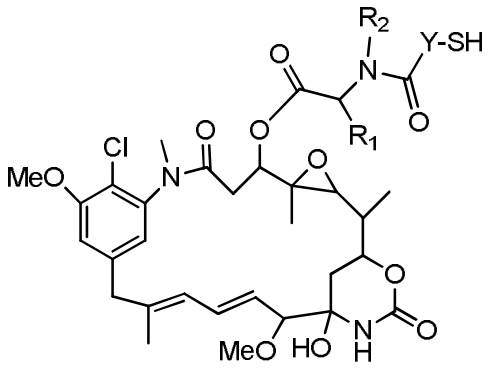

.

[0050] O termo "**agente condensador**" é um reagente que reage com o grupo hidroxila de um ácido carboxílico e o converte em um grupo de saída, que pode ser deslocado por uma amina ou grupo hidroxila. Exemplos de agentes condensadores adequados incluem uma carbodi-imida (cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodi-imida), um urônio, um éster ativo, um fosfônio, 2-alquil-1-alquilcarbonil-1,2-di-hidroquinolina (2-isobutóxi-1-isobutoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina), 2-alcóxi-1-alcoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina (2-etóxi-1-etoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina), ou alquilcloroformato (isobutilcloroformato). Preferivelmente, o agente condensador é uma carbodi-imida. Mais preferivelmente, cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodi-imida.

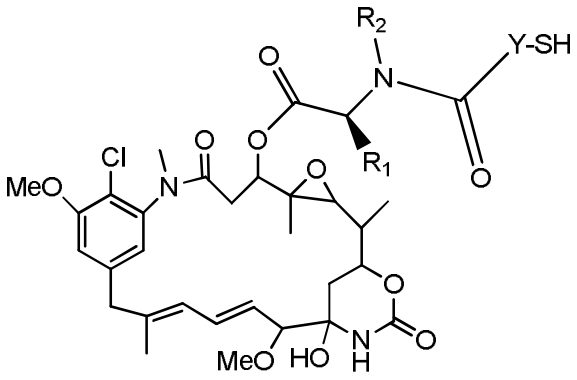
[0051] O termo "**grupo de saída**" refere-se a um grupo de

moléculas carregadas ou não carregadas que podem ser prontamente deslocadas por um nucleófilo, como uma amina. Tais grupos são conhecidos no âmbito da técnica e incluem, mas não se limitam a, haletos, ésteres, alcóxi, hidroxil, alcóxi, tosilatos, triflatos, mesilatos, nitrilos, azida, um imidazol, carbamato, dissulfeto, tioésteres, tioéteres (isto é, -S-fenila opcionalmente substituída) e compostos de diazônio. Preferivelmente, o grupo de saída é um haleto, um grupo alcóxi, um grupo arilóxi, um imidazol, -S-fenil substituído opcionalmente com -NO_2 ou Cloro, ou - OCOR, em que R é um grupo alquila linear C1-C10, um grupo alquila ramificado C1-C10, um grupo alquila cíclico C3-C10 ou um grupo alquenila C1-C10. Em outra modalidade preferencial, o grupo de saída é a molécula em um éster reativo (por exemplo, -COX) que pode ser deslocada. Um éster reativo inclui, mas não se limita a, N-succinimidila, N-sulfosuccinimidila, N-ftalimidila, N-sulfoftalimidila, 2-nitrofenila, 4-nitrofenila, 2,4-dinitrofenila, e ésteres de 3-sulfonil-4-nitrofenila e 3-carbóxi-4-nitrofenila.

[0052] A invenção inclui também um método para usar um éster C3 de maitansinol para preparar um derivado deste. O método compreende reagir um éster C3 de maitansinol representado pela Fórmula (III) ou (IIIa) preparadas acima com um agente redutor para formar um composto representado por uma das seguintes Fórmulas:



(IV) e



(IVa).

[0053] Nas Fórmulas (IV) e (IVa), R_1 e R_2 são conforme definidos nas Fórmulas (I), (II), (Ia), e (IIa); e Y é tal como definido na Fórmula (III) ou (IIIa).

[0054] O termo "agente redutor" é o elemento ou composto em uma reação redução-oxidação que converte a ligação dissulfeto em um grupo hidrossulfeto. Exemplos de agentes redutores adequados incluem ditiotreitol (DTT), (tris(2-carboxietil)fosfina) (TCEP) e $NaBH_4$.

[0055] O composto da Fórmula (III) ou (IIIa), quando R_3 é –L-E, ou o composto da Fórmula (IV) ou (IVa) podem reagir com um anticorpo ou um anticorpo modificado para formar anticorpo-maitansinoide conjugado. Vide, por exemplo, Patentes US n° 7.521.541, 5.208.020 e 7.811.872. Alternativamente, o composto da Fórmula (IV) ou (IVa) pode reagir com um agente de ligação cruzada bifuncional para formar um composto ligante carregando um grupo reativo que pode reagir com um anticorpo para formar um anticorpo-maitansinoide conjugado. Vide, por exemplo, Patentes US n° 6.441.163, US 2011/0003969A1 e US 2008/0145374.

[0056] **"Alquila"** conforme empregado neste documento refere-se a um alquila linear, ramificado ou cíclico.

[0057] "**Alquila linear** ou **ramificado**" como empregado neste documento refere-se a um radical hidrocarbônico monovalente saturado linear ou de cadeia ramificada de um a vinte átomos de carbono. Exemplos de alquila incluem, mas não se limitam a, metila, etila, 1-propila, 2-propila, 1-butila, 2-metil-1-propila, $-CH_2CH(CH_3)_2$, 2-butila, 2-metil-2-propila, 1-pentila, 2-pentila, 3-pentila, 2-metil-2-butila, 3-metil-2-

butila, 3-metil-1-butila, 2-metil-1-butila, -$CH_2CH_2CH(CH_3)_2$,1-hexila, 2-hexila, 3-hexila, 2-metil-2-pentila, 3-metil-2-pentila, 4-metil-2-pentila, 3-metil-3-pentila, 2-metil-3-pentila, 2,3-dimetil-2-butila, 3,3-dimetil-2-butila, 1-heptila, 1-octila, e semelhantes. Preferivelmente, o alquila tem um a dez átomos de carbono. Mais preferivelmente, o alquila tem um a quatro átomos de carbono.

[0058] "**Alquileno"**, tal como empregado neste documento, refere-se a um alquileno linear, ramificado ou cíclico.

[0059] "**Alquileno linear** ou **ramificado**" conforme empregado neste documento refere-se a um radical hidrocarbônico divalente linear saturado ou de cadeia ramificada de um a vinte átomos de carbono. Exemplos de alquila incluem, mas não se limitam a, metileno, etileno, 1-propileno, 2-propileno, 1-butileno, 2-metil-1-propileno, -$CH_2CH(CH_3)_2$-, 2-butileno, 2-metil-2-propileno, 1-pentileno, 2-pentileno, 3-pentileno, 2-metil-2-butileno, 3-metil-2-butileno, 3-metil-1-butileno, 2-metil-1-butileno, -$CH_2CH_2CH(CH_3)_2$-, 1-hexil, 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, e semelhantes. Preferivelmente, o alquileno tem de um a dez átomos de carbono. Mais preferivelmente, o alquileno tem um a quatro átomos de carbono.

[0060] "**Alquileno linear** ou **ramificado**" refere-se a um radical hidrocarbônico monovalente linear ou de cadeia ramificada de dois a vinte átomos de carbono, *isto é,* um carbono-carbono, ligação dupla, em que o radical alquila inclui radicais tendo orientações "cis" e "trans", ou alternativamente, orientações "E" e "Z". Exemplos incluem, mas não se limitam a, etilenila ou vinila (-$CH=CH_2$), alila (-$CH_2CH=CH_2$), e semelhantes. Preferivelmente, o alquenila tem de dois a dez átomos de carbono. Mais preferivelmente, o alquenila tem dois a quatro átomos de carbono.

[0061] "**Alquila cíclico**" refere-se a um radical monovalente saturado de anel carbocíclico. Preferivelmente, a alquila cíclica é um radical com três a dez membros de anel monocíclico. Mais preferivelmente, a alquila cíclica é ciclo-hexila.

[0062] "**Arila**" significa um radical hidrocarbônico monovalente aromático de 6-18 átomos de carbono derivado da remoção de um átomo de hidrogênio de um único átomo de carbono de um sistema pai de anel aromático. Arila inclui radicais bicíclicos, que compreendem um anel aromático fundido a um anel saturado, parcialmente insaturado, ou anel carbocíclico ou heterocíclico aromático. Grupos arila típicos incluem, mas não se limitam a, radicais derivados do benzeno (fenila), benzenos substituídos (por exemplo, para-nitrofenila, orto-nitrofenila, e dinitrofenila), nafthaleno, antraceno, indenila, indanila, 1,2-di-hidronaftaleno, 1,2,3,4-tetra-hidronaftila, e os semelhantes. Preferivelmente, a arila é fenila opcionalmente substituída (por exemplo, fenila, fenol ou fenol protegido).

[0063] "**Heteroarila**" refere-se a um radical aromático monovalente de anéis com 5 ou 6 membros, e inclui sistemas de anéis fundidos (sendo pelo menos um aromático) de 5-18 átomos, contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre. Exemplos de grupo heteroarila são piridinila (por exemplo, 2-hidroxipirinidila), imidazolila, imidazopiridinila, pirimidinila (por exemplo, 4-hidroxipirimidinila), pirazolila, triazolila, pirazinila, tetrazolila, furila, tienila, isoxazolila, tiazolila, oxazolila, isotiazolila, pirrolila, quinolinila, isoquinolinila, indolila, benzimidazolila, benzofuranila, cinnolinila, indazolila, indolizinila, ftalazinila, piridazinila, triazinila, isoindolila, pteridinila, purinila, oxadiazolila, triazolila, tiadiazolila, furazanila, benzofurazanila, benzotiofenila, benzotiazolila, benzooxazolila, quinazolinila, quinoxalinila, naftiridinila e furopiridinila.

[0064] Os substitutos adequados para um grupo alquila são aqueles que não interferem de maneira significativa com as reações descritas.

Substitutos que de fato interferem nas reações descritas podem ser protegidos de acordo com métodos conhecidos àqueles moderadamente versados na técnica, por exemplo, em T.W. Greene and P. G. M. Wuts "Protective Groupsin Organic Synthesis" John Wiley & Sons, Inc., Nova York 1999. Substitutos exemplares incluem arila (por exemplo, fenila, fenol e fenol protegido), halogêneo de heteroarila (por exemplo, indolila e imidazolila), guanidínio [-NH(C=NH)NH_2], -OR^{100}, $NR^{101}R^{102}$, -NO_2, -$NR^{101}COR^{102}$, -SR^{100},um sulfóxido representado por -SOR^{101}, uma sulfona representada por -SO_2R^{101}, um sulfato -SO_3 R^{100}, um sulfonato -OSO_3 R^{100}, uma sulfonamida representada por -$SO_2NR^{101}R^{102}$, ciano, um azido, -COR^{101}, -$OCOR^{101}$, -$OCONR^{101}R^{102}$; R^{101} e R^{102} são selecionadas, cada qual, independentemente dentre alquila, alquenila ou alquinila H, linear, ramificado ou cíclico tendo de 1 a 10 átomos de carbono.

[0065] O termo "**haleto**" refere-se a -F, -Cl, -Br ou -I.

[0066] O termo "**aminoácido**" refere-se a aminoácidos de ocorrência natural ou aminoácidos de ocorrência não natural representados por NH_2-C($R^{aa'}R^{aa}$)-C(=O)OH, em que R^{aa} e $R^{aa'}$ são cada qual independentemente H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificado ou cíclico opcionalmente substituído tendo de 1 a 10 átomos de carbono, arila, heteroarila ou heterociclila. O termo "aminoácido" refere-se igualmente ao resíduo correspondente quando um átomo de hidrogênio é removido da extremidade amino terminal e/ou da extremidade carbóxi terminal do aminoácido, tal como -NH-C($R^{aa'}R^{aa}$)-C(=O)O-. Os exemplos específicos abaixo devem ser interpretados como meramente ilustrativos, e não limitantes no que diz respeito ao restante desta divulgação absolutamente de maneira alguma. Sem um aprofundamento, acredita-se que um indivíduo versado na técnica pode, com base na descrição neste documento, utilizar a presente invenção em toda sua extensão. Todas as publicações citadas neste documento

são, por este meio, incorporadas por referência em sua totalidade. Adicionalmente, todo mecanismo proposto abaixo não restringe de maneira alguma o escopo da invenção reivindicada.

EXEMPLIFICAÇÃO

Materiais e Métodos

[0067] Os parâmetros processuais dados abaixo podem ser adotados e adaptados por indivíduos versados na técnica de modo que se adequem a suas necessidades.

[0068] Todas as reações foram realizadas sob atmosfera de árgon com agitador magnético. O tetra-hidrofurano e a dimetilformamida foram comprados como solventes anidros da Aldrich. Maitansinol, foi produzido como descrito (Widdison et al., *J. Med. Chem.,* 49:4392-4408 (2006)). O N-carboxianidrido de N-metil-alanina, (4S)-3,4-dimetil-2, 5-oxazolidinediona foi preparado como descrito (Akssira, M. et al., *J. Marocain de Chimie Heterocyclique*, 1:44–47 (2002)). Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (^{1}H 400MHz, ^{13}C 100 MHz) foram obtidos em um Bruker ADVANCE™ series RMN. Os dados de HPLC/MS foram obtidos usando um espectrômetro de massa de armadilha de íon Bruker ESQUIRE™ 3000 alinhado a um Agilent 1100 series HPLC. O método HPLC 1 foi usado para analisar DM1. O método HPLC 2 foi usado para todas as outras análises.

Método Analítico HPLC 1:

[0069] Umedeça o sistema HPLC com um detector UV ou equivalente

[0070] Coluna: YMC-Pack ODS-AQ 250x4,6 mm; 5 µm (Parte Nº = AQ12S05-2546WT)

[0071] Fluxo: 1 mL/min (Gradiente)

[0072] Fase Móvel: A = 1 ml de 85% H_3PO_4 em 1 litro de água; B = acetonitrila/Tetra-hidrofurano 30:70 (v/v) (Nota: TFA a 0,1% foi usado em vez de H3PO4 na fase móvel A da análise LC/MS

Tabela do Gradiente:

	Tempo, min.	Fluxo	%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

[0073] Tempo de execução: 60 minutos + Tempo Posterior: 10 minutos

[0074] Detecção de UV: 252 nm

[0075] Volume da injeção = 5 µL de cerca de 1 mg/ml de DM1 em acetonitrila

[0076] Temperatura da coluna = 15°C (a menos que indicado de outra maneira)

[0077] Temperatura da amostra = 2-8°C

Método Analítico HPLC/MS 2:

[0078] Coluna: 150 x 4,6 mm C8, 5 mícrons tamanho de partícula, Zorbax P/N 993967-906

[0079] Solventes: Uma água deionizada + TFA a 0,1%

[0080] Solvente B: Acetonitrila

[0081] Taxa de Fluxo 1,0 mL/min Temperatura: Ambiente

[0082] Volume de injeção: 15 µL

Gradiente:

Tempo	%B
0	25
25	50
26	95
30	95
31	25
37	25

[0083] Os dados foram indicados de 0-25 minutos em traços HPLC.

Preparação da Amostra para o Método Analítico HPLC 2:

[0084] Alíquotas (20 µL) de dada mistura foram acrescentadas à acetonitrila (1,5 mL) em um frasco de autoamostragem. O frasco foi tampado e agitado e posto, em seguida, em autoamostragem de 15°C. Um volume de injeção (15 µL) foi analisado para cada execução do HPLC.

Exemplo 1. Preparação de DM1-SMe com acréscimo de peneiras moleculares 4A como agentes secantes

[0085] Maitansinol (50,1 mg, 0,0888 mmol), (4S)-3,4-dimetil-2, 5-oxazolidinediona (30,2 mg, 0,233 mmol, 2,6 eq), triflato de zinco (133 mg, 0.366 mol) e peneiras moleculares 4A (0,50 g) pré-secadas a 250ºC sob condições de vácuo e depois resfriadas até temperatura ambiente foram acrescentados a um fracos de 10 ml. Os conteúdos foram acrescidos de dimetilformamida anidra (0,75 mL), a que se acresceu di-isopropile-tilamina (62 µL, 0,357mmol). A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 24 horas. Uma amostra da mistura bruta foi analisada por HPLC, produto $N^{2'}$-deacetil-maitansina contabilizava 80% da área total da HPLC. A mistura de reação foi diluída com $NaHCO_3$ saturado 1:1:NaCl saturado (1,2 mL) e acetato de etila (3 mL) misturada e depois filtrada com celite, em seguida lavada com solução tampão de fosfato de potássio (1 mL, 400 mM, pH 7,5). A camada orgânica foi secada com sulfato de magnésio anidro, filtrada e em seguida evaporada para formar um sólido amarelo. Ao sólido foram acrescentados ácido 3-metilditiopropanoico (25 mg, 0,16 mmol), cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodi-imida (30 mg, 0,16 mmol) e diclorometano (3 mL). Após agitar por 2 horas, a mistura foi diluída com etilacetato (8 mL), lavada com solução tampão de fosfato de potássio a 1,0 M, pH 6,5 (2 mL) e a solução aquosa foi extraída com acetato de etila (2 x 8 mL). As camadas orgânicas foram combinadas, secadas com sulfato de magnésio anidro, concentradas e purificadas por cromatografia 95:5 diclorometano:metanol para render 51 mg (70%) de DM1-SMe.

Exemplo 2. Exemplo 1 em escala 10x maior:

[0086] A reação do Exemplo 1 foi testada em escala 10 vezes maior, dando 490 mg (68%) de DM1-SMe.

Exemplo 3. Preparação de DM1-SMe sem acréscimo de agente secante

[0087] Maitansinol (1,0 g, 1,77 mmol) foi dissolvido em dimetilformamida anidra (15 mL) em um frasco de 25 mL que fora refrigerado em banho de gelo e água. 2 minutos depois, di-isopropiletilamina (DIPEA, 0,92 g 7,07 mmol) e triflato de zinco (3,8 g, 10,6 mmol) foram acrescentados com agitador magnético; em seguida, (4S)-3,4-dimetil-2, 5-oxazolidinediona (0,913 g, 7,07 mmol) foi rapidamente acrescentada à mistura e esta foi agitada por 24 horas. Uma amostra da mistura bruta foi analisada por HPLC, produto $N^{2'}$-deacetil-maitansina contabilizava 65% da área total da HPLC. A mistura de reação foi diluída com $NaHCO_3$ saturado 1:1:NaCl saturado (25 mL) e etil acetato (40 mL) misturada e depois filtrada com celita, em seguida lavada com NaCl saturado. A camada orgânica foi secada com sulfato de magnésio anidro, filtrada e em seguida evaporada. O resíduo foi colocado em diclorometano (30 mL), ao qual foram rapidamente acrescentados ácido 3-metilditiopropânico (1,1 g, 7,0 mmol) e cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodi-imida (1,34 g, 7,0 mmol) e a reação foi agitada sob árgon em temperatura ambiente por 2 horas. A mistura foi diluída com acetato de etila (30 mL), lavada com solução tampão de fosfato de potássio a 1,0 M, pH 6,5 (30 mL) e a solução aquosa foi extraída com acetato de etila (2 x 40 mL). As camadas orgânicas foram combinadas, secadas com sulfato de magnésio anidro, concentradas e purificadas por cromatografia 95:5 diclorometano:metanol para render 698 mg (50%) de DM1-SMe.

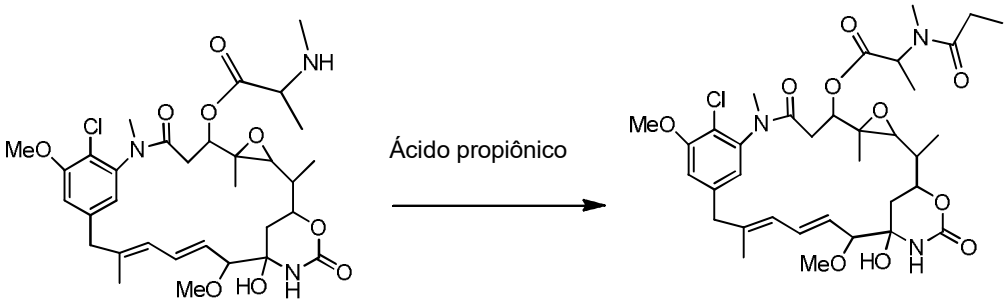
Exemplo 4. Repetição do exemplo 3

[0088] A reação no Exemplo 3 foi repetida na mesma escala, dando 735 mg (53%) de DM1-SMe.

Exemplo 5: Solução-mãe de N2'-deacetil-maitansina bruta.

[0089] Maitansinol (0,5 g, 0,89 mmol) foi dissolvido em dimetilformamida anidra (7 mL) em um frasco de 25 mL que fora refrigerado em banho de gelo e água. 2 minutos depois, di-isopropiletilamina (0,5 g, 3,5 mmol) e triflato de zinco (1,9 g, 5,3 mmol) foram acrescentados com agitador magnético; em seguida, (4S)-3,4-dimetil-2, 5-oxazolidinediona (4,52 g, 3,5 mmol) foi rapidamente acrescentada à mistura e esta foi agitada por 24 horas.. Alíquotas (0,5 mL cada) desta solução-mãe foram usadas nas seguintes experiências, portanto cada uma foi gerada de cerca de 0,13 mmol de maitansinol.

Exemplo 6. Extração de $N^{2'}$-deacetil-maitansina seguida de acoplamento a ácido propiônico (Controle)



6a $N^{2'}$-deacetil-maitansina

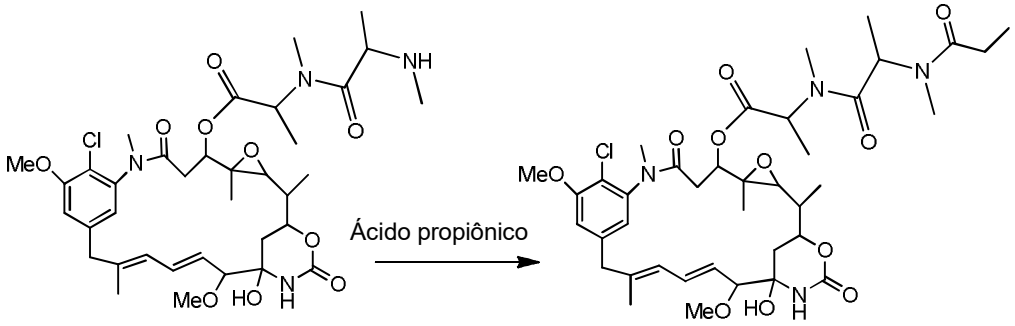
16 May-NMA-Pr

$C_{35}H_{48}ClN_3O_{10}$
Massa Exata: 705.30

[0090] Solução-mãe $N^{2'}$-deacetil-maitansina (0,50 mL) foi acrescentada a um recipiente com capacidade de 6 mL contendo acetato de etila (1,5 mL) e NaCl:$NaHCO_3$ saturado 1:1 (0,75 mL), que foi rapidamente tampado e agitado. A camada orgânica foi retida e secada com Na_2SO_4 anidro (120 mg). A camada orgânica (1,0 mL) foi tomada e ácido propiônico (20,0 µL, 0,27 mmol) foi adicionado. A solução foi então transferida a um frasco contendo cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodi-imida (40 mg, 0,209 mmol). Permitiu-se que a reação progredisse por 2,5 horas, e em seguida analisada por HPLC.

[0091] O seguinte produto colateral foi também produzido de May-NMA2, um produto colateral da reação anterior, conforme evidenciado

abaixo:



15 May-NMA2

17 May-NMA$_2$-Pr

$C_{39}H_{55}ClN_4O_{11}$
Massa Exata: 790.36

[0092] A razão de áreas de HPLC por cento para **17:16** foi 3,0:71,7. MS de **16** (M+ H+) 706 (M + Na^+) 728; MS de 17 (M+ Na^+) 813.

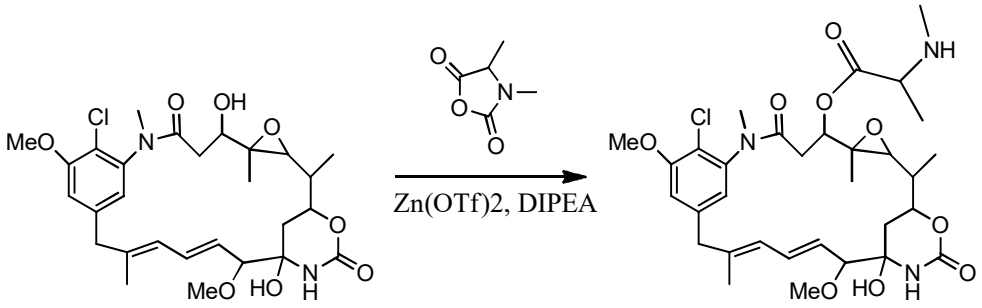
Exemplo 7: A experiência do Exemplo 6 foi repetida.

[0093] A razão de áreas de HPLC por cento para **17:16** foi 3,0:70,9.

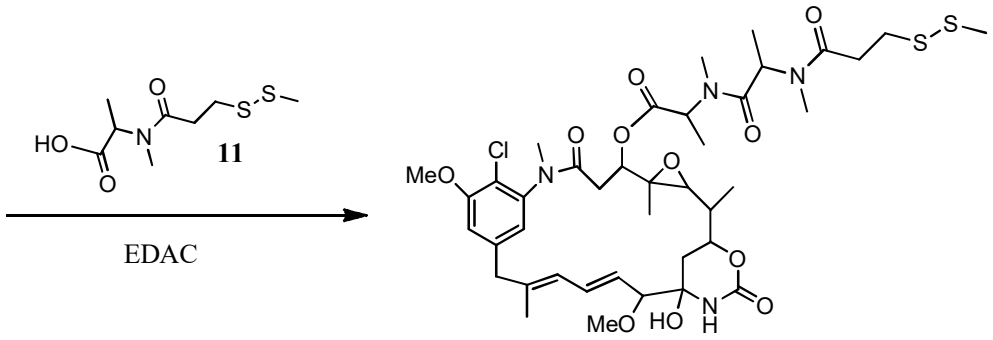
Exemplo 8. Extração de $N^{2'}$-deacetil-maitansina seguida de pré-esgotamento de metanol e acoplamento a ácido propiônico (Pré-esgotamento para destruir excesso de 5a)

[0094] Solução-mãe de $N^{2'}$-deacetil-maitansina (0,50 mL) foi acrescentada a um frasco com capacidade de 6 mL a que acrescentou-se metanol (75 µL, 1,8 mmol), e o frasco foi tampado e seus conteúdos agitados magneticamente por uma hora. Acetato de etila (1,5 mL) e NaCl:$NaHCO_3$ 1:1 saturato (0,75 mL) foram então acrescentados e o frasco foi tampado e agitado. A camada orgânica foi retida e secada com Na_2SO_4 anidro (120 mg). A camada orgânica (1,0 mL) foi tomada e ácido propiônico (20,0 µL, 0,27 mmol) foi acrescentado. A solução foi então transferida a um frasco contendo cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodi-imida (40 mg, 0,209 mmol). Permitiu-se que a reação progredisse por 2,5 horas, e em seguida analisada por HPLC. O pico de HPLC para **17** mal foi detectável, não foi possível integração. Esta reação foi repetida e, mais uma vez, **17** mal foi detectável, não foi possível integração. Deste modo, o método de pré-esgotamento produz menos compostos indesejáveis **15** e **17**.

Exemplo 9. Síntese de NMA-DM1-SMe extra (9a)



Maitansinol (1) **May-NMA (6a)**



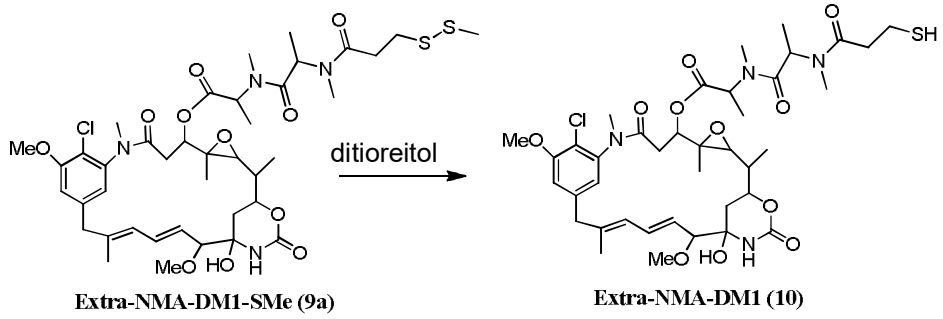
Extra-NMA-DM1-SMe (9a)

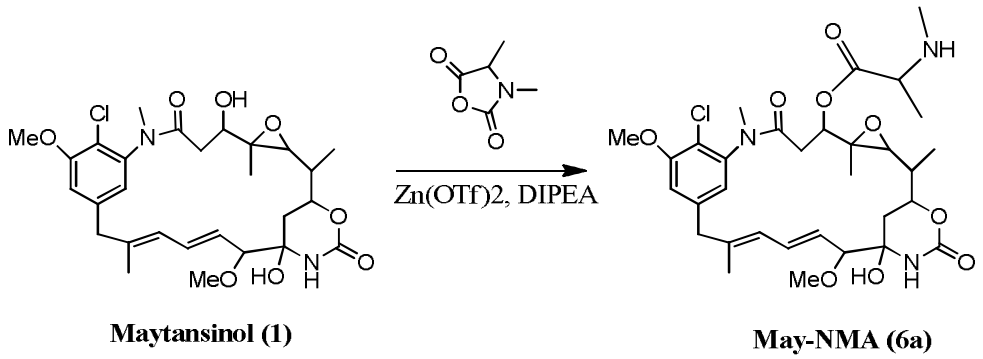
[0095] Maitansinol (1,2 mg, 2,1 mmol) foi pesado em um frasco de 50 mL e dissolvido em uma mistura de dimetilformamida (12 mL) e tetra-hidrofurano (6 mL). O frasco foi refrigerado em um banho de água e gelo. 5 minutos depois, di-isopropilletilamina (1,5 mL, 8,5 mmol), trifluorometanosulfonato de zinco (4,5 g, 12,6 mmol), e 2,5-oxazolidinediona, 3,4-dimetil (4S) (1,1 g, 8,5 mmol) foram sequencialmente acrescentados. Depois de 17 horas de agitação, a reação foi extraída com NaCl aquoso saturado 1:1: $NaHCO_3$ saturado aquoso (14 mL) e acetato de etila (100 mL). A camada orgânica foi retida e secada com Na_2SO_4 anidro. O agente de secagem foi removido e aproximadamente dois terços do solvente foram removidos por evaporação rotativa sob condições de vácuo. Então, acrescentou-se N-metil-N-[(2-metilditio)-1-oxopropil]-L-alanina (1,0 g, 4,2 mmol) seguido de cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (0,889 g, 4,6 mmol). Cloreto de metileno (10 mL) foi adicionado para dissolver a mistura. Depois de 4 horas, a reação foi extraída com cloreto de

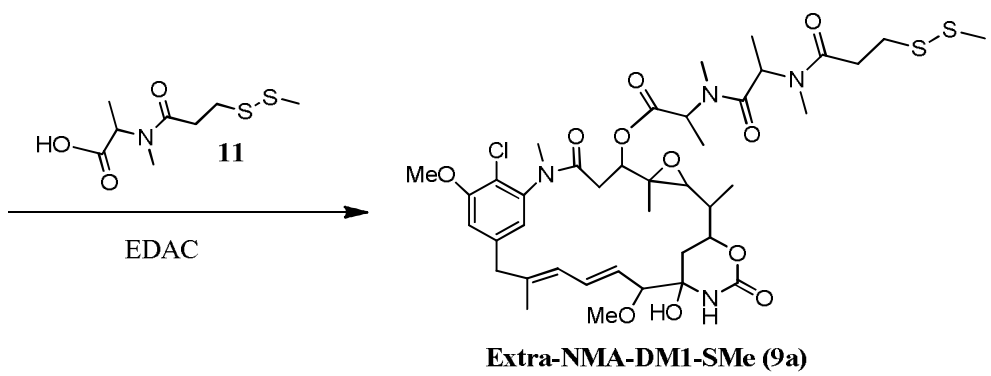
metileno (70 mL) e NaCl aquoso saturado 1:4: $NaHCO_3$ aquoso saturado (20 mL). A camada orgânica foi retida e secada com Na_2SO_4 anidro. O solvente foi removido por evaporação rotativa sob condições de vácuo. O óleo grosso resultante foi dissolvido em acetonitrila (3 mL) e aproximadamente ½ do material foi purificado por HPLC em uma coluna de simetria escudo C8 da marca Waters (19 x 150 mm mícron, 5 mícron tamanho da partícula). A coluna foi eluída com água deionizada contendo 0,2% de ácido fórmico com um gradiente de acetonitrila (30% - 60% acetonitrila ao longo de 18 min). A coluna foi enxaguada com acetonitrila de 95% por 5 minutos e em seguida reequilibrada com acetonitrila de 30% por 6 minutos entre testagens. Os volumes de injeção variaram entre 100 - 800 uL. Maitansinol não reagido eluiu em 8,5 minutos, um isômero indesejado de NMA-DM1-SMe extra eluiu em 13,8 minutos e o isômero desejado de NMA-DM1-SMe extra eluiu em 15,1 minutos. Frações de produtos desejados de diversas execuções foram combinadas e solvente foi removido por evaporação rotativa sob condições de vácuo. O resíduo foi tomado em um volume mínimo de acetato de etila e uma impureza menor foi removida por HPLC em uma coluna de ciano Kromasil (250 mm x 21 mm, 10 mícron tamanho de partícula). A coluna foi posta em funcionamento com uma fase isocrática móvel de 67:9:24 hexanos:2-propanol:acetato de etila em 21 mL/min. O produto desejado eluiu aos 22,6 min ao passo que a impureza eluiu aos 12,6 min. Frações de produtos de diversas execuções foram combinadas e solvente foi removido por evaporação rotativa sob condições de vácuo para fornecer 95 mg de produto (rendimento de 10%). 1H RMN (400MHz, $CDCl_3$-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 (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. Cálc. de HRMS. para $C_{40}H_{57}ClN_4O_{11}S_2$ (M + Na^+) m/z = 891.3052; encontrados 891,3049.

Exemplo 10. Síntese de NMA-DM1 extra (10)





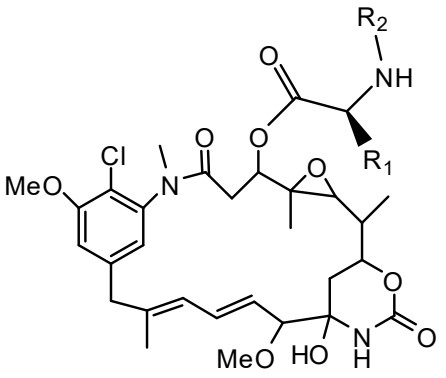


[0096] $N^{2'}$-Deacetil-$N^{2'}$-(3-metilditio-1-oxopropil-N-metil-L-alanil)-maitansina (95 mg, 0,109 mmol) foi dissolvida em 2:1 dimetoxietano:solução tampão de fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 a que acrescentou-se ditiotreitol (110 mg, mmol). Após 2 horas a solução foi extraída com uma mistura acetato de etila: cloreto de metileno = 2: 1 (5 mL) e NaCl aquoso saturado (1 mL). A camada orgânica foi retida e secada com Na2SO4 anidro. O agente de secagem foi removido por filtragem a vácuo e solvente foi removido por evaporação rotativa sob condições de vácuo. O resíduo foi tomado em um volume mínimo de acetato de etila 1:1: cloreto de metileno e purificado por HPLC em uma coluna de ciano Kromasil (250 mm x 21 mm, 10 mícron tamanho de partícula). A coluna foi posta em funcionamento com uma fase isocrática móvel de 64:19:17 hexanos:2-propanol:acetato de etila em 21 mL/min. O produto desejado eluiu aos 16 min. Frações de produtos de diversas execuções foram combinadas e solvente foi removido por evaporação rotativa para fornecer 62 mg de produto (rendimento de 69%). ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) 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 (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. Calc. HRMS para $C_{39}H_{55}ClN_4O_{11}S$ ($M + Na^+$) m/z = 845,3174; encontrados 845,3166.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparo de um composto representado pela seguinte Fórmula:

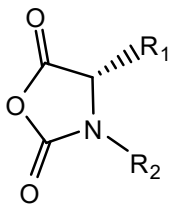


(Ia),

em que R1 é metila; e R2 é metila,

o método sendo caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) reação de maitansinol com um N-carboxianidrido em uma mistura de reação que compreende adicionalmente uma base e um ácido de Lewis selecionado do grupo que consiste em triflato de zinco, cloreto de zinco, brometo de magnésio, triflato de magnésio, triflato de cobre, brometo de cobre (II), cobre (II) cloreto e cloreto de magnésio, em que o N-carboxianidrido é representado pela seguinte Fórmula:



(IIa)

formando assim o composto de Fórmula (Ia);

(b) reação de N-carboxianidrido não reagido da mistura de reação na etapa (a) com um reagente nucleofílico, que é um álcool selecionado de metanol, etanol, n-propanol, isopropanol e terc-butanol.

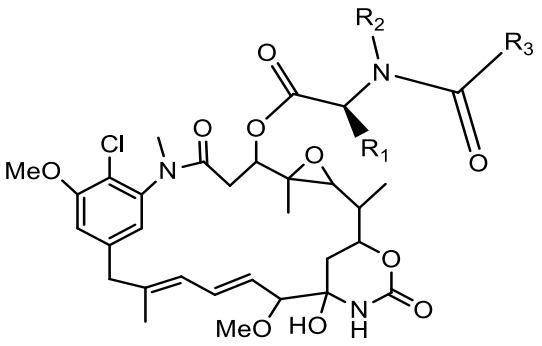
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a mistura de reação na etapa (a) compreende ainda um agente de secagem.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o reagente nucleofílico é metanol.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda o contato da mistura de reação após a etapa (b) com uma solução aquosa contendo bicarbonato ou carbonato ou o contato da mistura de reação com um eliminador de metal.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o ácido de Lewis é triflato de zinco.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de reação do composto de Fórmula (Ia) com um ácido carboxílico de Fórmula R_3COOH na presença de um agente de condensação ou com um ácido carboxílico ativado de Fórmula R_3COX, para formar um composto representado pela seguinte Fórmula:



(IIIa)

em que R_3 é um grupo alquila ou um grupo alquila substituído e X é um grupo de saída.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que:

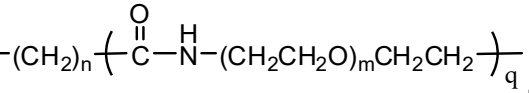
i) X é um haleto, um grupo alcoxi, um grupo ariloxi, um imidazol, –S-fenil opcionalmente substituído com nitro ou cloreto, ou –OCOR, em que R é um grupo alquila C1-C10 linear, um grupo alquila C1-C10 ramificado, um grupo alquila C3-C10 cíclico ou um grupo C1-C10 alquenila;

ii) -COX é um éster reativo;

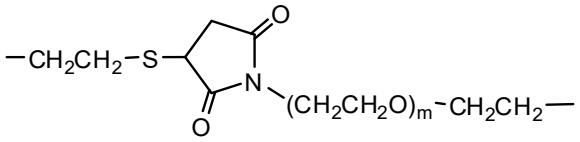
iii) R_3 é -Y – S-SR_4, em que Y é C1-C10 alquileno e R_4 é C1-C10 alquila, arila ou heteroarila;

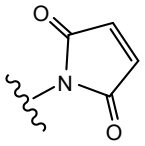
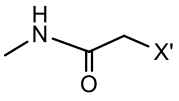
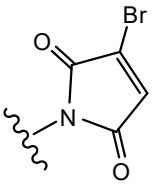
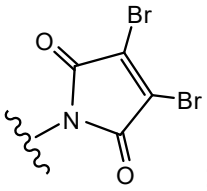
iv) R_3 é -Y – S-SR_4, em que Y é -CH_2CH_2- ou $CH_2CH_2C(CH_3)_2$- e R_4 é CH_3;

v) R_3 é –L-E;

L é  , ou

-$(CH_2CH_2O)mCH_2CH_2NHC(=O)CH_2CH_2$ ou



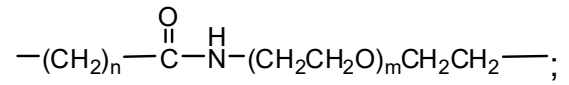
E é  ou  ou  ou  ;

X 'é um haleto;

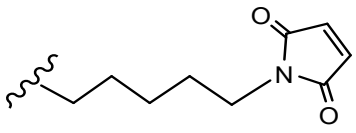
n é 2, 3, 4, 5 ou 6;

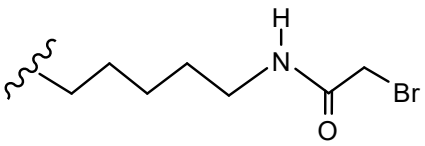
m é 0 ou um número inteiro de 1 a 20; e

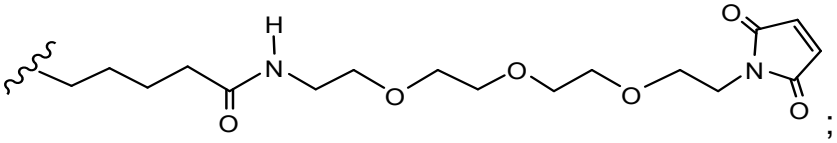
q é 0 ou 1, de preferência L é -$(CH_2)_n$ ou

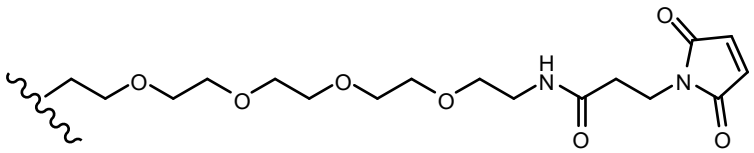
 ; ou

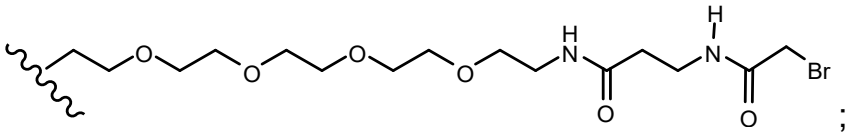
vi) R_3 é representado por um dos seguintes:

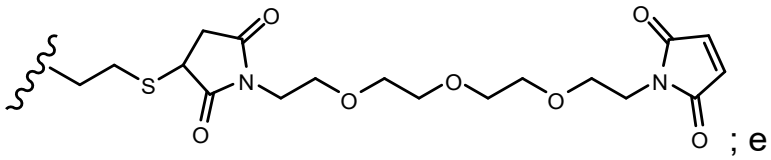
 ;

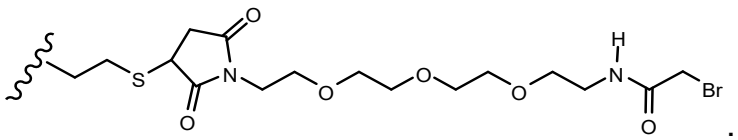
 ;

 ;


;

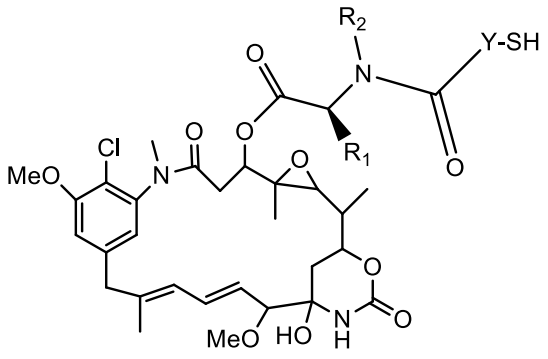

;


; e


.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que R_3 é -Y – S-SR_4, em que Y é -CH_2CH_2- ou $CH_2CH_2C(CH_3)_2$-; R_4 é CH_3; e -COX é um éster reativo selecionado do grupo que consiste em N-succinimidil, N-sulfosuccinimidil, N-ftalimidil, N sulfoftalimidil, 2-nitrofenil, 4-nitrofenil, 2,4-dinitrofenil, 3-sulfonil-4-nitrofenil e Éster 3-carboxi-4-nitrofenílico.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que quando R_3 é -Y-S-SR_4, o método compreende ainda a reação do composto de fórmula (IIIa) com um agente redutor para formar um composto representado pela seguinte Fórmula:


(Iva).

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6, 7 ou 9, caracterizado pelo fato de que:

i) o agente de condensação é uma carbodiimida, um urônio, um éster ativo, um fosfônio, 2-alquil-1-alquilcarbonil-1,2-di-hidroquinolina, 2-alcoxi-1-alcoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina ou alquilcloroformato; ou

ii) o agente de condensação é uma carbodiimida; ou cloridrato de N- (3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o agente de condensação é cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida.

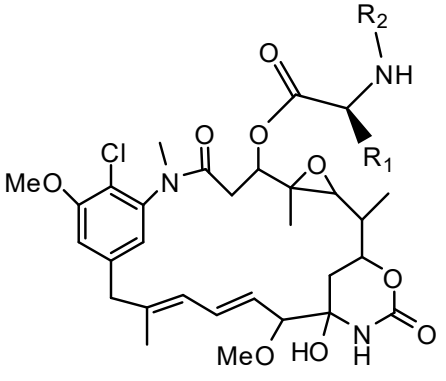
12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a base é (i) uma trialquilamina, um alcóxido de metal, um alquil metal, um aril metal, um hidreto de metal, uma amida de metal ou uma amida à base de silício; (ii) uma trialquilamina; ou (iii) diisopropiletilamina.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a base é diisopropiletilamina.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 13, caracterizado pelo fato de que o agente de secagem é (i) uma peneira molecular, sulfato de sódio, sulfato de cálcio, cloreto de cálcio ou sulfato de magnésio; ou (ii) uma peneira molecular; e/ou está na forma de pérolas ou pós granulares.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o agente de secagem é sulfato de sódio.

16. Método de preparo de um composto representado pela seguinte Fórmula:

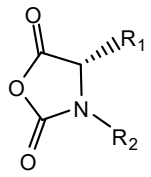


(Ia),

em que R_1 é metila; e R_2 é metila,

o método sendo caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) reação de maitansinol com um N-carboxianidrido em uma mistura de reação que compreende adicionalmente uma base e um agente de secagem, em que o N-carboxianidrido é representado pela seguinte Fórmula:



(IIa)

formando assim o composto de Fórmula (Ia); e

(b) reação de N-carboxianidrido não reagido da mistura de reação na etapa (a) com um reagente nucleofílico, em que o reagente nucleofílico é água.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a mistura de reação na etapa (a) compreende ainda um ácido de Lewis.

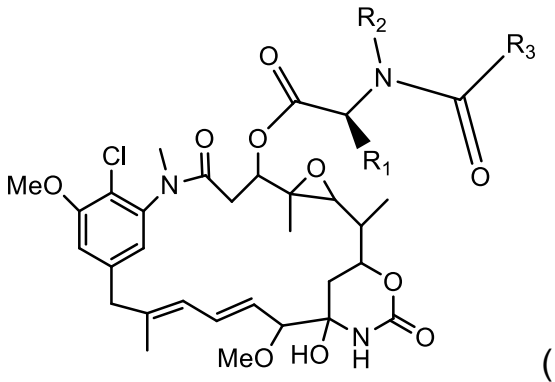
18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o ácido de Lewis é selecionado a partir do grupo que consiste em triflato de zinco, cloreto de zinco, brometo de magnésio, triflato de magnésio, triflato de cobre, brometo de cobre (II), cloreto de cobre (II) e cloreto de magnésio.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o ácido de Lewis é triflato de zinco.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 19, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda o contato da mistura de reação após a etapa(b) com uma solução aquosa contendo bicarbonato ou carbonato ou o contato da mistura de reação com um eliminador de metal.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 20, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de

reação do composto de fórmula (Ia) com um ácido carboxílico de fórmula R_3COOH na presença de um agente de condensação ou com um ácido carboxílico ativado de fórmula R_3COX, para formar um composto representado pela seguinte Fórmula:



(IIIa)

em que R_3 é um grupo alquil ou um grupo alquil substituído e X é um grupo de saída.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que:

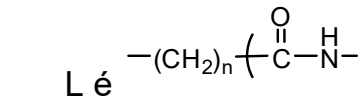
i) X é um haleto, um grupo alcoxi, um grupo ariloxi, um imidazol, –S-fenil opcionalmente substituído com nitro ou cloreto, ou –OCOR, em que R é um grupo alquil C1-C10 linear, um grupo alquil C1-C10 ramificado, um grupo alquil C3-C10 cíclico ou um grupo C1-C10 alquenil;

ii) -COX é um éster reativo;

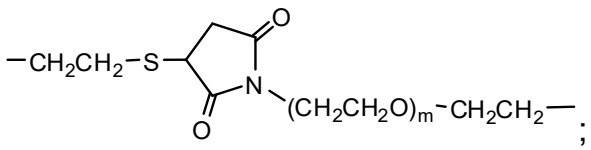
iii) R_3 é -Y – S-SR_4, em que Y é C1-C10 alquileno e R_4 é C1-C10 alquil, aril ou heteroaril;

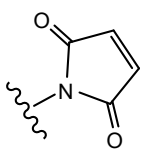
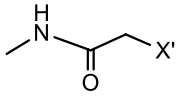
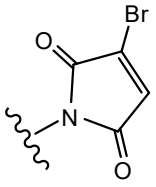
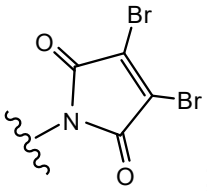
iv) R_3 é -Y – S-SR_4, em que Y é -CH_2CH_2- ou $CH_2CH_2C(CH_3)_2$- e R_4 é CH_3;

v) R_3 é –L-E;

L é  , ou

-$(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2NHC(=O)CH_2CH_2$- , ou



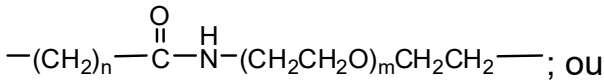
E é  ou  ou  ou  ;

X 'é um haleto;

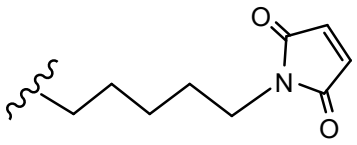
n é 2, 3, 4, 5 ou 6;

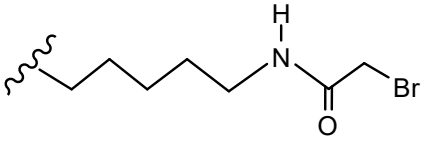
m é 0 ou um número inteiro de 1 a 20; e

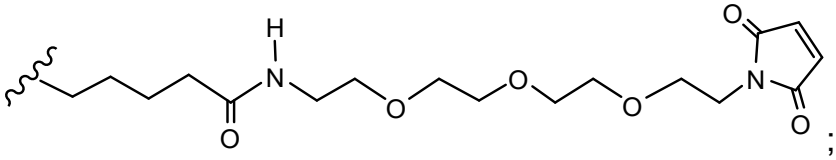
q é 0 ou 1, de preferência L é - $(CH_2)_n$ ou

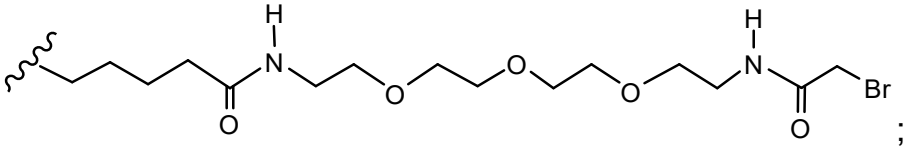
 ; ou

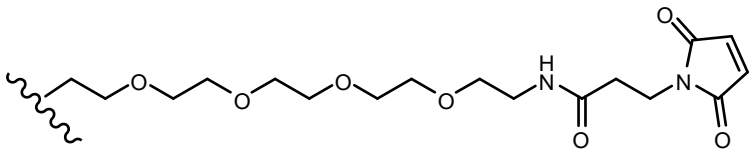
vi) R_3 é representado por um dos seguintes:

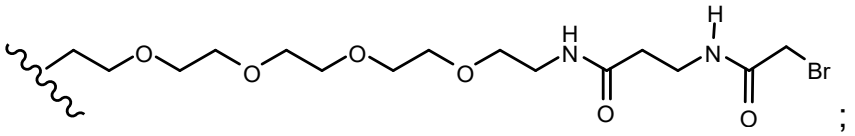
 ;

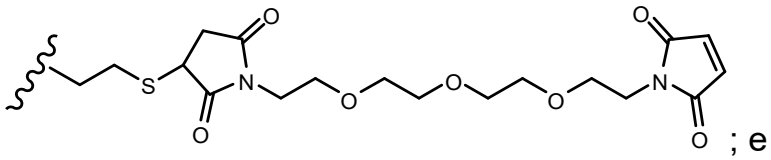
 ;

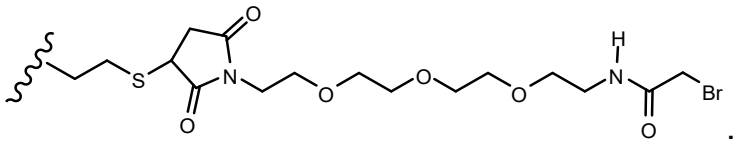
 ;

 ;


;

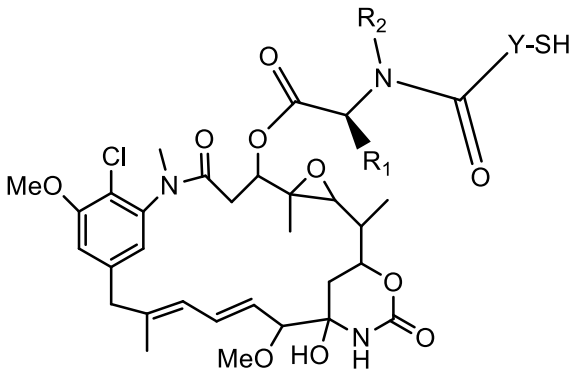

;


; e


.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que R_3 é -Y – S-SR_4, em que Y é -CH_2CH_2- ou $CH_2CH_2C(CH_3)_2$-; R_4 é CH_3; e -COX é um éster reativo selecionado do grupo que consiste em N-succinimidil, N-sulfosuccinimidil, N-ftalimidil, N sulfoftalimidil, 2-nitrofenil, 4-nitrofenil, 2,4-dinitrofenil, 3-sulfonil-4-nitrofenil e Éster 3-carboxi-4-nitrofenílico.

24. Método, de acordo com a reivindicação 22 ou 23, caracterizado pelo fato de que quando R_3 é -Y-S-SR_4, o método compreende ainda a reação do composto de fórmula (IIIa) com um agente redutor para formar um composto representado pela seguinte fórmula:


(Iva).

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações

21, 22 e 24, caracterizado pelo fato de que:

i) o agente de condensação é uma carbodiimida, um urônio, um éster ativo, um fosfônio, 2-alquil-1-alquilcarbonil-1,2-di-hidroquinolina, 2-alcoxi-1-alcoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina ou alquilcloroformato; ou

ii) o agente de condensação é uma carbodiimida; ou cloridrato de N- (3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o agente de condensação é cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 26, caracterizado pelo fato de que a base é (i) uma trialquilamina, um alcóxido de metal, um alquil metal, um aril metal, um hidreto de metal, uma amida de metal ou uma amida à base de silício; (ii) uma trialquilamina; ou (iii) diisopropiletilamina.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a base é diisopropiletilamina.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 28, caracterizado pelo fato de que o agente de secagem é (i) uma peneira molecular, sulfato de sódio, sulfato de cálcio, cloreto de cálcio ou sulfato de magnésio; ou (ii) uma peneira molecular; e/ou está na forma de esferas granulares ou pós.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o agente de secagem é sulfato de sódio.

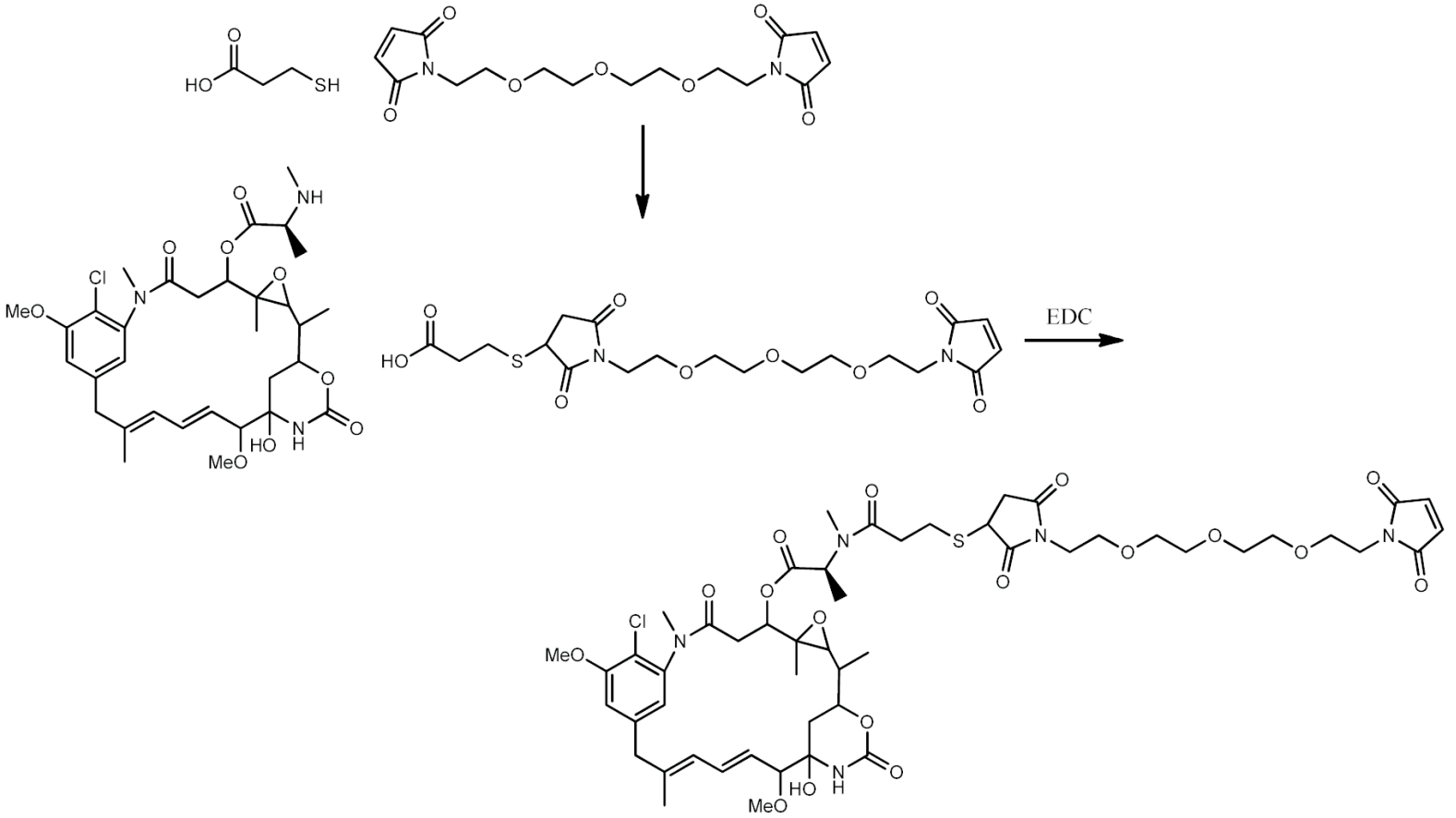


FIG. 1

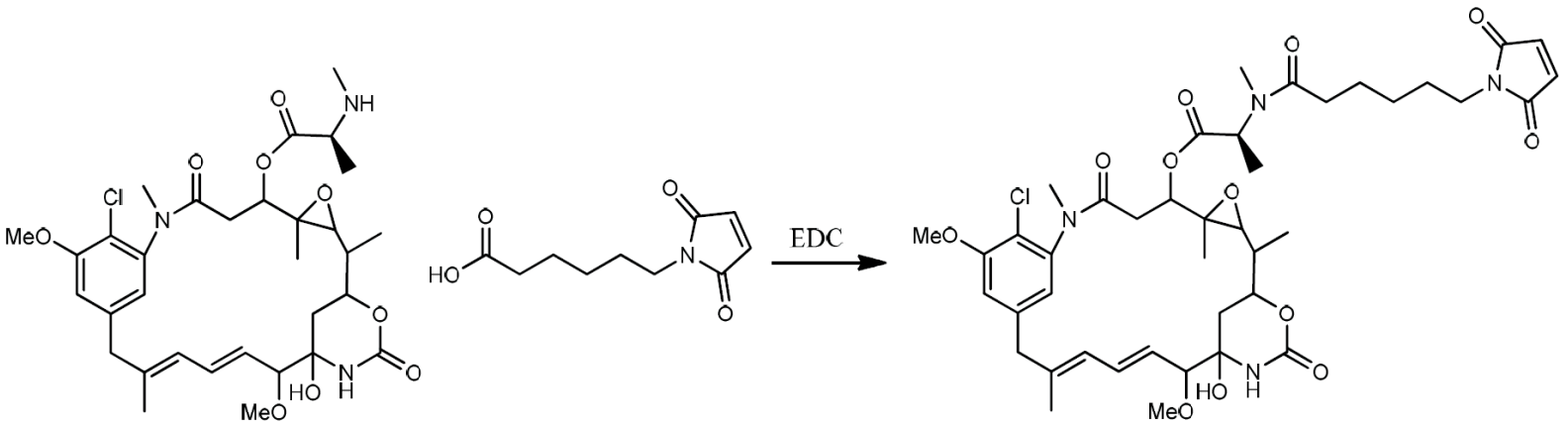


FIG. 2

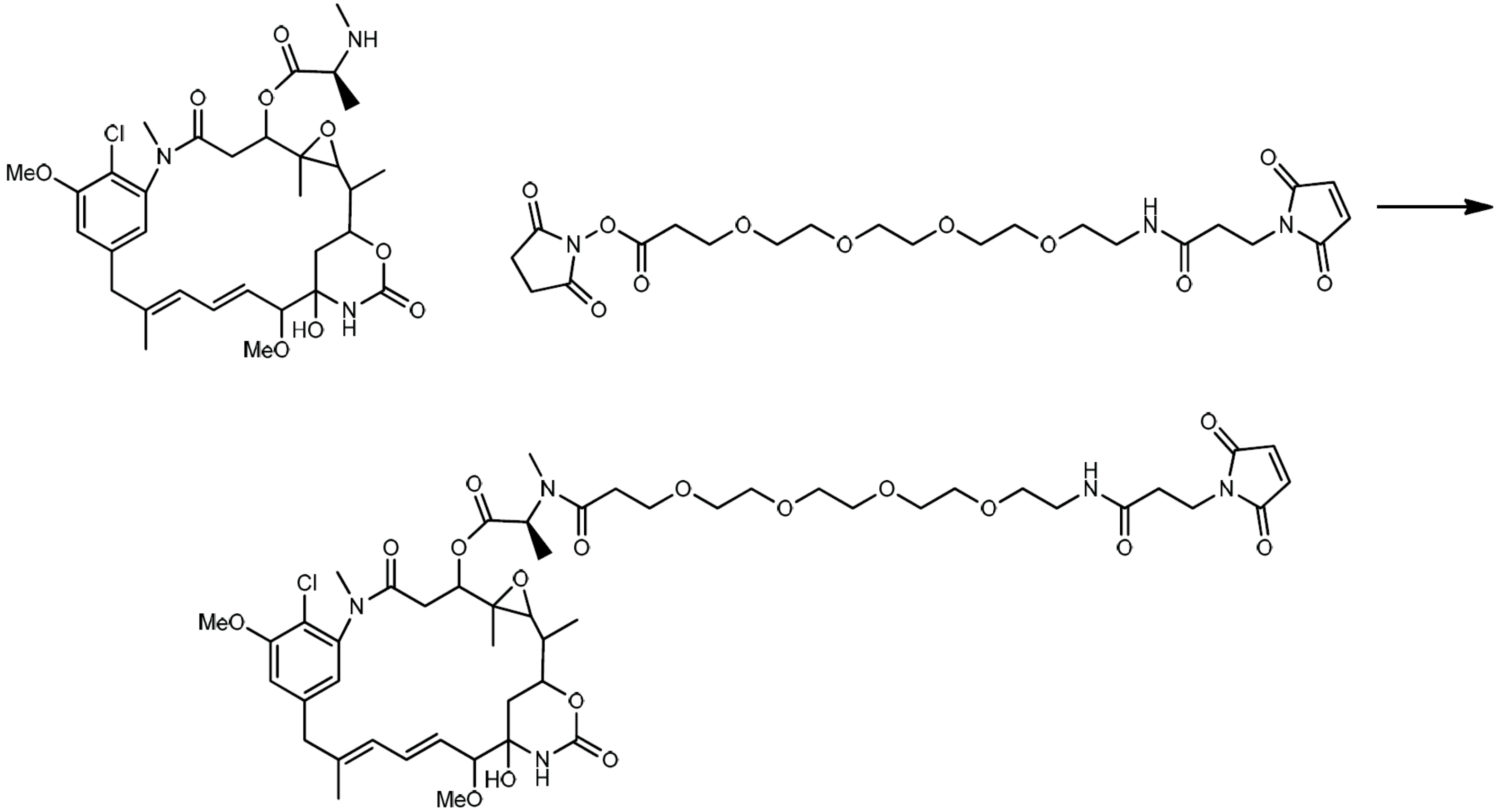


FIG. 3

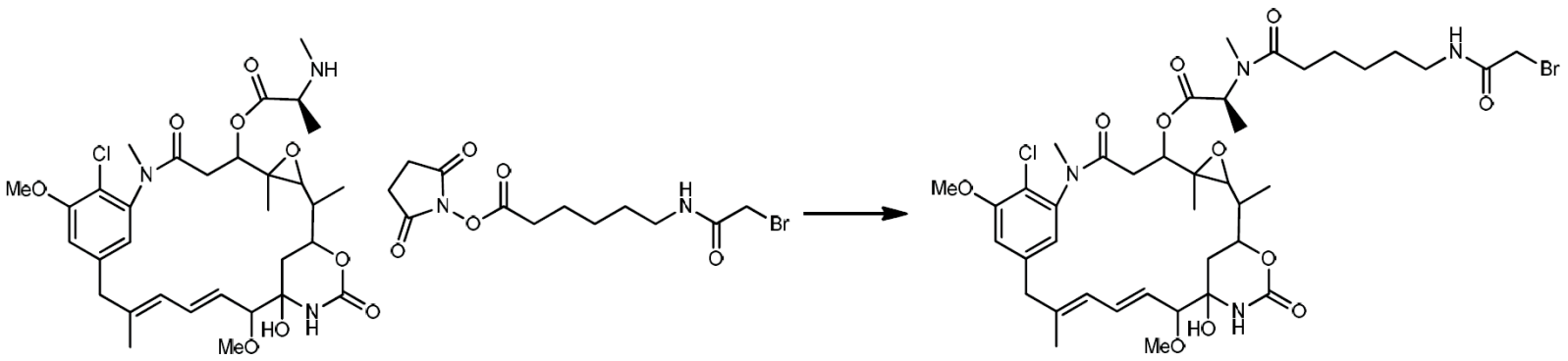


FIG. 4