

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-509094

(P2004-509094A)

(43) 公表日 平成16年3月25日(2004.3.25)

(51) Int.Cl.⁷

C07C 319/22

C07C 323/60

C07D 207/404

// C07M 7:00

F I

C07C 319/22

C07C 323/60

C07D 207/404

C07M 7:00

テーマコード (参考)

4C069

4H006

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 50 頁)

(21) 出願番号 特願2002-526755 (P2002-526755)
 (86) (22) 出願日 平成13年9月12日 (2001.9.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年3月12日 (2003.3.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/028443
 (87) 国際公開番号 W02002/022554
 (87) 国際公開日 平成14年3月21日 (2002.3.21)
 (31) 優先権主張番号 60/231,784
 (32) 優先日 平成12年9月12日 (2000.9.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591002957
 スミスクライン・ビーチャム・コーポレイ
 ション
 SMITHKLINE BEECHAM
 CORPORATION
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州1940
 6-0939、キング・オブ・プルシア、
 スウェードランド・ロード709番
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稔
 (74) 代理人 100086405
 弁理士 河宮 治
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 方法および中間体

(57) 【要約】

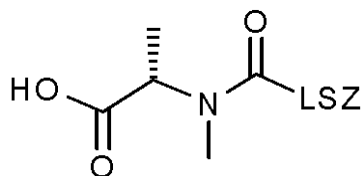
本発明は、N-メチルーL-アラニン誘導体の製法およびその製法における新規な中間体を提供する。該誘導体および中間体は細胞結合剤／メイタンシノイド複合体の調製に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I :

【化 1】



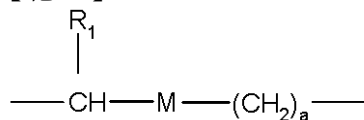
(I)

10

[式中、

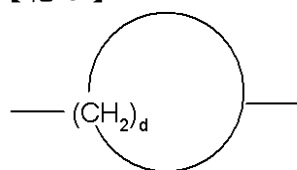
L は

【化 2】



または

【化 3】



20

(式中、

R₁ は H、メチルまたはエチルである；



M は直接結合、CH₂、—CH—、または—CH—である；

M が 1 個またはそれ以上の炭素原子である場合に a が 0 または 1 ないし 8 の整数であるとすると、M が直接結合である場合には a は 0 または 1 ないし 9 の整数である；

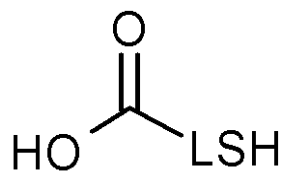
d は 3 ないし 8 の整数である）

であり；

Z は H または SR₂ であり、ここにおいて、R₂ は直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、アリール、置換アリールまたはヘテロサイクリックである」で示される化合物の製法であって：

(1) 式 I I :

【化 4】



(II)

40

(式中、L は前記定義の通りである)

のメルカプトアルカン酸の塩を、式 I I I :



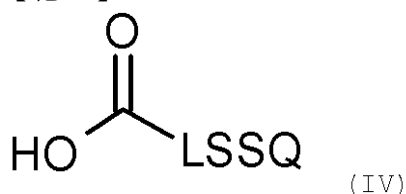
(式中、Q は H、直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、アリール、置換アリールまたはヘテロサイクリックである)

で示されるチオールスルホネートと、水中の式 I I の化合物の塩を水不混和性極性有機溶

50

媒中の式 I I I の化合物に添加して、式 I V :

【化 5】



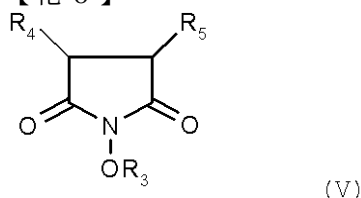
(式中、L および Q は前記定義の通りである)

で示される中間体を形成する、ジスルフィド形成反応において反応させ；

10

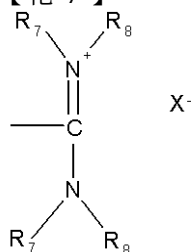
(2) 式 I V の化合物を、エステル化反応において、式 V :

【化 6】



[式中、R₃ は H または 式 :

【化 7】



20

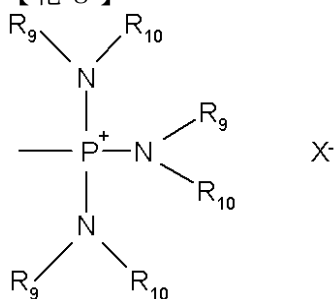
(式中、X⁻ は P F₆⁻ または B F₄⁻ であり、R₇ および R₈ は、独立して、アルキル、シクロアルキルまたは (C H₂)_e (ここで、e は 3 ないし 8 の整数である；ただし、R₇ が (C H₂)_e である場合、R₈ は直接結合である)

30

で示される置換ウロニウム塩、

または 式 :

【化 8】



40

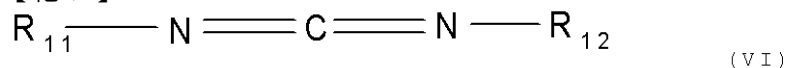
(式中、X⁻ は P F₆⁻ または B F₄⁻ であり、R₉ および R₁₀ は独立して直鎖アルキル、分岐アルキル、シクロアルキルまたはヘテロサイクリックである) で示される置換ホスホニウム塩であり；

R₄ および R₅ は、独立して、H、二重結合、直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、アリール、置換アリールまたはヘテロサイクリックである]

で示されるカップリング試薬と反応させる；

ただし、R₃ が H である場合、該反応は、式 V I :

【化 9】

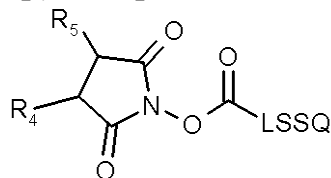


(式中、 R_{11} および R_{12} は、独立して、直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、アリール、置換アリールまたはヘテロサイクリックである)

で示されるカルボジイミド試薬の存在下で行われ、

さらに、 R_3 がウロニウムまたはホスホニウム塩であるとする、該反応は塩基の存在下で行われて、式 VII :

【化 10】



(VII)

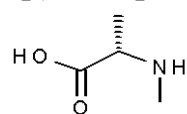
10

(式中、 R_4 、 R_5 、L および Q は前記定義の通りである)

で示される化合物を形成させ；および

(3) 式 VII の化合物を N-メチル-L-アラニン (式 VIII) :

【化 11】



(VIII)

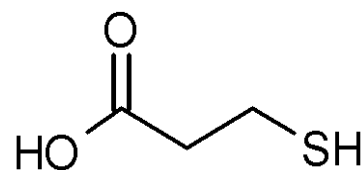
20

と反応させて、式 I の化合物を形成する工程を含む、方法。

【請求項 2】

式 I の化合物が構造式：

【化 12】



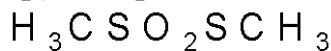
(IIa)

30

を有し；

式 III の化合物が構造式：

【化 13】

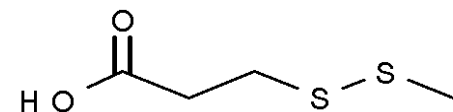


(IIIa)

を有し；

式 IV の化合物が構造式：

【化 14】



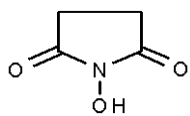
(IVa)

40

を有し；

式 V の化合物が構造式：

【化 1 5】

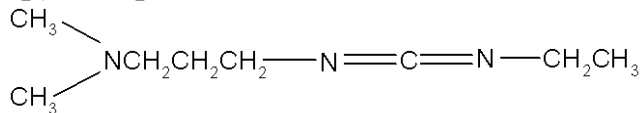


(Va)

を有し；

式 V I の化合物が構造式：

【化 1 6】



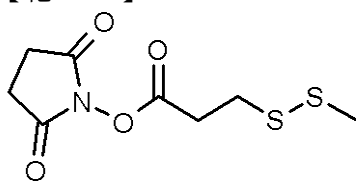
(VIa)

10

を有し；

式 V I I の化合物が構造式：

【化 1 7】



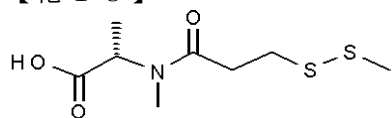
(VIIa)

20

を有し；

式 I の化合物が構造式：

【化 1 8】



(Ia)

を有するところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

30

式 V I のカルボジイミド試薬が 1 - [3 - (ジメチルアミノ) プロピル] - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (E D C I ・ H C l) またはジメチルアミノプロピルまたは 1 , 3 - ジシクロヘキシルカルボジイミド (D C C) であるところの、請求項 1 記載の方法。

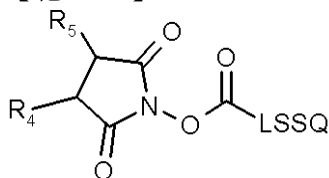
【請求項 4】

式 V I のカルボジイミド試薬が E D C I ・ H C l であるところの、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

式 V I I :

【化 1 9】



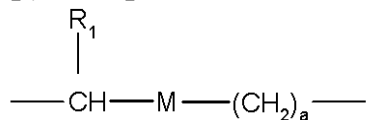
(VII)

40

[式中、 R₄ および R₅ は、独立して、 H、二重結合、直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、アリール、置換アリールまたはヘテロサイクリックである；

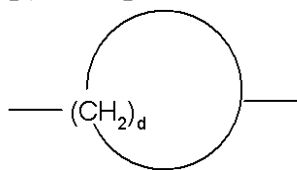
L は

【化 2 0】



または

【化 2 1】



10

(式中、 R_1 はH、メチルまたはエチルであり；Mは直接結合、 CH_2 、 ---CH--- 、または ---CH--- であり；Mが1個またはそれ以上の炭素原子である場合、 a が0または1ないし8の整数であるとすると、Mが直接結合である場合、 a は0または1ないし9の整数であり； d は3ないし8の整数である)

であり；

20

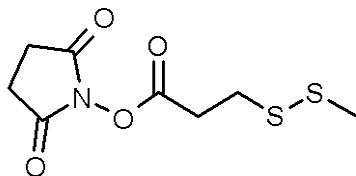
QはH、直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、単純または置換アリールまたはヘテロサイクリックである]

で示される化合物。

【請求項 6】

構造式：

【化 2 2】



(VIIa)

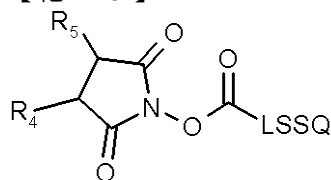
30

を有する請求項 5 記載の化合物。

【請求項 7】

式 V I I：

【化 2 3】



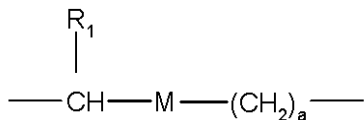
(VII)

40

[式中、 R_4 および R_5 は、独立して、H、二重結合、直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、アリール、置換アリールまたはヘテロサイクリックであり；

Lは

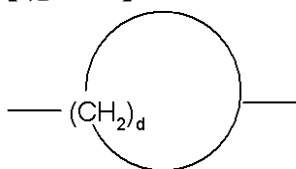
【化 2 4】



50

または

【化 2 5】



(式中、 R_1 はH、メチルまたはエチルであり；



Mは直接結合、 CH_2 、 $-\text{CH}-$ 、または $-\text{CH}-$ であり；

Mが1個またはそれ以上の炭素原子である場合、aが0または1ないし8の整数であるとすると、Mが直接結合である場合、aは0または1ないし9の整数である；

dは3ないし8の整数である)

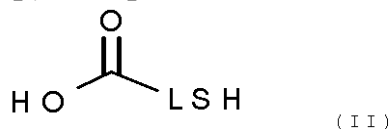
であり；

QはH、直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、単純または置換アリールまたはヘテロサイクリックである]

で示される化合物の製法であって、

(1) 式 I I :

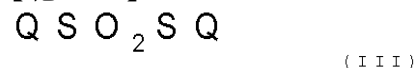
【化 2 6】



(式中、Lは前記定義の通りである)

で示されるメルカプトアルカン酸の塩を、式 I I I :

【化 2 7】



(式中、Qは前記定義の通りである)

で示されるチオールスルホネートと、水中の式 I I の化合物の塩を水不混和性極性有機溶媒中の式 I I I の化合物に添加して、式 I V :

【化 2 8】

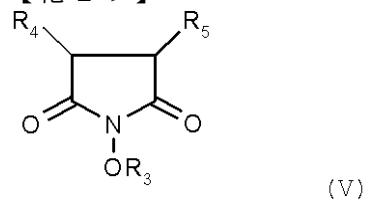


(式中、LおよびQは前記定義の通りである)

で示される中間体を形成させる、ジスルフィド形成反応において反応させ、および

(2) 式 I V の化合物を、エステル化反応において、式 V :

【化 2 9】



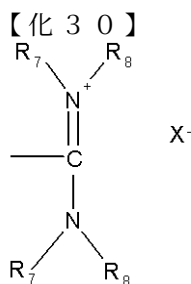
[式中、 R_3 はHまたは式：

10

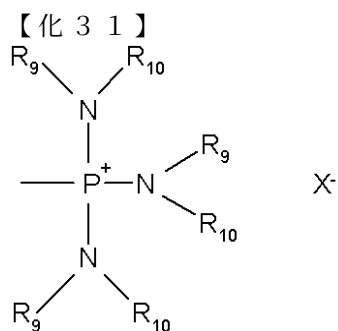
20

30

40



(式中、 X^- は PF_6^- または BF_4^- であり、 R_7 および R_8 は、独立して、アルキル、シクロアルキルまたは $(\text{CH}_2)_e$ (ここで、 e は 3 ないし 8 の整数である；ただし、 R_7 が $(\text{CH}_2)_e$ である場合、 R_8 は直接結合である)) 10
で示される置換ウロニウム塩、または式：



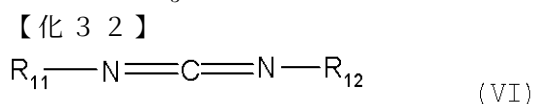
(式中、 X^- は PF_6^- または BF_4^- であり、 R_9 および R_{10} は、独立して、直鎖アルキル、分岐アルキル、シクロアルキルまたはヘテロサイクリックである) 20

で示される置換ホスホニウム塩である；

R_4 および R_5 は前記定義の通りである]

で示されるカップリング試薬と反応させる；

ただし、 R_3 が H である場合、該反応は式 V I：



(式中、 R_{11} および R_{12} は、独立して、直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、アリール、置換アリールまたはヘテロサイクリックである) 30

で示されるカルボジイミド試薬の存在下で行われ；

さらに、 R_3 がウロニウムまたはホスホニウム塩であるとする、該反応は塩基の存在下で行われ、式 V I I の化合物を形成する)

工程を含む、方法。

【請求項 8】

請求項 1 において開示した構造を有する式 V I I の化合物を N-メチル-L-アラニンと反応させて式 I の化合物を形成することを含む、請求項 1 において開示する構造を有する式 I の化合物の製造方法。 40

【請求項 9】

請求項 8 記載の方法により調製される式 I の化合物。

【請求項 10】

請求項 5 において開示した構造を有する式 V I I の化合物を細胞結合剤/メイタンシノイド複合体に変換することにより調製される細胞結合剤/メイタンシノイド複合体。

【請求項 11】

以下の工程：

(1) 請求項 1 または請求項 8 記載の方法により調製された式 I の化合物でメイタンシノールをエステル化して、ジスルフィド含有メイタンシノイドエステルを形成する工程；

(2) 工程 (1) により調製されたジスルフィド含有メイタンシノイドエステルをチオー 50

ル含有メイタンシノイドに還元する工程；

(3) ジチオピリジル基を細胞結合剤に導入する工程；

(4) 工程(2)により製造されたチオール含有メタイノイドを工程(3)のジチオピリジル細胞結合剤とジスルフィド結合により結合させる工程

を含む方法により調製される細胞結合剤／メイタンシノイド複合体。

【請求項12】

細胞結合剤が抗体である請求項10または11記載の細胞結合剤／メイタンシノイド複合体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

(発明の分野)

本発明は、N-メチル-L-アラニン誘導体の製造法および新規プロセス中間体に関する。

【0002】

(背景技術)

N-メチル-L-アラニン誘導体をジチオアルカン酸中間体およびN-メチル-L-アラニンから調製する方法は、米国特許第5208020号に記載されている。該化合物は細胞毒性メイタンシノイド(maytansinoid)を細胞結合剤、例えば抗体と結合させるために有用である。抗体／メイタンシノイド複合体は腫瘍活性化プロドラッグとして有用である。

20

例えば、N-メチル-N-(3-メチルジチオプロパノイル)-L-アラニンの多段合成法が開示されている。まず、メチルメタンチオスルホネートのエタノール中溶液を3-メルカプトプロパン酸の水中溶液に添加することにより3-メチルジチオプロパン酸を調製した。抽出し、洗浄し、濃縮した後、3-メチルジチオプロパン酸を蒸留により単離した。イソブチルクロロホルメートおよびトリエチルアミンを、THF中3-メチルジチオプロパン酸に添加して、中間体として対応する混合無水物を形成した。その後、N-メチル-L-アラニンとトリエチルアミンの水中混合物を添加した。抽出、濃縮、およびクロマトグラフィー後、34%の収率のN-メチル-N-(3-メチルジチオプロパノイル)-L-アラニンを得た。

【0003】

30

従来技術の方法の主な欠点は、所望の反応生成物から副生成物を除去するために2つのクロマトグラフィー工程が必要であることである。さらに、イソブチルクロロホルメートを反応スキームにおいて用いると、ラセミ化が起こり、このために望ましくないD-エナンチオマーを含む最終生成物が生じる。かくして、当該分野において、中間体がさらに安定であり、その結果、望ましくない副生成物が少なくなる、N-メチル-L-アラニン誘導体を>95%エナンチオマー過剰(ee)の光学純度で調製する改良法が必要とされている。

【0004】

本発明の一の態様は、N-メチル-L-アラニン誘導体の調製法である。

本発明のもう一つの態様は、N-メチル-L-アラニン誘導体の調製に有用な新規中間体である。

40

本発明のもう一つの態様は、本発明の新規中間体の調製法である。

本発明のさらにもう一つの態様は、N-メチル-L-アラニン誘導体から調製される細胞結合剤／メイタンシノイド複合体または本発明の方法により調製される新規中間体である。

本明細書において記載する特許および特許出願を含むが、これらに限定されないすべての刊行物は、全体を記載しているかのように本発明の一部として参照される。

本明細書および請求の範囲において用いられる「カップリング試薬」なる用語は、採用した反応条件下での加水分解に対して安定であり、N-メチル-L-アラニンと反応させた場合に>95% eeの光学純度で式Iの化合物を産生するメチルジチオプロピオン酸また

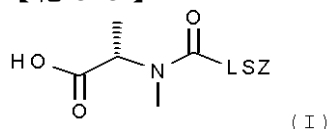
50

はその相同体の活性化誘導体を形成できる化合物を意味する。

【0005】

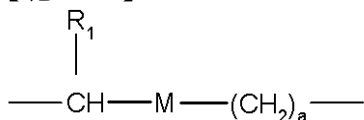
本発明は、式 I :

【化 3 3】



[式中、L は :

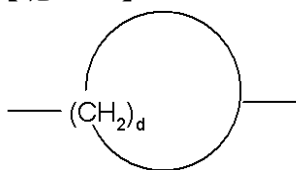
【化 3 4】



10

または

【化 3 5】



20

(式中、R₁ は H、メチルまたはエチルである ;



M は直接結合、CH₂、—CH—、または —CH— である ;

M が 1 以上の炭素原子である場合に a が 0 または 1 ないし 8 の整数であるとする、M が直接結合である場合には a は 0 または 1 ないし 9 の整数である ;

d は 3 ないし 8 の整数である) ;

Z は H または SR₂ であり、ここにおいて、R₂ は直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、アリール、置換アリールまたはヘテロサイクリックである」の化合物の調製法を

30

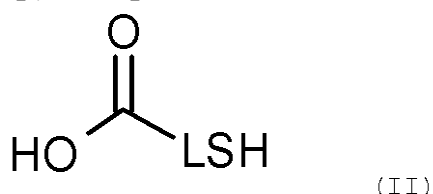
【0006】

本発明は、本発明の方法において有用である新規中間体も提供する。

本発明は、本発明の方法により製造される抗体／メイタンシノイド複合体も提供する。

本発明の方法は、式 I I :

【化 3 6】

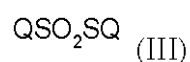


40

(式中、L は前記定義の通りである)

のメルカプトアルカン酸の塩および式 I I I :

【化 3 7】



(式中、Q は H、直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、アリール、置換アリールまたはヘテロサイクリックである)

のチオールスルホネートをジスルフィド形成反応において反応させる工程 [ここにおいて

50

、水中式 I I の化合物の塩を水不混和性極性有機溶媒中の式 I I I の化合物に添加して、式 I V :

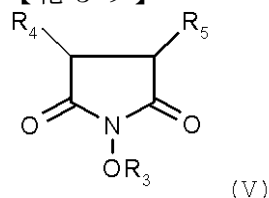
【化 3 8】



(式中、LおよびQは前記定義の通りである)
の中間体を形成する] ; および
式 I V の化合物をエステル化反応において式 V :

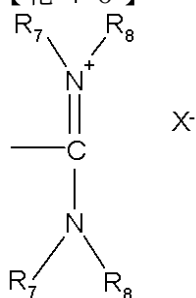
10

【化 3 9】



[式中、R₃ はHまたは式 :

【化 4 0】

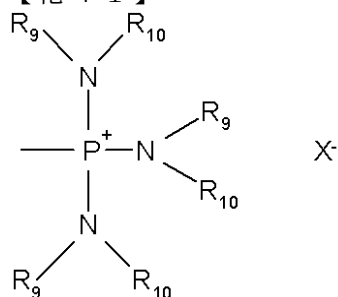


20

(式中、X⁻はPF₆⁻またはBF₄⁻であり、R₇およびR₈は独立して直鎖アルキル、分岐アルキル、シクロアルキルまたは(CH₂)_e。(式中、R₇が(CH₂)_eである場合、R₈が直接結合であるとする、eは3ないし8の整数である)の置換ウロニウム塩、または式 :

30

【化 4 1】



40

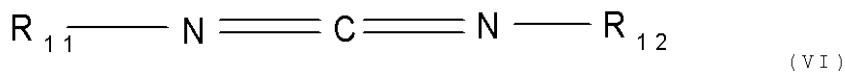
(式中、X⁻はPF₆⁻またはBF₄⁻であり、R₉およびR₁₀は独立して直鎖アルキル、分岐アルキル、シクロアルキルまたはヘテロサイクリックである)の置換ホスホニウム塩である ;

R₄およびR₅は独立して、H、二重結合、直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、アリアル、置換アリアルまたはヘテロサイクリックである]のカップリング試薬と反応させる工程を含む。

【0007】

もし、R₃がHであるならば、反応は、式 V I :

【化 4 2】

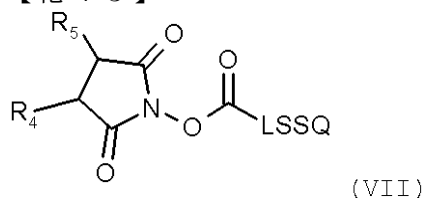


(式中、 R_{11} および R_{12} は独立して直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、アリール、置換アリールまたはヘテロサイクリックである) の存在下で行われる。好ましくは、式 V I のカルボジイミド試薬は、1 - [3 - (ジメチルアミノ) プロピル] - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (E D C I · H C l) (式中、 R_{11} はエチルであり、 R_{12} はジメチルアミノプロピルである) または 1, 3 - ジシクロヘキシルカルボジイミド (D C C) (式中、 R_{11} および R_{12} はシクロヘキシルである) である。特に好ましいのは、E D C I · H C l である。

別法として、 R_3 がウロニウムまたはホスホニウム塩であるならば、反応は塩基、好ましくは、トリエチルアミンまたはジイソプロピルエチルアミンの存在下で行われる。 10

これらの反応は、式 V I I :

【化 4 3】



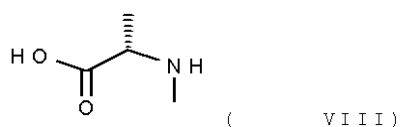
(式中、 R_4 、 R_5 、L および Q は前記定義の通りである) の化合物を形成する。 20

【0 0 0 8】

式 V I I の化合物は、活性化エステルであり、本発明の方法の新規中間体であり、採用された反応条件下での加水分解に対して安定であり、N - メチルーアラニンとラセミ化のないカップリングができる。好ましくは、該化合物は結晶性である。

式 V I I の化合物を次いで N - メチルー L - アラニン (式 V I I I) :

【化 4 4】



30

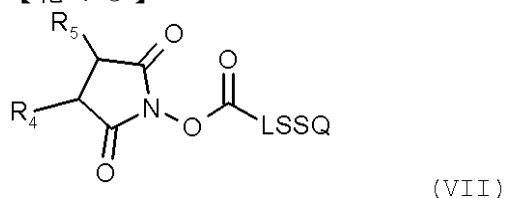
と反応させて、式 I の化合物を形成する。

さらに、本発明は式 I の化合物の調製法であって、式 V I I の化合物を N - メチルー L - アラニンと反応させて式 I の化合物を形成することを含む式 I の化合物の調製法ならびに該方法により調製される式 I の化合物を包含する。

【0 0 0 9】

本発明は、式 V I I :

【化 4 5】



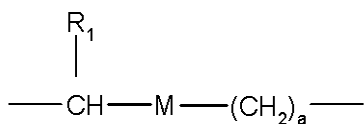
40

[式中、

R_4 および R_5 は独立して、H、二重結合、直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、アリール、置換アリールまたはヘテロサイクリックである；

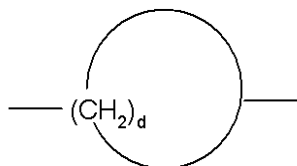
L は

【化 4 6】



または

【化 4 7】



10

(式中、

R_1 は H、メチルまたはエチルである；



M は直接結合、 CH_2 、 ---CH--- 、または ---CH--- である；

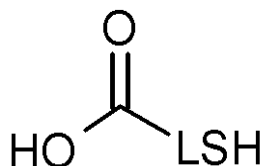
M が 1 以上の炭素原子である場合に a が 0 または 1 ないし 8 の整数であるとする、M が直接結合である場合には a は 0 または 1 ないし 9 の整数である；

d は 3 ないし 8 の整数である)；

Q は H、直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、単純または置換アリールまたはヘテロサイクリックである」の化合物の調製法であって： 20

式 I I：

【化 4 8】



(II)

30

(式中、L は前記定義の通りである)

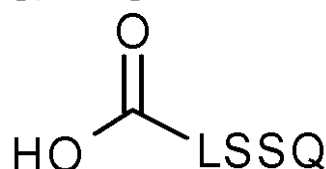
のメルカプトアルカン酸の塩と式 I I I：



(式中、Q は前記定義の通りである)

のチオールスルホネートをジスルフィド形成反応において反応させ(ここにおいて、水中式 I I の化合物の塩を水混和性極性有機溶媒中式 I I I の化合物に添加する)、式 I V

【化 4 9】



(IV)

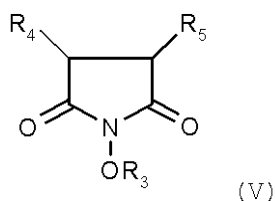
40

(式中、L および Q は前記定義の通りである)

の中間体を形成する工程；および

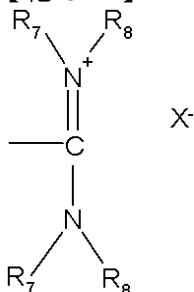
式 I V の化合物をエステル化反応において式 V：

【化 5 0】



[式中、 R_3 はHまたは式：

【化51】



10

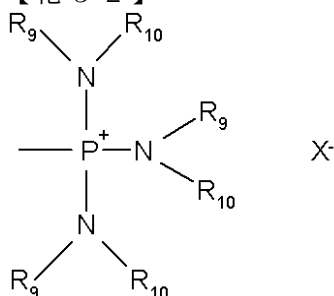
(式中、 X^- は PF_6^- または BF_4^- であり、 R_7 および R_8 は独立して、アルキル、シクロアルキルまたは $(CH_2)_e$ 。(式中、 R_7 が $(CH_2)_e$ である場合、 R_8 は直接結合であるとする、 e は3ないし8の整数である)

の置換ウロニウム塩

20

または式

【化52】



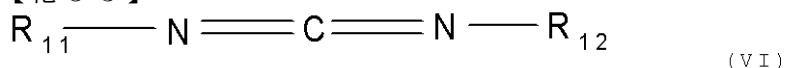
30

(式中、 X^- は PF_6^- または BF_4^- であり、 R_9 および R_{10} は独立して直鎖アルキル、分岐アルキル、シクロアルキルまたはヘテロサイクリックである) の置換ホスホニウム塩である；

R_4 および R_5 は前記定義の通りである] のカップリング試薬と反応させて式VIIの化合物を形成する工程を含む方法も包含し、

ここに、 R_3 がHである場合、反応は式VI：

【化53】



(式中、 R_{11} および R_{12} は独立して直鎖アルキル、分岐アルキル、環状アルキル、アリール、置換アリールまたはヘテロサイクリックである) のカルボジイミド試薬の存在下で行われ；

40

さらに、 R_3 がウロニウムまたはホスホニウム塩であるならば、反応は塩基の存在下で行われるとする。

【0010】

直鎖アルキルの例としては、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチルおよびヘキシルが挙げられる。分岐アルキルの例としては、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、イソペンチルおよび1-エチルプロピルが挙げられる。環状アルキルの例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチルおよびシクロヘキシルが挙げられる。

50

アリールの例としては、フェニルおよびナフチルが挙げられる。置換アリールの例としては、アルキル、ハロゲン（例えば、塩素、臭素およびヨウ素）、ニトロ、アミノ、スルホン酸、カルボン酸、ヒドロキシおよびアルコキシで置換されたアリールが挙げられる。複素原子は、O、NおよびSから選択される。ヘテロサイクリックの例としては、ピロリル、ピリジル、フリルおよびチオフエンが挙げられる。

式 I I の化合物およびその塩は、容易に入手可能な出発物質、例えば、米国特許第 5 2 0 8 0 2 0 号に記載されているものから公知方法により調製できる。

式 I I I の化合物、例えば、メチルメタンチオールスルホネートおよび S-フェニルベンゼンチオールスルホネートは化学会社、例えば、Aldrich Chemical Co.（ミルウォーキー、WI）から購入できるか、または公知ジスルフィド酸化法、例えば、Xiaら、Synth. Commun. 27, 1301-1308（1997）および Pinnickら、J. Org. Chem. 45, 930-932（1980）に記載されている方法により、容易に入手可能な出発物質から調製できる（ただし、Qは本発明の方法を無効にする部分を含まないとする）。 10

【0011】

式 V の化合物の例は：

N-ヒドロキシスクシンイミド（Va）；

O-（N-スクシンイミジル）-1, 1, 3, 3-ビス（テトラメチレン）ウロニウムテトラフルオロボレートまたはその対応するヘキサフルオロホスフェート（Vb）；

O-（N-スクシンイミジル）-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレートまたはその対応するヘキサフルオロホスフェート（Vc）； 20

N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボン酸イミド（Vd）；

O-（5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド）-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート（Ve）；

O-（5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド）-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート誘導体（Vf）；

N-ヒドロキシフタルイミド（Vg）；

1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート N-ヒドロキシフタルイミド（Vh）；

1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート N-ヒドロキシフタルイミド（Vi）； 30

N, N, N', N'-ビス（ペンタメチレン）ウロニウムテトラフルオロボレート N-ヒドロキシフタルイミド（Vj）；

N, N, N', N'-ビス（ペンタメチレン）ウロニウムヘキサフルオロホスフェート N-ヒドロキシフタルイミド（Vk）；

N, N, N', N'-ビス（テトラメチレン）ウロニウムテトラフルオロボレート N-ヒドロキシフタルイミド（Vl）；

N, N, N', N'-ビス（テトラメチレン）ウロニウムヘキサフルオロホスフェート N-ヒドロキシフタルイミド（Vm）；

N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート（Vn）； 40

N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（Vo）；

トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムテトラフルオロボレート（Vp）；

トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（Vq）；

トリピロリジノホスホニウムテトラフルオロボレート（Vr）；

トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（Vs）；

3-ジメチルイミダゾリジニウムテトラフルオロボレート（Vt）；および

1, 3-ジメチルイミダゾリジニウムヘキサフルオロホスフェート（Vu）である。

【0012】

式 V の化合物は化学会社、例えば、Fluka Chemical Corp.（ミルウォーキー、WI）から購入できるか、または容易に入手可能な出発物質から公知方法によ 50

り調製できる。例えば、式Vの化合物は、Knorrら、Tetrahedron Lett. 30, 1927-1930 (1989)の方法により調製できる。

式VIの化合物は、化学会社、例えば、Aldrich Chemical Co. (セントルイス、MO)から購入できるか、または容易に入手可能な出発物質から公知方法により調製できる。

式VIIIの化合物(N-メチル-L-アラニン)はBACHEM Bioscience Inc. (キング・オブ・プロシア、PA)から購入できる。

式IIの化合物を式IVの化合物に変換するための反応は、式IIの化合物の塩の水性溶液を、水混和性極性有機溶媒中式IIIの化合物に、好ましくは -5°C より低い温度範囲で添加することにより行われる。最も好ましくは、式IIの化合物のナトリウム塩の水性溶液を、式IIIの化合物のテトラヒドロフラン中溶液に、約 -15°C ないし約 -5°C の温度範囲でゆっくりと添加する。特に好ましい温度範囲は、約 -10°C ないし約 -5°C である。

10

【0013】

好ましくは、式IVの化合物を式VIIの活性化エステルに変換する反応は、式Vの R_3 がHである場合、カルボジイミドの存在下で、約 0°C ないし約 20°C 、好ましくは約 0°C ないし約 12°C の温度範囲で、溶媒、例えば塩化メチレン中で行われる。式Vの R_3 がウロニウムまたはホスホニウム塩である場合、反応は塩基、好ましくはトリエチルアミンまたはジイソプロピルエチルアミンの存在下で行われる。

好ましくは、式VIIの化合物を式Iの化合物に変換する反応は、周囲温度で、極性溶媒、例えば、水性エタノール/トリエチルアミン中で行われる。

20

本発明において用いられる試薬、条件および中間体は、所望の式Iの化合物を高収率で提供し、該方法は工業規模の利用に適当である。さらに、本発明の方法は、米国特許第5208020号に開示されている方法よりも優れた他の利点を有する。特に、本発明の方法は、チオプロピオン酸の対称ジスルフィドまたはその相同体の望ましくない副生成物を形成することなく式IIの化合物を式IVの化合物に変換する。従って、式IVの化合物の単離工程は必要でなく、式IIの化合物を単離できる式VIIの新規中間体に変換するためにワンポットプロセスを用いることができる。別法として、式VIIの中間体を単離せず、式IIの化合物を式Iの化合物に変換するためにワンポットプロセスを用いることができる。

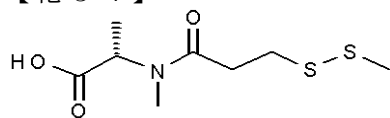
30

【0014】

さらに、本発明の方法は、式VIIの活性化エステルを提供し、これは結晶性であり、加水分解に対して安定である。従って、N-メチル-L-アラニンの式VIIの化合物との反応により調製される式Iの化合物は実質的に光学的に純粋なL-異性体である。

最も好ましくは、本発明の方法は、N-メチル-N-(3-メチルジチオプロパノイル)-L-アラニンである式Ia:

【化54】



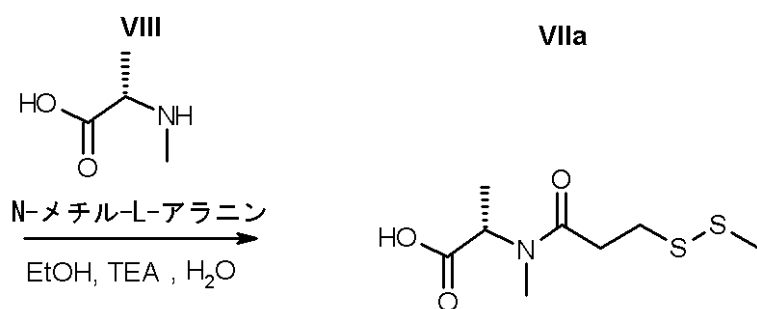
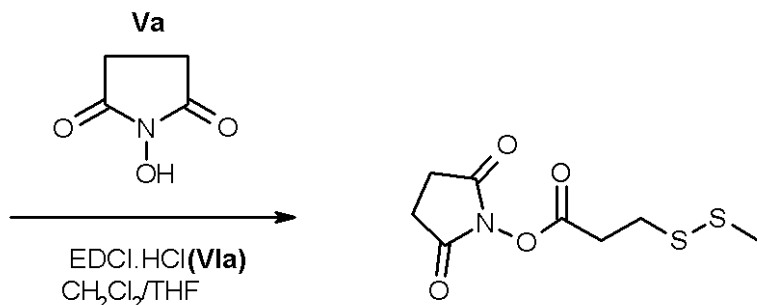
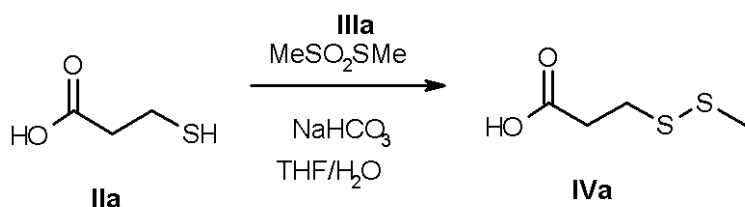
(Ia)

40

の化合物を調製するために用いられる。

好ましい方法を以下に概略的に示す。

【化55】



10

20

30

【0015】

本発明の方法は、腫瘍活性化プロドラッグとして有用な細胞結合剤／メイタンシノイド複合体を調製するために用いることができる。式V I Iの化合物は、細胞結合剤／メイタンシノイド複合体に変換することができる。さらに、本発明の方法により調製される式Iの化合物は、メイタンシノイド誘導体を含むN-メチル-L-アラニンを製造するために米国特許第5208020号において記載されているようにして用いられる。これらの誘導体を次いで細胞結合剤、好ましくは抗体と、様々なリンカーにより結合させる。好ましくは、結合はジスルフィド結合である。

細胞結合剤／メイタンシノイド複合体の一例は、次の工程：

- (1) メイタンシノールを本発明の方法により調製した式Iの化合物でエステル化して、ジスルフィド含有メイタンシノイドエステルを形成し；
- (2) 工程(1)により調製したジスルフィド含有メイタンシノイドエステルをチオール含有メイタンシノイドに還元し；
- (3) 細胞結合剤中にジチオピリジル基を導入し；
- (4) 工程(2)により製造されたチオール含有メイタンシノイドを工程(3)のジチオピリジル細胞結合剤とジスルフィド結合により結合させる工程を含む方法により調製できる。

【0016】

本発明を次の具体的な、非制限的实施例を参照して記載する。

実施例

50

N-メチル-N-(3-メチルジチオプロパノイル)-L-アラニン (Ia) の調製
本発明において使用するすべての試薬はまず以下に記載するようにして入手した。

工程1: メチルジチオプロピオン酸 (IVa) の調製

オーバーヘッドスターラーおよび温度計を備えた3 Lの三口丸底フラスコに、3-メルカプトプロピオン酸 (416.6 g、3.93モル、1当量、Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) および水 (HPLCグレード、1.36 L、1.36 kg、Burdick & Jackson, Muskegon, MI) を入れた。固体重炭酸ナトリウム (362.5 g、4.31モル、1.1当量、Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ) を、二酸化炭素の発生による発泡を制御する速度で添加した。添加は吸熱反応で、1時間かかり、温度が20℃から10℃に降下した。オーバーヘッドスター、2 L滴下漏斗、温度計、および窒素インレットを備えた12 L三口丸底フラスコに、メチルメタンチオールスルホネート (540.0 g、441.5 mL、4.28モル、1.09当量、Aldrich Chemical Co.) およびテトラヒドロフラン (3.25 L、2.89 kg、Burdick & Jackson) を入れ、溶液をエチレングリコール/ドライアイス浴で-8℃~-10℃に冷却し、窒素雰囲気下においた。調製されたメルカプトプロピオン酸ナトリウムの水性溶液を滴下漏斗に移し、反応温度を-5℃以下に維持する速度で反応混合物に添加した。この規模で、添加は2時間かかり、温度範囲は-10~-5℃であった。攪拌を同じ温度範囲で続け、15分後、HPLC中間制御分析により、3-メルカプトプロピオン酸が消失したことが証明された。40分間攪拌後、水性塩酸 (3 N、500 mL、EM Science, Gibbstown, NJ) を、pHがColorpHast試験紙により3.0~3.5 (pH0~6の範囲) を示すまで反応混合物に添加した。反応混合物を6 L分液漏斗に移し、10分間分離させ、上部有機相を単離した。水性相を12 L反応フラスコに戻し、塩化メチレン (1.6 L、2.18 kg、J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) を添加した。10分間攪拌後、相を6 L分液漏斗に移し、底部有機層を分離した。有機相を合し、オーバーヘッドスターラーを備えた12 L三口フラスコに移した。硫酸マグネシウム (1.33 kg) を添加し、0.5時間攪拌した後、プフナー漏斗を通して混合物を濾過した。固体残留物を塩化メチレン (1.6 L、2.18 kg) でリンスした。合した濾液とリンス液のカル・フィッシャー分析により、0.35%の水成分であることが判明した。濾液を一夜15℃で貯蔵した。濾液の中間HPLC不純物特性から、97% (面積) メチルジチオプロピオン酸であることが判明し、3-メルカプトプロピオン酸の対称ジスルフィドは存在しなかった。

10

20

30

50

【0017】

工程2: スクシンイミジル-3-メチルジチオプロピオネート (VIIa) の調製
メチルジチオプロピオン酸濾液を22 L三口丸底フラスコに移し、氷-塩浴で0℃に冷却した。1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (1.28 kg、6.68モル、1.7当量、Aldrich Chemical Co.) を40分間かけて、パウダー漏斗 (powder funnel) をとおして添加し、温度が10℃に上昇するのが観察された。N-ヒドロキシスクシンイミド (525 g、4.56モル、1.16当量、Aldrich Chemical Co.) を漏斗から8分かけて添加し、2℃の温度上昇が観察された。1時間、8ないし10℃で攪拌した後、中間HPLC分析により、スクシンイミジル-3-メチルジチオプロピオネートへの転化率は66.7%であり; 2時間後、分析により、98.4%の転化率であることが示された。2.5時間後、反応を停止させ、反応混合物を水流吸引圧力下で濃縮した。結果として得られたシロップを清浄な22 L三口丸底フラスコに移し、混合物を激しく攪拌しながら水 (8.3 L、8.3 kg、Burdick & Jackson) を添加した。周囲温度で0.5時間攪拌後、ガラス漏斗を用いて形成された白色固体を濾過した。1201 gのウェットケーキを水 (2.1 L、2.1 kg、Burdick & Jackson) で洗浄し、94時間、20ないし25℃、約2 torrで、GMP真空オーブン中、一定重量まで乾燥させた。乾燥により、927 gの生成物スクシンイミジル-3-メチルジチオプロ

ピオネート（94.7%、粗収率）を白色固体として得、HPLC不純物特性は、94.6%（面積）を示し、NMRスペクトルは常用標準と同じであった。

C、H、N分析：計算値：C 38.54；H 4.45；N 5.62；S 25.67
測定値：C 38.20；H 4.48；N 5.58；S 25.44

^{13}C NMR（75MHz、 CDCl_3 ）： δ 169.0、167.1、31.5、31.1、25.6、23.2

【0018】

工程3： N-メチル-N-（3-メチルジチオプロパノイル）-L-アラニン（Ia）の調製

オーバーヘッドスターラー、2L滴下漏斗、温度計および窒素インレットを備えた22L丸底三口フラスコに、スクシンイミジル-3-メチルジチオプロピオネート（920g、3.69モル、1当量）およびエタノール（200プルーフ、11.0L、8.69kg、Aaper, Shelbyville, KY）を入れた。N-メチル-L-アラニン（496.8g、4.82モル、1.3当量、BACHEM Bioscience Corp., King of Prussia, PA）および水（1.1L、1.1kg、Burdick & Jackson）を周囲温度で添加した。結果として得られた白色スラリーを窒素雰囲気下におき、トリエチルアミン（1.0L、0.73kg、7.21モル、1.96当量、Aldrich Chemical Co.）を次に温度が27℃を越えないような速度で添加した。トリエチルアミンのこの規模での添加は4.2時間かかった。トリエチルアミン添加の1.75時間後のHPLC中間制御分析は、80.8%のN-メチル-N-（3-メチルジチオプロパノイル）-L-アラニンの転化率であることを示した。添加の3時間後のその後の分析は、96.1%の転化率を示し、4.25時間後は99%の転化率であった。膜ポンプを用いて35ないし40℃で反応混合物を16時間濃縮した。濃縮物のHPLC中間制御分析は、生成物のエチルエステルであると推定される後から流出するピークを示した。酢酸エチル（7.0L、6.3kg、J. T. Baker）を添加し、混合物を氷浴で15℃に冷却した。水（3.0L、3.0kg、Burdick & Jackson）を添加し、2℃の発熱が記録された。ColorpHast試験紙で測定されるpHを、水性塩酸（3N、1.4L、EM Science）を用いて6.5から3に調節した。全反応混合物を12L分液漏斗に移し、上部有機相を分離した。水性相を反応フラスコに戻し、酢酸エチルで2回抽出した（2×3.0L、合計5.52kg、J. T. Baker）。合した有機相を水で2回洗浄し（2×2.0L、合計4.0kg、Burdick & Jackson）、オーバーヘッドスターラーおよび温度計を備えた22L三口丸底フラスコに移した。溶液を氷浴で15℃に冷却し、硫酸マグネシウム（1.25kg、Mallinckrodt）を添加し、10℃の発熱が記録された。30分間攪拌後、2Lガラス漏斗を通して混合物を濾過し、残留物を酢酸エチル（1.0L、0.92kg、J. T. Baker）で洗浄した。濾液を真空中、30ないし35℃、水流吸引圧力下で濃縮した。濃縮物をヘキサン（1.0L、0.70kg、J. T. Baker）中スラリー化し、GMP真空オープン中25℃で26時間一定重量まで乾燥して、白色固体としてN-メチル-N-（3-メチルジチオプロパノイル）-L-アラニン、585.5g（未補正収率66.9%）を得た。生成物のHPLCキラル分析は、99.75%のL-異性体であることを示し、不純物特性は、99.13%のN-メチル-N-（3-メチルジイソプロパノイル）-L-アラニンであることを示した。C、H、N分析： 計算値： C 40.49；H 6.37；N 5.90；S 26.97

測定値： C 40.60；H 6.20；N 5.73；S 26.81

【0019】

本発明はその精神または基本的特性を逸脱することなく他の特定の形態において具体化することができ、従って、前記明細書よりも添付の請求の範囲が本発明の範囲を示すので、これを参照すべきである。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/22554 A1

(51) International Patent Classification: C07C 231/10

(21) International Application Number: PCT/US01/28443

(22) International Filing Date:
12 September 2001 (12.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/231,784 12 September 2000 (12.09.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US):
SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION
[US/US], One Franklin Plaza, Philadelphia, PA 19103
(US).(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): ELDRIDGE, Ann,
M. [US/US], 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA
19406 (US). HIEBL, Johann [AT/AT], Libellenweg 20,
A-4030 Linz (AT).(74) Agents: BAUMEISTER, Kirk et al.; Smithkline
Beecham Corporation, Corporate Intellectual Property,
UW2220, 709 Swedeland Road, P.O. Box 1539, King of
Prussia, PA 19406-0939 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/22554 A1

(54) Title: PROCESS AND INTERMEDIATES

(57) Abstract: Processes for preparing N-methyl-L-alanine derivatives and novel intermediates of the process. The derivatives and intermediates are useful for preparing cell-binding agent/maytansinoid complexes.

WO 02/22554

PCT/US01/28443

PROCESS AND INTERMEDIATESField of the Invention

The present invention relates to a process for producing N-methyl-L-alanine derivatives and to novel process intermediates.

Background of the Invention

Processes for the preparation of N-methyl-L-alanine derivatives from dithioalkanoic acid intermediates and N-methyl-L-alanine have been reported in U.S. Patent No. 5,208,020. The compounds are useful for linking cytotoxic maytansinoids to cell-binding agents such as antibodies. Antibody/maytansinoid complexes are useful as tumor-activated pro-drugs.

For example, the multi-step synthesis of N-methyl-N-(3-methyldithio-propanoyl)-L-alanine has been disclosed. First, 3-methyldithiopropionic acid was prepared by adding methyl methanethiosulfonate in ethanol to a solution of 3-mercaptopropionic acid in water. After extraction, washing and concentration, the 3-methyldithiopropionic acid was isolated by distillation. Isobutylchloroformate and triethylamine were added to the 3-methyldithiopropionic acid in THF to form the corresponding mixed anhydride as intermediate. Subsequently, a mixture of N-methyl-L-alanine and triethylamine in water was added. After extraction, concentration and chromatography, a 34% yield of N-methyl-N-(3-methyldithio-propanoyl)-L-alanine was obtained.

A major shortcoming of the prior art processes is the necessity of two chromatography steps to remove side products from the desired reaction products. Further, the use of isobutylchloroformate in the reaction scheme allows for racemization which leads to a final product containing the undesired D-enantiomer. Thus, there is a need in the art for improved methods to prepare N-methyl-L-alanine derivatives with an optical purity >95% enantiomeric excess (ee) where the intermediates are more stable, resulting in less undesired side products.

WO 02/22554

PCT/US01/28443

Summary of the Invention

One aspect of the invention is processes for the preparation of N-methyl-L-alanine derivatives.

Another aspect of the invention is novel intermediates
5 useful for the preparation of N-methyl-L-alanine derivatives.

Another aspect of the invention is processes for the preparation of the novel intermediates of the invention.

Yet another aspect of the invention is cell-binding agent/maytansinoid complexes prepared from the N-methyl-L-
10 alanine derivatives or novel intermediates produced by the processes of the invention.

Detailed Description of the Invention

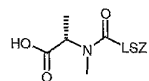
All publications, including but not limited to patents
15 and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference as though fully set forth.

By the term "coupling reagent" as used herein and in the claims is meant a compound or compounds which are capable of forming an activated derivative of methyldithiopropionic acid
20 or its homologues which is stable to hydrolysis under the employed reaction conditions and yields a compound of Formula I with an optical purity >95% when reacted with N-methyl-L-alanine.

WO 02/22554

PCT/US01/28443

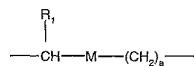
The present invention provides a process for the preparation of compounds of Formula I



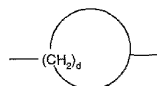
(I)

where

5 L is



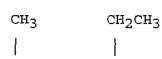
or



where

R₁ is H, methyl or ethyl;

10



M is a direct bond, CH₂, —CH—, or —CH— ;

a is 0 or an integer of 1 to 9 when M is a direct bond provided that when M is one or more carbon atoms

15 a is 0 or an integer of 1 to 8;

d is an integer of 3 to 8; and

Z is H or SR₂, where R₂ is linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, aryl, substituted aryl or heterocyclic.

20 The present invention also provides novel intermediates that are useful in the process of the invention.

The present invention also provides antibody/maytansinoid complexes produced by the process of the invention.

25 The process of the invention comprises the steps of reacting a salt of a mercaptoalkanoic acid of Formula II

WO 02/22554

PCT/US01/28443



(II)

where L is as defined above;

5 and thiol-sulfonates of Formula III



(III)

where Q is H, linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, aryl, substituted aryl or heterocyclic,

10

in a disulfide formation reaction where a salt of a compound of Formula II in water is added to a compound of Formula III in a water-immiscible polar organic solvent to form intermediates of Formula IV

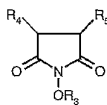
15



(IV)

where L and Q are as defined above; and

20 reacting a compound of Formula IV in an esterification reaction with a coupling reagent such as that of Formula V



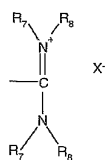
(V)

where

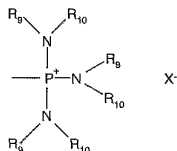
25 R_3 is H or substituted uronium salt of the formula

WO 02/22554

PCT/US01/28443



where X^- is PF_6^- or BF_4^- , R_7 and R_8 are independently linear alkyl, branched alkyl, cycloalkyl or $(CH_2)_e$ where e is an integer of 3 to 8 with the proviso that when R_7 is $(CH_2)_e$, R_8 is a direct bond, or a substituted phosphonium salt of the formula



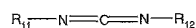
10

where X^- is PF_6^- or BF_4^- , R_9 and R_{10} are independently linear alkyl, branched alkyl, cycloalkyl or heterocyclic; and

R_4 and R_5 are independently H, a double bond, linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, aryl, substituted aryl or heterocyclic.

If R_3 is H, the reaction is carried out in the presence of a carbodiimide reagent of Formula VI

20



(VI)

where

R_{11} and R_{12} are independently linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, aryl, substituted aryl or heterocyclic. Preferably, the carbodiimide reagent of Formula VI is 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI·HCl) where R_{11} is ethyl and R_{12} is

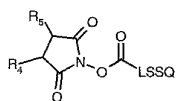
WO 02/22554

PCT/US01/28443

dimethylaminopropyl or 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) where R_{11} and R_{12} are cyclohexyl. Particularly preferred is EDCI-HCl.

Alternatively, if R_3 is a uronium or phosphonium salt, the reaction is carried out in the presence of a base, preferably triethylamine or diisopropylethylamine.

These reactions form compounds of Formula VII



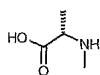
(VII)

10

where R_4 , R_5 , L and Q are as defined above.

Compounds of Formula VII are activated esters and are novel intermediates of the process of the invention and are stable to hydrolysis under the employed reaction conditions and allow racemization-free coupling with N-methyl-L-alanine. Preferably, the compounds are crystalline.

Compounds of Formula VII are subsequently reacted with N-methyl-L-alanine (Formula VIII)



(VIII)

20

to form a compound of Formula I.

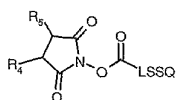
Further, the present invention also includes a process for the preparation of compounds of Formula I comprising reacting a compound of Formula VII with N-methyl-L-alanine to form a compound of Formula I and compounds of Formula I prepared by the process.

The present invention also includes a process for the preparation of a compound of Formula VII

30

WO 02/22554

PCT/US01/28443

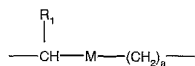


(VII)

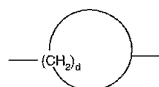
where

- 5 R_4 and R_5 are independently H, a double bond, linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, aryl, substituted aryl or heterocyclic,

L is



or



10

where

 R_1 is H, methyl or ethyl;

15

M is a direct bond, CH_2 , —CH— (with CH_3 above), or —CH— (with CH_2CH_3 above);
 a is 0 or an integer of 1 to 9 when M is a direct bond provided that when M is one or more carbon atoms a is 0 or an integer of 1 to 8; and

d is an integer of 3 to 8; and

- 20 Q is H, linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, simple or substituted aryl or heterocyclic which comprises the steps of:

(1) reacting a salt of a mercaptoalkanoic acid of Formula II

25



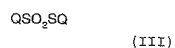
(II)

where L is as defined above;

WO 02/22554

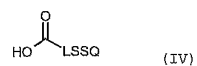
PCT/US01/28443

and thiosulfonates of Formula III



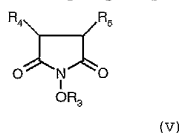
5 where Q is as defined above,

in a disulfide formation reaction where a salt of a compound of Formula II in water is added to a compound of Formula III in a water-immiscible polar organic solvent to form
 10 intermediates of Formula IV

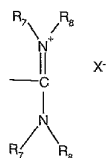


where L and Q are as defined above; and

15 (2) reacting a compound of Formula IV in an esterification reaction with a coupling reagent of Formula V



20 where R_3 is H or substituted uronium salt of the formula



25 where X^- is PF_6^- or BF_4^- , R_7 and R_8 are independently alkyl, cycloalkyl or $(\text{CH}_2)_e$, where e is an

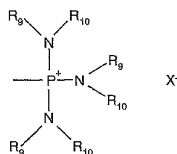
WO 02/22554

PCT/US01/28443

integer of 3 to 8 with the proviso that when R_7 is $(CH_2)_6$, R_8 is a direct bond,

or a substituted phosphonium salt of the formula

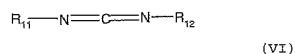
5



where X^- is PF_6^- or BF_4^- , R_9 and R_{10} are independently linear alkyl, branched alkyl, cycloalkyl or heterocyclic; and

R_4 and R_5 are as defined above, provided that when R_3 is H, the reaction is carried out in the presence of a carbodiimide reagent of Formula VI

15



where

R_{11} and R_{12} are independently linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, aryl, substituted aryl or heterocyclic, and

further provided that if R_3 is a uronium or phosphonium salt, the reaction is carried out in the presence of a base,

to form compounds of Formula VII.

Examples of linear alkyls include methyl, ethyl, propyl, butyl, pentyl and hexyl. Examples of branched alkyls include isopropyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, isopentyl and 1-ethyl-propyl. Examples of cyclic alkyls include cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl and cyclohexyl.

Examples of aryls include phenyl and naphthyl. Examples of substituted aryls include aryls substituted with alkyl, halogen (such as chlorine, bromine and iodine), nitro, amino, sulfonic acid, carboxylic acid, hydroxy and alkoxy.

WO 02/22554

PCT/US01/28443

Heteroatoms are selected from O, N and S. Examples of heterocyclics include pyrrolyl, pyridyl, furyl and thiophene.

Compounds of Formula II and their salts can be prepared by known methods from readily available starting materials such as described in U.S. Patent No. 5,208,020.

Compounds of Formula III such as methyl methanethiolsulfonate and S-phenyl benzenethiolsulfonate can be purchased from chemical supply houses such as Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) or prepared from readily available starting materials by known disulfide oxidation methods such as described in Xia et al., *Synth. Commun.* 27, 1301-1308 (1997) and Pinnick et al., *J. Org. Chem.* 45, 930-932 (1980) provided that Q does not include any moieties that render inoperative the process of the invention.

Exemplary compounds of Formula V are:

N-hydroxysuccinimide (Va);

O-(N-succinimidyl)-1, 1, 3, 3-

bis(tetramethylene)uronium tetrafluoroborate or its

corresponding hexafluorophosphate (Vb);

O-(N-succinimidyl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium-tetrafluoroborate or its corresponding hexafluorophosphate (Vc);

N-hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboxylic acid imide (Vd);

O-(5-Norbornene-2,3-dicarboximido)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (Ve);

O-(5-Norbornene-2,3-dicarboximido)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium hexafluorophosphate derivative (Vf);

N-hydroxyphthalimide (Vg);

1, 1, 3, 3-tetramethyluronium tetrafluoroborate N-hydroxyphthalimide (Vh);

1, 1, 3, 3-tetramethyluronium hexafluorophosphate N-hydroxyphthalimide (Vi);

N,N,N',N'-bis(pentamethylene)uronium tetrafluoroborate N-hydroxyphthalimide (Vj);

N,N,N',N'-bis(pentamethylene)uronium hexafluorophosphate N-hydroxyphthalimide (Vk);

N,N,N',N'-bis(tetramethylene)uronium tetrafluoroborate N-hydroxyphthalimide (Vl);

WO 02/22554

PCT/US01/28443

- N,N,N',N'*-bis(tetramethylene)uronium
hexafluorophosphate *N*-hydroxyphthalimide (Vm);
N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate
(Vn);
5 *N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate
(Vo);
tris(dimethylamino)phosphonium tetrafluoroborate
(Vp);
tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate
10 (Vq);
tripyrrolidinophosphonium tetrafluoroborate (Vr);
tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
(Vs);
1,3-dimethylimidazolidinium tetrafluoroborate
15 (Vt); and
1,3-dimethylimidazolidinium hexafluorophosphate
(Vu).

Compounds of Formula V can be purchased from chemical
supply houses such as Fluka Chemical Corp. (Milwaukee, WI) or
20 prepared by known methods from readily available starting
materials. For example, compounds of Formula V can be
prepared by the method of Knorr *et al.* in *Tetrahedron Lett.*
30, 1927-1930 (1989).

Compounds of Formula VI can be purchased from chemical
supply houses such as Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO) or
25 prepared by known methods from readily available starting
materials.

The compound of Formula VIII (*N*-methyl-L-alanine) can be
purchased from BACHEM Bioscience Inc. (King of Prussia, PA).

30 The reaction to convert compounds of Formula II to
compounds of Formula IV is carried out by adding an aqueous
solution of a salt of a compound of Formula II to a compound
of Formula III in a water-immiscible polar organic solvent,
preferably at a temperature range of less than -5°C. Most
35 preferably, an aqueous solution of the sodium salt of a
compound of Formula II is added slowly to a solution of the
compound of Formula III in tetrahydrofuran at a temperature
range of about -15°C to about -5°C. A particularly preferred
temperature range is about -10°C to about -5°C.

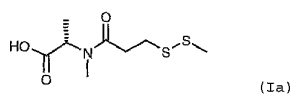
WO 02/22554

PCT/US01/28443

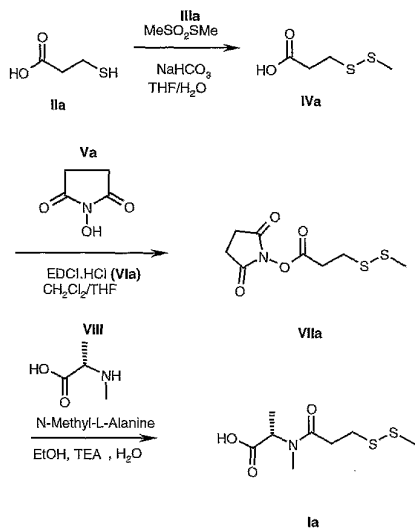
- Preferably, the reaction to convert compounds of Formula IV to the activated esters of Formula VII, when R₃ of Formula V is H, is carried out in the presence of a carbodiimide reagent at a temperature range of about 0°C to about 20°C,
- 5 preferably about 0°C to about 12°C, in a solvent such as methylene chloride. When R₃ of Formula V is a uronium or phosphonium salt, the reaction is carried out in the presence of a base, preferably triethylamine or diisopropylethylamine.
- 10 Preferably, the reaction to convert compounds of Formula VII to compounds of Formula I is carried out at ambient temperature in a polar solvent such as aqueous ethanol/triethylamine.
- The reagents, conditions and intermediates used in the present invention provide for high yields of the desired
- 15 compounds of Formula I making the process appropriate for industrial scale utilization. Further, the process of the invention has other advantages over the processes disclosed in U.S. Pat. No. 5,208,020. Specifically, the claimed process converts compounds of Formula II to compounds of
- 20 Formula IV without the formation of undesired side products of symmetric disulfides of thiopropionic acid or its homologues. Accordingly, no isolation step for compounds of Formula IV is necessary and a one-pot process can be used to convert compounds of Formula II to the novel intermediates of
- 25 Formula VII, which can be isolated. Alternatively, the Formula VII intermediate is not isolated and a one-pot process can be used to convert compounds of Formula II to compounds of Formula I.
- Further, the claimed process affords the activated
- 30 esters of Formula VII which are crystalline and stable to hydrolysis. Accordingly, the compounds of Formula I produced by the reaction of N-methyl-L-alanine with the compounds of Formula VII are substantially optically pure L-isomer.
- Most preferably, the process of the present invention is
- 35 used for preparing a compound of Formula Ia which is N-methyl-N-(3-methyldithiopropionyl)-L-alanine

WO 02/22554

PCT/US01/28443



The preferred process is shown schematically below.



5 The process of the invention can be used to make cell-binding agent/maytansinoid complexes which are useful as tumor-activated pro-drugs. Compounds of Formula VII can be converted into a cell-binding agent/maytansinoid complex. Further, compounds of Formula I produced by the process of

10 the invention are used as described in U.S. Patent No. 5,208,020 to produce N-methyl-L-alanine containing

WO 02/22554

PCT/US01/28443

maytansinoid derivatives. These derivatives are then conjugated to cell-binding agents, preferably antibodies, via various linkers. Preferably, the linkage is a disulfide link.

5 An exemplary cell-binding agent/maytansinoid complex can be prepared by a process comprising the following steps:

- (1) esterifying maytansinol with a compound of Formula I prepared by the process of the invention to form a disulfide-containing maytansinoid ester;
- 10 (2) reducing the disulfide-containing maytansinoid ester prepared by step (1) to a thiol-containing maytansinoid;
- (3) introducing dithiopyridyl groups into a cell-binding agent; and
- 15 (4) linking the thiol-containing maytansinoid produced by step (2) to the dithiopyridyl cell-binding agent of step (3) by a disulfide link.

The present invention will now be described with
20 reference to the following specific, non-limiting example.

EXAMPLE

Preparation of N-methyl-N-(3-methyldithiopropionyl)-L-alanine (Ia)

25 All reagents utilized herein were sourced as first described below.

Step 1: Preparation of methyldithiopropionic acid (IVa)

A 3 L three-necked round bottom flask equipped with an overhead stirrer and thermometer was charged with 3-
30 mercaptopropionic acid (416.6 g, 3.93 moles, 1 equiv, Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) and water (HPLC grade, 1.36 L, 1.36 kg, Burdick & Jackson, Muskegon, MI). Solid sodium bicarbonate (362.5 g, 4.31 mole, 1.1 equiv, Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ) was added at a rate to control foaming from
35 off-gassing of carbon dioxide. The addition was endothermic and took 1 hour, the temperature decreasing from 20°C to 10°C. A 12 L three-necked round bottom flask, equipped with an overhead stirrer, a 2 L addition funnel, a thermometer, and a nitrogen inlet was charged with methyl methanethiolsulfonate
40 (540.0 g, 441.5 mL, 4.28 moles, 1.09 equiv, Aldrich Chemical Co.) and tetrahydrofuran (3.25 L, 2.89 kg, Burdick & Jackson)

WO 02/22554

PCT/US01/28443

and the solution cooled with an ethylene glycol/dry ice bath to -8 to -10°C and placed under a nitrogen atmosphere. The prepared aqueous solution of sodium mercaptopropionate was transferred to the addition funnel and added to the reaction mixture at a rate to maintain the reaction temperature at less than or equal to -5°C. On this scale the addition took 2 hours and the temperature range was -10 to -5°C. Stirring was continued in the same temperature range and after 15 minutes an HPLC in-process control assay showed the disappearance of 3-mercaptopropionic acid. After stirring for 40 minutes, aqueous hydrochloric acid (3N, 500 mL, EM Science, Gibbstown, NJ) was added to the reaction mixture until the pH registered 3.0 to 3.5 by ColorpHast indicator strips (pH 0 to 6 range). The reaction mixture was transferred to a 6 L separatory funnel, allowed to separate for 10 minutes, and the upper organic phase isolated. The aqueous phase was returned to the 12 L reaction flask and methylene chloride (1.6 L, 2.18 kg, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) was added. After stirring for 10 minutes, the phases were transferred to a 6 L separatory funnel and the bottom organic layer was separated. The organic phases were combined and transferred to a 12 L three-necked flask equipped with an overhead stirrer. Magnesium sulfate (1.33 kg) was added and after stirring for 0.5 hour, the mixture was filtered through a Buchner funnel. The solid residue was rinsed with methylene chloride (1.6 L, 2.18 kg). A Karl-Fisher assay of the combined filtrate and rinse showed 0.35% water. The filtrate was stored overnight at 15°C. An in-process HPLC impurity profile of the filtrate showed 97% methylthiopropanoic acid by area percent with no symmetrical disulfide of 3-mercaptopropionic acid present.

Step 2: Preparation of succinimidy-3-methylthiopropanoate (VIIa)

The methylthiopropanoic acid filtrate was transferred to a 22 L three-necked round bottom flask and cooled to 0°C with an ice-salt bath. 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (1.28 kg, 6.68 moles, 1.7 equiv, Aldrich Chemical Co.) was added over 40 minutes through a powder funnel and a temperature rise to 10°C was observed. N-hydroxysuccinimide (525 g, 4.56 mole, 1.16 equiv, Aldrich Chemical Co.) was added over 8 minutes through

WO 02/22554

PCT/US01/28443

a funnel and rise in temperature of 2 °C was observed. After stirring for 1 hour at 8 to 10°C, an in-process HPLC assay showed a 66.7% conversion to succinimidyl-3-methyldithiopropionate by area percent; after 2 hours, the assay showed a 98.4% conversion. The reaction was stopped after 2.5 hours and the reaction mixture was concentrated under water aspirator pressure. The resultant syrup was transferred to a clean 22 L three-necked round bottom flask and water (8.3 L, 8.3 kg, Burdick & Jackson) was added while the mixture was stirred vigorously. After stirring for 0.5 hour at ambient temperature, the white solid that formed was filtered using a sintered glass funnel. The 1201 g wet cake was washed with water (2.1 L, 2.1 kg, Burdick & Jackson) and dried for 94 hours at 20 to 25°C at approximately 2 torr to constant weight in a GMP vacuum oven. Drying afforded 927 g of the product succinimidyl-3-methyldithiopropionate (94.7% crude yield) as a white solid with an HPLC impurity profile showing 94.6% by area percent and an NMR spectra that was the same as a working reference.

C,H,N Analysis: Calculated: C 38.54; H 4.45; N 5.62; S 25.67
Found: C 38.20; H 4.48; N 5.58; S 25.44

¹³C NMR(75 MHz, CDCl₃): δ 169.0, 167.1, 31.5, 31.1, 25.6, 23.2

Step 3: Preparation of N-methyl-N-(3-methyldithiopropionyl)-L-alanine (Ia)

A 22 L round bottom three-necked flask equipped with an overhead stirrer, a 2 L addition funnel, a thermometer and a nitrogen inlet was charged with succinimidyl-3-methyldithiopropionate (920 g, 3.69 mole, 1 equiv) and ethanol (200 proof, 11.0 L, 8.69 kg, Aaper, Shelbyville, KY). N-Methyl-L-alanine (496.8 g, 4.82 mole, 1.3 equiv, BACHEM Bioscience Corp., King of Prussia, PA) and water (1.1 L, 1.1 kg, Burdick & Jackson) were added at ambient temperature. The resultant white slurry was placed under nitrogen and triethylamine (1.0 L, 0.73 kg, 7.21 moles, 1.96 equiv, Aldrich Chemical Co.) was then added at a rate such that the temperature did not exceed 27°C. Addition of triethylamine on this scale took 4.25 hours. An HPLC in-process control assay after 1.75 hours of triethylamine addition showed a conversion to 80.8% N-methyl-N-(3-methyldithiopropionyl)-L-alanine. Subsequent assays after 3 hours of addition showed

WO 02/22554

PCT/US01/28443

a 96.1% conversion and a 99% conversion after 4.25 hours. The reaction mixture was concentrated for 16 hours using a diaphragm pump at 35 to 40°C. HPLC of the concentrate showed a later running peak assumed to be the ethyl ester of the product. Ethyl acetate (7.0 L, 6.3 kg, J.T. Baker) was added and the mixture cooled with an ice bath to 15°C. Water (3.0 L, 3.0 kg, Burdick & Jackson) was added and a 2°C exotherm was noted. The pH, measured with ColorpHast indicator paper, was adjusted from 6.5 to 3 using aqueous hydrochloric acid (3N, 1.4 L, EM Science). The entire reaction mixture was transferred to a 12 L separatory funnel and the top organic phase isolated. The aqueous phase was returned to the reaction flask and extracted twice with ethyl acetate (2 x 3.0 L, 5.52 kg total, J.T. Baker). The combined organic phases were washed twice with water (2 x 2.0 L, 4.0 kg total, Burdick & Jackson) and transferred to a 22 L three-necked round bottom flask equipped with an overhead stirrer and thermometer. The solution was cooled with an ice bath to 15 °C and magnesium sulfate (1.25 kg, Mallinckrodt) was added and an exotherm of 10 °C was noted. After stirring for 30 minutes, the mixture was filtered through a 2 L sintered glass funnel and the residue washed with ethyl acetate (1.0 L, 0.92 kg, J.T. Baker). The filtrate was concentrated in vacuo at 30 to 35°C under water aspirator pressure. The concentrate was slurried in hexane (3.1 L, 2.04 kg, J.T. Baker), stirred for 2 hours and filtered through a Buchner funnel. The solids were rinsed with hexane (1.0 L, 0.70 kg, J.T. Baker) and dried to constant weight in a GMP vacuum oven at 25°C for 26 hours to afford N-methyl-N-(3-methyldithio-
propanoyl)-L-alanine as a white solid, 585.5 g (66.9% uncorrected yield). An HPLC chiral assay of the product showed 99.75% L-isomer and an impurity profile showed 99.13% N-methyl-N-(3-methyldithiopropionyl)-L-alanine.
C,H,N Analysis: Calculated: C 40.49; H 6.37; N 5.90; S 26.97
Found: C 40.60; H 6.20; N 5.73; S 26.81

The present invention may be embodied in other specific forms without departing from the spirit or essential attributes thereof, and, accordingly, reference should be

WO 02/22554

PCT/US01/28443

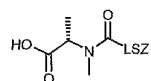
made to the appended claims, rather than to the foregoing specification, as indicating the scope of the invention.

WO 02/22554

PCT/US01/28443

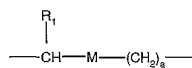
Claims:

1. A process for the preparation of compounds of Formula I

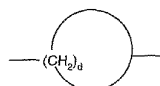


(I)

where
L is



or



where
R₁ is H, methyl or ethyl;

10

M is a direct bond, CH₂, ---CH--- (with CH₃ above), or ---CH--- (with CH₂CH₃ above);
a is 0 or an integer of 1 to 9 when M is a direct bond provided that when M is one or more carbon atoms
a is 0 or an integer of 1 to 8;

15

d is an integer of 3 to 8; and
Z is H or SR₂, where R₂ is linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, aryl, substituted aryl or heterocyclic;
which comprises the steps of:

20

(1) reacting a salt of a mercaptoalkanoic acid of Formula II



(II)

25

WO 02/22554

PCT/US01/28443

where L is as defined above;

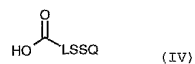
and thiol-sulfonates of Formula III



(III)

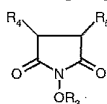
where Q is H, linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, aryl, substituted aryl or heterocyclic,

in a disulfide formation reaction where a salt of a compound of Formula II in water is added to a compound of Formula III in a water-immiscible polar organic solvent to form intermediates of Formula IV



where L and Q are as defined above; and

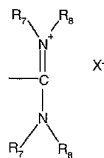
(2) reacting a compound of Formula IV in an esterification reaction with a coupling reagent of Formula V



(V)

where

R₃ is H or substituted uronium salt of the formula



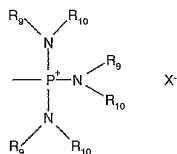
20

WO 02/22554

PCT/US01/28443

where X^- is PF_6^- or BF_4^- , R_7 and R_8 are independently alkyl, cycloalkyl or $(CH_2)_e$, where e is an integer of 3 to 8 with the proviso that when R_7 is $(CH_2)_e$, R_8 is a direct bond,

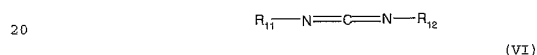
5 or a substituted phosphonium salt of the formula



10 where X^- is PF_6^- or BF_4^- , R_9 and R_{10} are independently linear alkyl, branched alkyl, cycloalkyl or heterocyclic; and

R_4 and R_5 are independently H, a double bond, linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, aryl, substituted aryl or heterocyclic,

15 provided that when R_3 is H, the reaction is carried out in the presence of a carbodiimide reagent of Formula VI

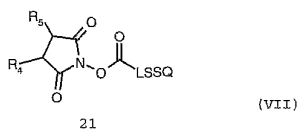


where

R_{11} and R_{12} are independently linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, aryl, substituted aryl or heterocyclic, and

25 further provided that if R_3 is a uronium or phosphonium salt, the reaction is carried out in the presence of a base, to form compounds of Formula VII

30



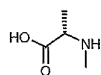
WO 02/22554

PCT/US01/28443

where R_4 , R_5 , L and Q are as defined above; and

(3) reacting a compound of Formula VII with N-methyl-L-alanine (Formula VIII)

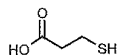
5



(VIII)

to form a compound of Formula I.

10 2. The process of claim 1 wherein the compound of Formula II has the structure



(IIa);

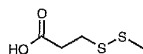
15 the compound of Formula III has the structure



(IIIa);

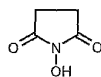
the compound of Formula IV has the structure

20



(IVa);

the compound of Formula V has the structure



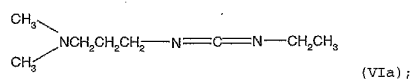
25

(Va);

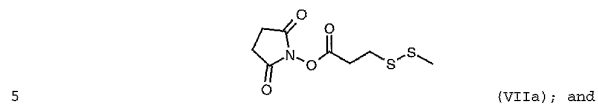
the compound of Formula VI has the structure

WO 02/22554

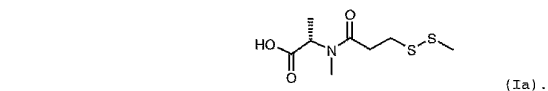
PCT/US01/28443



the compound of Formula VII has the structure



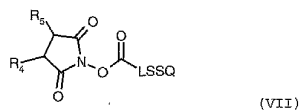
the compound of Formula I has the structure



- 10 3. The process of claim 1 wherein the carbodiimide reagent of Formula VI is 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI-HCl) or dimethylaminopropyl or 1,3-
15 dicyclohexylcarbodiimide (DCC).

4. The process of claim 3 wherein the carbodiimide reagent of Formula VI is EDCI-HCl.

- 20 5. A compound of Formula VII



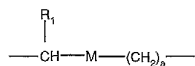
where

- 25 R₄ and R₅ are independently H, a double bond, linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, aryl, substituted aryl or heterocyclic,

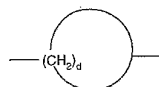
WO 02/22554

PCT/US01/28443

L is



or



where

R₁ is H, methyl or ethyl;

5

CH₃CH₂CH₃M is a direct bond, CH₂, $\begin{array}{c} | \\ -CH- \end{array}$, or $\begin{array}{c} | \\ -CH- \end{array}$;

a is 0 or an integer of 1 to 9 when M is a

direct bond provided that when M is one or more carbon atoms

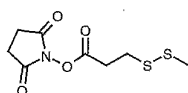
10 a is 0 or an integer of 1 to 8;

d is an integer of 3 to 8; and

Q is H, linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, simple or substituted aryl or heterocyclic.

15

6. The compound of claim 5 having the structure

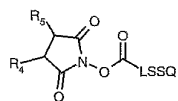


(VIIa).

WO 02/22554

PCT/US01/28443

7. A process for the preparation of a compound of
Formula VII



(VII)

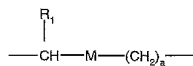
5

where

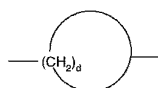
R₄ and R₅ are independently H, a double bond,
linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, aryl, substituted
aryl or heterocyclic,

10

L is



or



where

R₁ is H, methyl or ethyl;

15

M is a direct bond, CH₂, $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{---CH---} \end{array}$, or $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ | \\ \text{---CH---} \end{array}$;

a is 0 or an integer of 1 to 9 when M is a
direct bond provided that when M is one or more carbon atoms
a is 0 or an integer of 1 to 8;

20

d is an integer of 3 to 8; and

Q is H, linear alkyl, branched alkyl, cyclic
alkyl, simple or substituted aryl or heterocyclic
which comprises the steps of:

WO 02/22554

PCT/US01/28443

(1) reacting a salt of a mercaptoalkanoic acid of Formula II



(II)

5

where L is as defined above;

and thiol-sulfonates of Formula III



(III)

10

where Q is as defined above,

in a disulfide formation reaction where a salt of a compound of Formula II in water is added to a compound of Formula III in a water-immiscible polar organic solvent to form intermediates of Formula IV

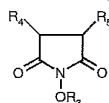


(IV)

20

where L and Q are as defined above; and

(2) reacting a compound of Formula IV in an esterification reaction with a coupling reagent of Formula V



(V)

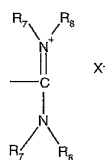
25

where

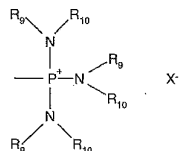
R₃ is H or substituted uronium salt of the formula

WO 02/22554

PCT/US01/28443



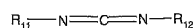
where X^- is PF_6^- or BF_4^- , R_7 and R_8 are independently alkyl, cycloalkyl or $(CH_2)_e$, where e is an integer of 3 to 8 with the proviso that when R_7 is $(CH_2)_e$, R_8 is a direct bond, or a substituted phosphonium salt of the formula



10

where X^- is PF_6^- or BF_4^- , R_9 and R_{10} are independently linear alkyl, branched alkyl, cycloalkyl or heterocyclic; and

R_4 and R_5 are as defined above, provided that when R_3 is H, the reaction is carried out in the presence of a carbodiimide reagent of Formula VI



20

(VI)

where

R_{11} and R_{12} are independently linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, aryl, substituted aryl or heterocyclic, and

further provided that if R_3 is a uronium or phosphonium salt, the reaction is carried out in the presence of a base,

WO 02/22554

PCT/US01/28443

to form compounds of Formula VII.

8. A process for the preparation of compounds of Formula I having the structure disclosed in claim 1 comprising reacting a compound of Formula VII having the structure disclosed in claim 1 with N-methyl-L-alanine to form a compound of Formula I.

9. A compound of Formula I prepared by the process of claim 8.

10. A cell-binding agent/maytansinoid complex prepared by converting a compound of Formula VII having the structure disclosed in claim 5 into the cell-binding agent/maytansinoid complex.

11. A cell-binding agent/maytansinoid complex prepared by a process comprising the following steps:

- (1) esterifying maytansinol with a compound of Formula I prepared by the process of claim 1 or claim 8 to form a disulfide-containing maytansinoid ester;
- (2) reducing the disulfide-containing maytansinoid ester prepared by step (1) to a thiol-containing maytansinoid;
- (3) introducing dithiopyridyl groups into a cell-binding agent; and
- (4) linking the thiol-containing maytansinoid produced by step (2) to the dithiopyridyl cell-binding agent of step (3) by a disulfide link.

12. The cell-binding agent/maytansinoid complex of claim 10 or 11 wherein the cell-binding agent is an antibody.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/28443
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07C 231/10 US CL : 562/553; 564/133 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 562/553; 564/133 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN: REGISTRY AND CAPLUS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,208,020 A (CHARI et al) 4 May 1993 (04.05.1993), figure 2.	9
Y		10-12
Y	GREENFIELD et al. Evaluation of in Vitro Adriamycin Immunocjugates Synthesized Using an Acid-sensitive Hydrazine Linker. Cancer Research. 15 October 1990, Vol. 50, pages 6600-6607, especially page 6602.	10-12
☐ Further documents are listed in the confirmation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "E" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 December 2001 (10.12.2001)		Date of mailing of the international search report 12 FEB 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20331 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Zachary C. Tucker Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,R0,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 アン・エム・エルドリッジ

アメリカ合衆国19406ペンシルベニア州キング・オブ・プルシア、スウェードランド・ロード
709番

(72)発明者 ヨハン・ヒーブル

オーストリア、アー4030リンツ、リベレンヴェーク20番

Fターム(参考) 4C069 AC36 BC06 BC12 CC18

4H006 AA01 AA02 AB28 AC53 AC63 TA04 TB55