

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 792**

51 Int. Cl.:
C07C 231/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01975197 .3**
96 Fecha de presentación: **12.09.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1322597**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2003**

54 Título: **Procedimiento y productos intermedios**

30 Prioridad:
12.09.2000 US 231784 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.06.2012

73 Titular/es:
**GLAXOSMITHKLINE LLC
ONE FRANKLIN PLAZA 200 NORTH 16TH
STREET
PHILADELPHIA, PA 19102, US**

72 Inventor/es:
**ELDRIDGE, Ann M. y
HIEBL, Johann**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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

ES 2 383 792 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y productos intermedios

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de derivados de N-metil-L-alanina y a un procedimiento novedoso para los productos intermedios.

Antecedentes de la invención

Se han presentado los procedimientos para la preparación de los derivados de N-metil-L-alanina a partir de los productos intermedios del ácido ditiolcanoico y de N-metil-L-alanina en el documento de Patente de los Estados Unidos de América N° 5.208.020. Los compuestos son útiles para el enlace de los maitansinoides citotóxicos con los agentes aglutinantes celulares tales como los anticuerpos. Los complejos de anticuerpo/maitansinoide son útiles como profármacos activados por los tumores.

Se ha desvelado, por ejemplo, la síntesis en etapas múltiples del N-metil-N-(3-metilditio-propanoil)-L-alanina. Primero, el ácido 3-metilditiopropanoico se preparó mediante la adición de metanotiosulfonato de metilo en etanol a una disolución de ácido 3-mercaptopropanoico en agua. Después de la extracción, el lavado y la concentración, el ácido 3-metilditiopropanoico se aisló por destilación. Se añadieron cloroformiato de isobutilo y trietilamina al ácido 3-metilditiopropanoico en THF para formar el correspondiente anhídrido mixto como producto intermedio. Posteriormente, se añadió una mezcla de N-metil-L-alanina y trietilamina en agua. Después de la extracción, la concentración y la cromatografía, se obtuvo N-metil-N-(3-metilditio-propanoil)-L-alanina con un rendimiento del 34%.

Una deficiencia principal de los procedimientos de la técnica anterior es la necesidad de dos etapas de cromatografía para retirar los productos secundarios de los productos de reacción deseados. Adicionalmente, el uso de cloroformiato de isobutilo en el esquema de la reacción permite la racemización lo que conduce a un producto final que contiene el enantiómero D no deseado. De esta manera, es necesario, en la técnica para los procedimientos mejorados, preparar los derivados de N-metil-L-alanina con un exceso enantiomérico (ee) de pureza óptica > 95% en la que los productos intermedios son más estables, dando como resultado menos productos secundarios no deseados.

Sumario de la invención

Un aspecto de la invención se refiere a los procedimientos para la preparación de los derivados de N-metil-L-alanina.

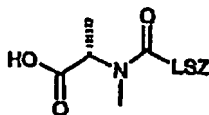
Otro aspecto de la invención se refiere a los productos intermedios novedosos útiles para la preparación de los derivados de N-metil-L-alanina.

Otro aspecto aún de la invención se refiere a la preparación de los complejos de agente aglutinante celular/maitansinoide a partir de los derivados de N-metil-L-alanina o de los productos intermedios novedosos producidos mediante los procedimientos de la invención.

Descripción detallada de la invención

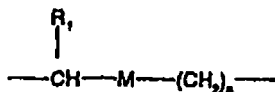
Mediante el término "reactivo de acoplamiento" como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones se quiere decir un compuesto o compuestos que son capaces de formar un derivado activado del ácido metilditiopropiónico o de sus homólogos que es estable a la hidrólisis en las condiciones de reacción empleadas y que produce un compuesto de Fórmula I con un ee de pureza óptica > 95% cuando reacciona con N-metil-L-alanina.

La presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de los compuestos de Fórmula I

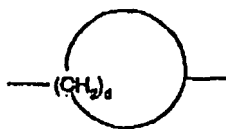


(I)

en la que
L es



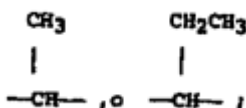
o



en la que

R_1 es H, metilo o etilo;

M es un enlace directo, CH_2 ,



5

a es 0 o un número entero de 1 a 9 cuando M es un enlace directo con la condición de que cuando M es uno o más átomos de carbono a es 0 o un número entero de 1 a 8;

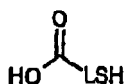
d es un número entero de 3 a 8; y

Z es H o SR_2 , en el que R_2 es alquilo lineal, alquilo ramificado, alquilo cíclico, arilo, arilo sustituido o heterocíclico.

10 La presente invención también proporciona los productos intermedios novedosos que son útiles en el procedimiento de la invención.

La presente invención también proporciona la preparación de los complejos de anticuerpo/maitansinoide mediante el procedimiento de la invención.

15 El procedimiento de la invención comprende las etapas de la reacción de una sal de un ácido mercaptoalcanoico de Fórmula II



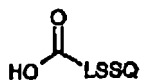
(II)

en la que L es como se ha definido anteriormente;

y los tiolsulfonatos de Fórmula III

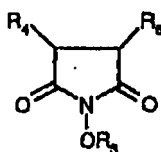


20 en la que Q es H, alquilo lineal, alquilo ramificado, alquilo cíclico, arilo, arilo sustituido o heterocíclico, en una reacción de formación de disulfuro en la que la sal sódica de un compuesto de Fórmula II en agua se añade lentamente a un compuesto de Fórmula III en tetrahidrofurano en un intervalo de temperatura entre aproximadamente $-15^\circ C$ y aproximadamente $-5^\circ C$ para formar los productos intermedios de Fórmula IV



(IV)

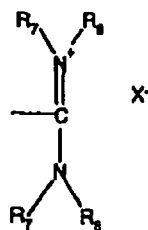
25 en la que L y Q son como se han definido anteriormente; y la reacción de un compuesto de Fórmula IV en una reacción de esterificación con un reactivo de acoplamiento tal como el de Fórmula V



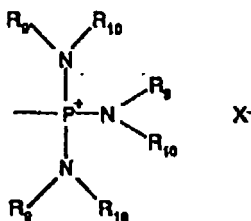
(V)

en la que

30 R_3 es H o una sal de uronio sustituida de fórmula

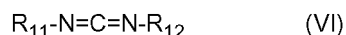


en la que X^- es PF_6^- o BF_4^- , R_7 y R_8 son independientemente alquilo lineal, alquilo ramificado, cicloalquilo o $(CH_2)_e$ en el que e es un número entero de 3 a 8 con la condición de que cuando R_7 es $(CH_2)_e$, R_8 es un enlace directo o una sal de fosfonio sustituida de fórmula



en la que X^- es PF_6^- o BF_4^- , R_9 y R_{10} son independientemente alquilo lineal, alquilo ramificado, cicloalquilo o heterocíclico; y R_4 y R_5 son independientemente H, alquilo lineal, alquilo ramificado, alquilo cíclico, arilo, arilo sustituido o heterocíclico o R_4 y R_5 tomados en conjunto forman un enlace.

Si R_3 es H, la reacción se lleva a cabo en presencia de un reactivo de carbodiimida de Fórmula VI

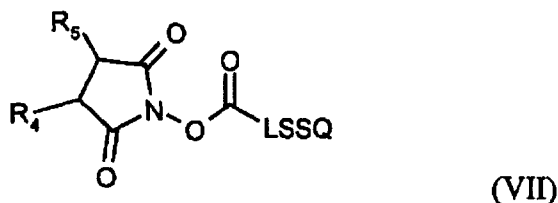


en la que

R_{11} y R_{12} son independientemente alquilo lineal, alquilo ramificado, alquilo cíclico, arilo, arilo sustituido o heterocíclico o R_{11} es etilo y R_{12} es dimetilaminopropilo tal que el reactivo carbodiimida de Fórmula (VI) es hidrocloreuro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDCLHCl). Preferentemente, el reactivo carbodiimida de Fórmula VI es hidrocloreuro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDCI-HCl) en la que R_{11} es etilo y R_{12} es dimetilaminopropilo o 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en la que R_{11} y R_{12} son ciclohexilo. Se prefiere particularmente EDCI HCl.

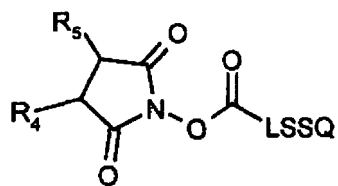
Como alternativa, si R_3 es una sal de uronio o de fosfonio, la reacción se lleva a cabo en presencia de una base, preferentemente trietilamina o diisopropiletilamina.

Estas reacciones forman compuestos de Fórmula VII



en la que R_4 , R_5 , L y Q son como se han definido anteriormente.

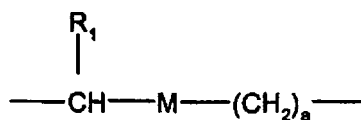
La invención proporciona un compuesto de Fórmula VII



(VII)

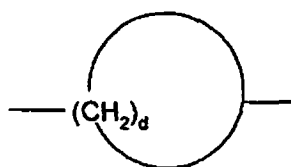
en la que

R₄ y R₅ son independientemente H, alquilo lineal, alquilo ramificado, alquilo cíclico, arilo, arilo sustituido o heterocíclico o R₄ y R₅ tomados en conjunto forman un enlace,



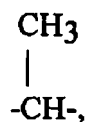
5

L es
o

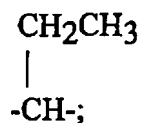


10

en la que
R₁ es H, metilo o etilo;
M es CH₂,



o



15

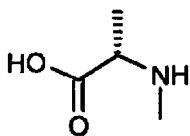
a es 0 o un número entero de 1 a 8;
d es un número entero de 3 a 8; y
Q es H, alquilo lineal, alquilo ramificado, alquilo cíclico, pirrolilo, furilo o tiofeno.

20

Los compuestos de Fórmula VII son ésteres activados y son productos intermedios novedosos del procedimiento de la invención y son estables a la hidrólisis en las condiciones de reacción empleadas y permiten el acoplamiento sin racemización con N-metil-alanina.

Preferentemente, los compuestos son cristalinos.

Los compuestos de Fórmula VII reaccionan posteriormente con N-metil-L-alanina (Fórmula VIII)



(VIII)

para formar un compuesto de Fórmula I.

Adicionalmente, la presente invención también incluye un procedimiento para la preparación de los compuestos de Fórmula I que comprende la reacción de un compuesto de Fórmula VII con N-metil-L-alanina para formar un compuesto de Fórmula I y los compuestos de Fórmula I se preparan mediante el procedimiento.

Los ejemplos de alquilos lineales incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo. Los ejemplos de alquilos ramificados incluyen isopropilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, isopentilo y 1-etil-propilo. Los ejemplos de alquilos cíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

Los ejemplos de arilos incluyen fenilo y naftilo. Los ejemplos de arilos sustituidos incluyen los arilos sustituidos con alquilo, halógeno (tal como cloro, bromo y yodo), nitro, amino, ácido sulfónico, ácido carboxílico, hidroxilo y alcoxi.

Los heteroátomos se seleccionan entre O, N y S. Los ejemplos de heterociclos incluyen pirrolilo, piridilo, furilo y tiofeno.

Los compuestos de Fórmula II y sus sales se pueden preparar mediante los procedimientos conocidos a partir de los materiales de partida fácilmente disponibles como se ha descrito en el documento de Patente de los Estados Unidos de América N° 5.208.020.

Los compuestos de Fórmula III tales como metanotolsulfonato de metilo y bencenotolsulfonato de S-fenilo se pueden adquirir en compañías de suministro químico tales como Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) o se pueden preparar a partir de los materiales de partida fácilmente disponibles mediante los procedimientos de oxidación de disulfuro tal como se ha descrito en Xia y col., Synth. Commun. 27, 1301 - 1308 (1997) y Pinnick y col., J Org. Chem. 45, 930-932 (1980) con la condición de que Q no incluya cualquier resto que deje no operativo el procedimiento de la invención.

Los compuestos ejemplo de Fórmula V son:

N-hidroxisuccinimida (Va);
tetrafluoroborato de O-(N-succinimidilo)-1,1,3,3-bis(tetrametilen)uronio o su correspondiente hexafluorofosfato (Vb);
tetrafluoroborato de O-(N-succinimidilo)-1,1,3,3-tetrametiluronio o su correspondiente hexafluorofosfato (Vc);

Los compuestos de Fórmula V se pueden adquirir en compañías de suministro químico tales como Fluka Chemical Corp. (Milwaukee, WI) o se pueden preparar mediante los procedimientos conocidos a partir de los materiales de partida fácilmente disponibles. Por ejemplo, los compuestos de Fórmula V se pueden preparar mediante el procedimiento de Knorr y col. en Tetrahedron Lett. 30, 1927 - 1930 (1989).

Los compuestos de Fórmula VI se pueden adquirir en compañías de suministro químico tales como Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO) o se pueden preparar mediante los procedimientos conocidos a partir de los materiales de partida fácilmente disponibles.

El compuesto de Fórmula VII (N-metil-L-alanina) se puede adquirir en BACHEM Bioscience Inc. (King of Prussia, PA).

La reacción para convertir los compuestos de Fórmula II en los compuestos de Fórmula IV se lleva a cabo mediante la adición de una disolución acuosa de una sal de un compuesto de Fórmula II a un compuesto de Fórmula III en un disolvente orgánico polar inmiscible en agua, preferentemente en un intervalo de temperatura menor que -5 °C. Más preferentemente, una disolución acuosa de la sal sódica de un compuesto de Fórmula II se añade lentamente a una disolución del compuesto de Fórmula III en tetrahidrofurano en un intervalo de temperatura entre aproximadamente -15 °C y aproximadamente -5 °C. Un intervalo de temperatura preferido particularmente es entre aproximadamente -10 °C y aproximadamente -5 °C.

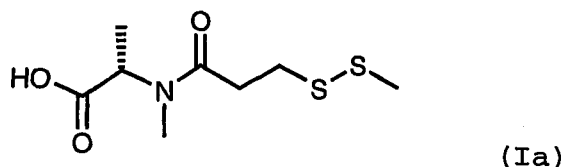
Preferentemente, la reacción para convertir los compuestos de Fórmula IV en los ésteres activados de Fórmula VII, cuando R₃ en la Fórmula V es H, se lleva a cabo en presencia de un reactivo carbodiimida en un intervalo de temperatura entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 20 °C, preferentemente entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 12 °C, en un disolvente tal como cloruro de metileno. Cuando R₃ en la Fórmula V es una sal de uronio o de fosfonio, la reacción se lleva a cabo en presencia de una base, preferentemente trietilamina o diisopropiletilamina.

Preferentemente, la reacción para convertir los compuestos de Fórmula VII en los compuestos de Fórmula I se lleva a cabo a temperatura ambiente en un disolvente polar tal como etanol/trietilamina acuosos.

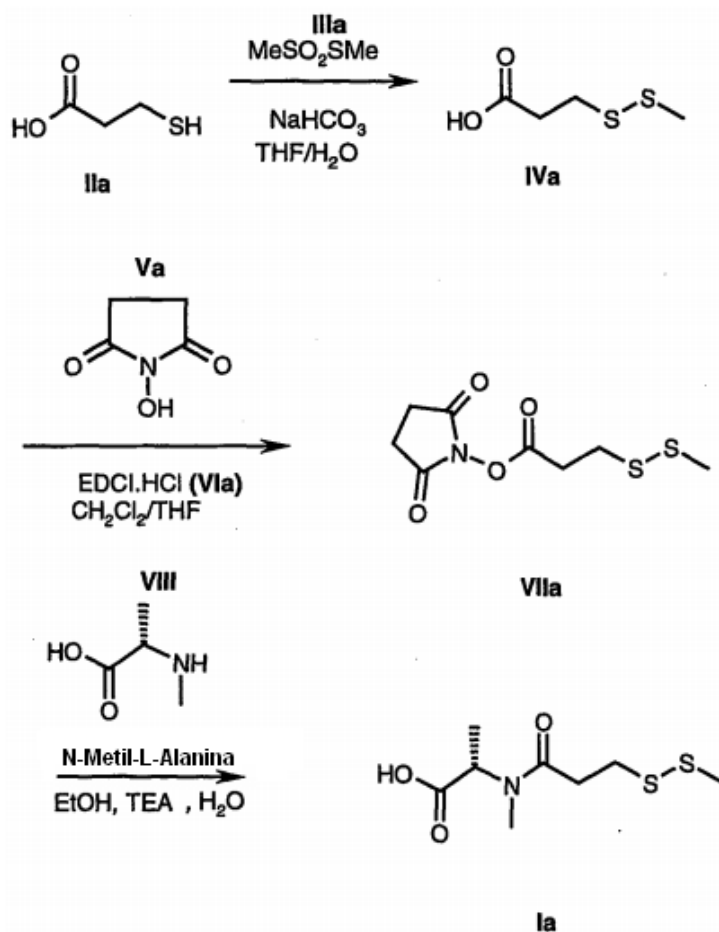
Los reactivos, las condiciones y los productos intermedios usados en la presente invención proporcionan altos rendimientos de los compuestos deseados de Fórmula I haciendo al procedimiento adecuado para su utilización a escala industrial. Adicionalmente, el procedimiento de la invención tiene otras ventajas sobre los procedimientos desvelados en el documento de Patente de los Estados Unidos de América N°. 5.208.020. Específicamente, el procedimiento reivindicado convierte los compuestos de Fórmula II en los compuestos de Fórmula IV sin la formación de los productos secundarios no deseados de disulfuros simétricos o de ácido tiopropiónico o de sus homólogos. En consecuencia, no se necesita la etapa de aislamiento para los compuestos de Fórmula IV y se puede usar un procedimiento de una sola etapa para convertir los compuestos de Fórmula II en los productos intermedios novedosos de Fórmula VII, que se pueden aislar. Como alternativa, el producto intermedio de Fórmula VII no se aísla y se puede usar un procedimiento de una sola etapa para convertir los compuestos de Fórmula II en los compuestos de Fórmula I.

Adicionalmente, el procedimiento reivindicado produce los ésteres activados de Fórmula VII que son cristalinos y estables a la hidrólisis. En consecuencia, los compuestos de Fórmula I producidos mediante la reacción de N-metil-L-alanina con los compuestos de Fórmula VII son esencialmente los isómeros L ópticamente puros.

Más preferentemente, el procedimiento de la presente invención se usa para la preparación de un compuesto de Fórmula Ia que es N-metil-N-(3-metilditiopropanoíl)-L-alanina.



El procedimiento preferido se muestra de manera esquemática a continuación.



El procedimiento de la invención se puede usar para preparar los complejos de agente aglutinante celular/maitansinoide que son útiles como profármacos activados por los tumores. Los compuestos de Fórmula VII se pueden convertir en un complejo de agente aglutinante celular/maitansinoide. Adicionalmente, los compuestos de

Fórmula I producidos mediante el procedimiento de la invención se usan como se ha descrito en el documento de Patente de los Estados Unidos de América N° 5.208.020 para producir N-metil-L-alanina que contiene los derivados de maitansinoide. Estos derivados se conjugan después con los agentes aglutinantes celulares, preferentemente con los anticuerpos, mediante diversos engarces. Preferentemente, el engarce es un enlace disulfuro.

- 5 Se puede preparar un complejo ejemplo de agente aglutinante celular/maitansinoide mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- (1) la esterificación de maitansinol con un compuesto de Fórmula I preparado mediante el procedimiento de la invención para formar un éster maitansinoide que contiene disulfuro;
 10 (2) la reducción del éster maitansinoide que contiene disulfuro preparado mediante la etapa (1) a un maitansinoide que contiene tiol;
 (3) la introducción de grupos ditiopiridilo en un agente aglutinante celular; y
 (4) el enlace del maitansinoide que contiene tiol producido en la etapa (2) con el agente aglutinante celular de ditiopiridilo de la etapa (3) mediante un enlace disulfuro.

La presente invención se describirá ahora con referencia al siguiente ejemplo específico, no limitante.

15 Ejemplo

Preparación de N-metil-N-(3-metilditiopropanoíl)-L-alanina (Ia)

Todos los reactivos utilizados en el presente documento fueron obtenidos por primera vez como se ha descrito a continuación.

Etapa 1: Preparación de ácido metilditiopropiónico (IVa)

- 20 Un matraz de fondo redondo con tres bocas, de 3 l, equipado con un agitador de varilla y un termómetro, se cargó con ácido 3-mercaptopropiónico (416,6 g, 3,93 moles, 1 eq, Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) y agua (calidad de HPLC, 1,36 l, 1,36 kg, Burdick & Jackson, Muskegon, MI). Se añadió bicarbonato sódico sólido (362,5 g, 4,31 moles, 1,1 equiv, Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ) a una cantidad para controlar la formación de espuma por la desgasificación del dióxido de carbono. La adición fue endotérmica y tardó 1 hora, disminuyendo la temperatura de 20 °C a 10 °C. Un
 25 matraz de fondo redondo con tres bocas, de 12 l, equipado con un agitador de varilla, un embudo de adición de 2 l, un termómetro y una entrada de nitrógeno se cargó con metanotiol sulfonato de metilo (540,0 g, 441,5 ml, 4,28 moles, 1,09 equiv, Aldrich Chemical Co.) y tetrahydrofurano (3,25 l, 2,89 kg, Burdick & Jackson) y la disolución se enfrió en un baño de etilenglicol/hielo seco entre -8 y -10 °C y se colocó en una atmósfera de nitrógeno. La disolución acuosa de mercaptopropionato sódico preparada se transfirió al embudo de adición y se añadió a la mezcla de reacción en una
 30 cantidad para mantener la temperatura de reacción menor o igual que -5 °C. En esta escala, la adición tardó 2 horas y el intervalo de temperatura fue entre -10 y -5 °C. La agitación se continuó en el mismo intervalo de temperatura y después de 15 minutos, un ensayo para el control del procedimiento mediante HPLC mostró la desaparición del ácido 3-mercaptopropiónico. Después de agitar durante 40 minutos, se añadió ácido clorhídrico acuoso (3 N, 500 ml, EM Science, Gibbstown, NJ) a la mezcla de reacción hasta que el pH registró entre 3,0 y 3,5 mediante las tiras indicadoras
 35 ColorpHast (intervalo de pH entre 0 y 6). La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de decantación de 6 l, se permitió la separación durante 10 minutos y se aisló la fase orgánica superior. La fase acuosa se devolvió al matraz de reacción de 12 l y se añadió cloruro de metileno (1,6 l, 2,18 kg, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). Después de agitar durante 10 minutos, las fases se transfirieron a un embudo de decantación de 6 l y se separó la fase orgánica inferior. Las fases orgánicas se combinaron y se transfirieron a un matraz con tres bocas de 12 l, equipado con un agitador de varilla. Se
 40 añadió sulfato de magnesio (1,33 kg) y después de la agitación durante 0,5 horas, la mezcla se filtró a través de un embudo Buchner. El residuo sólido se aclaró con cloruro de metileno (1,6 l, 2,18 kg). Un ensayo de Karl-Fisher del filtrado combinado y aclarado mostró un 0,35% de agua. El filtrado se almacenó durante una noche a 15 °C. Un perfil de impurezas del procedimiento mediante HPLC para el filtrado mostró un 97% de ácido metilditiopropiónico mediante el porcentaje del área con la presencia del disulfuro del ácido 3-mercaptopropiónico no simétrico.

45 Etapa 2: Preparación de 3-metilditiopropionato de succinimidilo (VIIa)

- El filtrado del ácido metilditiopropiónico se transfirió a un matraz de fondo redondo con tres bocas, de 22 l, y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo y sal. Se añadió hidrócloruro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (1,28 kg, 6,68 moles, 1,7 equiv, Aldrich Chemical Co.) durante 40 minutos a través de un embudo para transferencia de polvo y se observó un aumento de temperatura de 10 °C. Se añadió N-hidroxisuccinimida (525 g, 4,56 moles, 1,16 equiv, Aldrich
 50 Chemical Co.) y se añadió durante 8 minutos a través de un embudo y se observó un aumento de temperatura de 2 °C. Después de agitar durante 1 hora entre 8 y 10 °C, un ensayo del procedimiento mediante HPLC mostró una conversión en 3-metilditiopropionato de succinimidilo del 66,7% mediante un porcentaje del área; después de 2 horas, el ensayo mostró una conversión del 98,4%. La reacción se interrumpió después de 2,5 horas y la mezcla de reacción se concentró con un aspirador de agua a presión. El jarabe resultante se transfirió a un matraz de fondo redondo con tres
 55 bocas, de 22 l, y se añadió agua (8,3 l, 8,3 kg, Burdick & Jackson) mientras que la mezcla se agitó vigorosamente. Después de agitar durante 0,5 horas a temperatura ambiente, el sólido blanco que se formó se filtró usando un embudo de vidrio sinterizado. La torta húmeda de 1201 g se lavó con agua (2,1 l, 2,1 kg, Burdick & Jackson) y se secó durante 94 horas entre 20 y 25 °C a aproximadamente 2 torr hasta pesada constante en un horno de vacío GMP. El secado

produjo 927 g del producto 3-metilditiopropionato de succinimidilo (94,7% de rendimiento en bruto) en forma de un sólido de color blanco con un perfil de impurezas mediante HPLC mostrando un 94,6% mediante el porcentaje del área y un espectro RMN que fue el mismo que el de la referencia de trabajo.

C, H, N Análisis: Calculado: C 38,54; H 4,45; N 5,62; S 25,67
 Encontrado: C 38,20; H 4,48; N 5,58; S 25,44
 RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ 169,0, 167,1, 31,5, 31,1, 25,6, 23,2

Etapas 3: Preparación de N-metil-N-(3-metilditiopropanol)-L-alanina (Ia)

Un matraz de fondo redondo con tres bocas, de 22 l, equipado con un agitador de varilla, un embudo de adición de 2 l, un termómetro y una entrada de nitrógeno se cargó con 3-metilditiopropionato de succinimidilo (920 g, 3,69 moles, 1 equiv.) y etanol (graduación del 100%, 11,0 l, 8,69 kg, Aaper, Shelbyville, KY). Se añadieron N-metil-L-alanina (496,8 g, 4,82 moles, 1,3 equiv, BACHEM Bioscience Corp., King of Prussia, PA) y agua (1,1 l, 1,1 kg, Burdick & Jackson) a temperatura ambiente. El lodo blanco resultante se puso en nitrógeno y trietilamina (1,0 l, 0,73 kg, 7,21 moles, 1,96 equiv, Aldrich Chemical Co.) y después se añadió una cantidad tal que la temperatura no superó los 27 °C. La adición de trietilamina en esta escala duró 4,25 horas. Un ensayo para el control del procedimiento mediante HPLC después de 1,75 horas de la adición de trietilamina mostró una conversión en N-metil-N-(3-metilditiopropanoíl)-L-alanina al 80,8%. Los ensayos posteriores después de 3 horas de la adición mostraron una conversión al 96,1% y una conversión al 99% después de 4,25 horas.

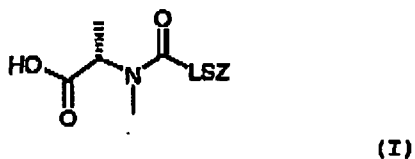
La mezcla de reacción se concentró durante 16 horas usando una bomba de diafragma de 35 a 40 °C. El HPLC del concentrado mostró un pico de desarrollo tardío que se supuso que correspondía al éster etílico del producto. Se añadió acetato de etilo (7,0 l, 6,3 kg, J.T. Baker) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo a 15 °C. Se añadió agua (3,0 l, 3,0 kg, Burdick & Jackson) y se observó una exotermia de 2 °C. El pH, medido con papel indicador ColorpHast, se ajustó de 6,5 a 3 usando ácido clorhídrico acuoso (3 N, 1,4 l, EM Science). La mezcla total de reacción se transfirió a un embudo de decantación de 12 l y se aisló la fase orgánica superior. La fase acuosa se devolvió al matraz de reacción y se extrajo dos veces con acetato de etilo (2 x 3,0 l, en total 5,52 kg, J.T. Baker). Las fases orgánicas combinadas se lavaron dos veces con agua (2 x 2,0 l, en total 4,0 kg, Burdick & Jackson) y se transfirieron a un matraz de fondo redondo con tres bocas, de 22 l, equipado con una varilla agitadora y un termómetro. La disolución se enfrió en un baño de hielo a 15 °C y se añadió sulfato de magnesio (1,25 kg, Mallinckrodt) y se anotó una exoterma de 10 °C. Después de agitar durante 30 minutos, la mezcla se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado de 2 l y el residuo se lavó con acetato de etilo (1,0 l, 0,92 kg, J.T. Baker). El filtrado se concentró al vacío de 30 a 35 °C a presión de aspiración de agua. El concentrado se suspendió en hexano (3,1 l, 2,04 kg, J.T. Baker), se agitó durante 2 horas y se filtró a través de un embudo Buchner. Los sólidos se aclararon con hexano (1,0 l, 0,70 kg, J.T. Baker) y se secaron hasta pesada constante en un horno de vacío GMP a 25 °C durante 26 horas para producir N-metil-N-(3-metilditio-propanoíl)-L-alanina en forma de un sólido de color blanco, 585,5 g (rendimiento sin corregir del 66,9%). Un ensayo quiral del producto con HPLC mostró un isómero L al 99,75% y un perfil de impureza mostró N-metil-N-(3-metilditiopropanoíl)-L-alanina al 99,13%.

C, H, N Análisis: Calculado: C 40,49; H 6,37; N 5,90; S 26,97
 Encontrado: C 40,60; H 6,20; N 5,73; S 26,81

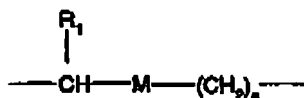
La presente invención se puede incluir en otras formas específicas sin apartarse del espíritu o de los atributos esenciales de la misma y, en consecuencia, se debería hacer referencia a las reivindicaciones adjuntas, más que a la especificación anterior, como se indica dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

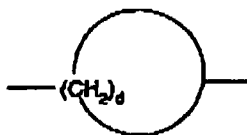
1. Un procedimiento para la preparación de los compuestos de Fórmula I



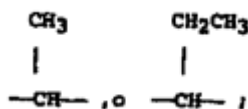
5 en la que
L es



o

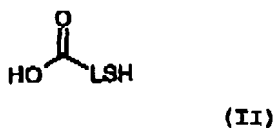


10 en la que
R₁ es H, metilo o etilo;
M es un enlace directo, CH₂,



15 a es 0 o un número entero de 1 a 9 cuando M es un enlace directo con la condición de que cuando M es uno o más átomos de carbono a es 0 o un número entero de 1 a 8;
d es un número entero de 3 a 8; y
2 es H o SR₂, en el que R₂ es alquilo lineal, alquilo ramificado, alquilo cíclico, arilo, arilo sustituido o heterocíclico; que comprende las etapas de:

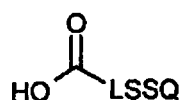
(1) la reacción de una sal de un ácido mercaptoalcanoico de Fórmula II



20 en la que L es como se ha definido anteriormente;
y los tiolsulfonatos de Fórmula III



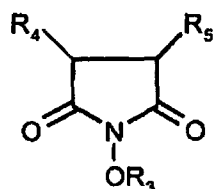
25 en la que Q es H, alquilo lineal, alquilo ramificado, alquilo cíclico, arilo, arilo sustituido o heterocíclico, en una reacción de formación de disulfuro en la que la sal sódica de un compuesto de Fórmula II en agua se añade lentamente a un compuesto de Fórmula III en tetrahydrofurano en un intervalo de temperatura entre aproximadamente -15 °C y aproximadamente -5 °C para formar los productos intermedios de Fórmula IV



(IV)

en la que L y Q son como se han definido anteriormente; y

(2) la reacción de un compuesto de Fórmula IV en una reacción de esterificación con un reactivo de acoplamiento de Fórmula V

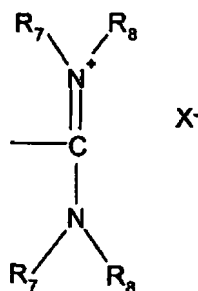


(V)

5

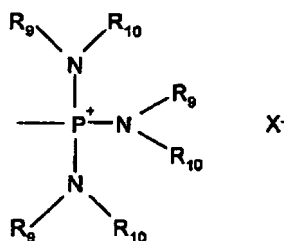
en la que

R₃ es H o sal de uronio sustituido de fórmula



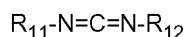
10

en la que X⁻ es PF₆⁻ o BF₄⁻, R₇ y R₈ son independientemente alquilo, cicloalquilo o (CH₂)_e, en el que e es un número entero de 3 a 8 con la condición de que cuando R₇ es (CH₂)_e, R₈ es un enlace directo o una sal de fosfonio sustituido de fórmula



15

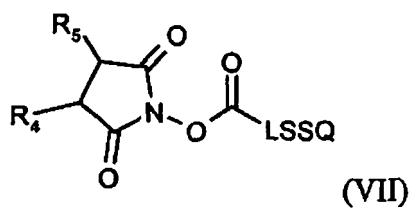
en la que X⁻ es PF₆⁻ o BF₄⁻, R₉ y R₁₀ son independientemente alquilo lineal, alquilo ramificado, cicloalquilo o heterocíclico; y R₄ y R₅ son independientemente H, alquilo lineal, alquilo ramificado, cicloalquilo, arilo, arilo sustituido o heterocíclico, o R₄ y R₅ tomados en conjunto forman un enlace, con la condición de que cuando R₃ es H, la reacción se lleva a cabo en presencia de un reactivo carbodiimida de Fórmula VI



en la que

20

R₁₁ y R₁₂ son independientemente alquilo lineal, alquilo ramificado, cicloalquilo, arilo, arilo sustituido o heterocíclico, o R₁₁ es etilo y R₁₂ es dimetilaminopropilo tal que el reactivo carbodiimida de Fórmula (VI) es hidrocloreuro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDCI.HCl) y adicionalmente con la condición de que si R₃ es una sal de uronio o de fosfonio, la reacción se lleva a cabo en presencia de una base, para formar los compuestos de Fórmula VII



en la que R₄, R₅, L y Q son como se han definido anteriormente; y
(3) la reacción de los compuestos de Fórmula VII con N-metil-L-alanina (Formula VIII)

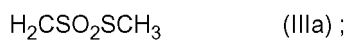


5 para formar un compuesto de Fórmula I.

2. El procedimiento de la reivindicación 1 en la que compuesto de Fórmula II tiene la estructura



el compuesto de Fórmula III tiene la estructura



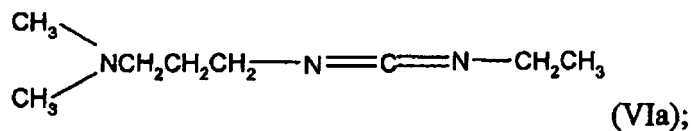
10 el compuesto de Fórmula IV tiene la estructura



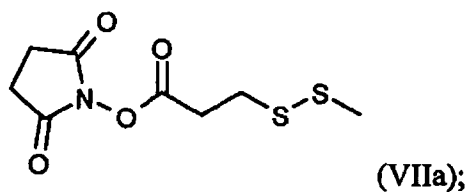
el compuesto de Fórmula V tiene la estructura



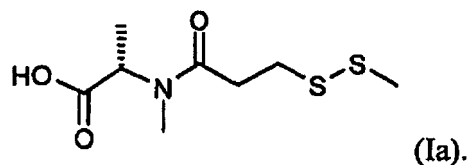
el compuesto de Fórmula VI tiene la estructura



15 el compuesto de Fórmula VII tiene la estructura



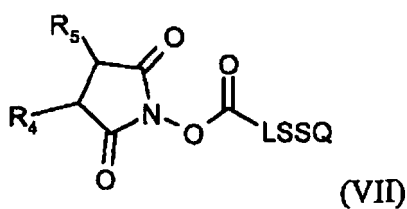
y
el compuesto de Fórmula I tiene la estructura



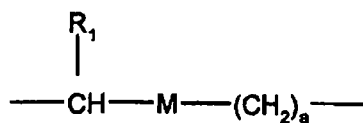
3. El procedimiento de la reivindicación 1 en la que el reactivo carbodiimida de Fórmula VI es hidrocloreto de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDCI-HCl) o dimetilaminopropilo o 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC).

4. El procedimiento de la reivindicación 3 en la que el reactivo carbodiimida de Fórmula VI es EDCI-HCl.

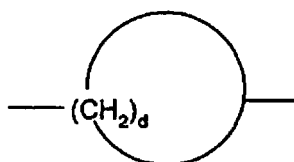
5. Un compuesto de Fórmula VII



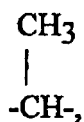
10 en la que
R₄ y R₅ son independientemente H, alquilo lineal, alquilo ramificado, alquilo cíclico, arilo, arilo sustituido o heterocíclico, o R₄ y R₅ tomados en conjunto forman un enlace



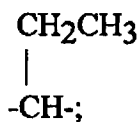
L es
o



15 en el que
R₁ es H, metilo o etilo;
M es CH₂,



20 o

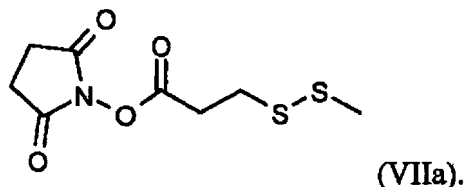


a es 0 o un número entero de 1 a 8;

d es un número entero de 3 a 8; y

Q es H, alquilo lineal, alquilo ramificado, alquilo cíclico, pirrolilo, furilo o tiofeno.

6. El compuesto de la reivindicación 5 que tiene la estructura



5 7. Un procedimiento para la preparación de los compuestos de Fórmula I que tienen la estructura desvelada en la reivindicación 1 que comprende la reacción de un compuesto de Fórmula VII que tiene la estructura desvelada en la reivindicación 1 con N-metil-L-alanina para formar un compuesto de Fórmula I.

8. Un procedimiento para la preparación de un complejo de agente aglutinante celular/maitansinoide que comprende las siguientes etapas:

- 10 (1) la preparación de un compuesto de Fórmula I mediante el procedimiento de la reivindicación 1 o de la reivindicación 7 y la esterificación del maitansinol con el compuesto de Fórmula I preparado de esta manera para formar un éster maitansinoide que contiene disulfuro;
- (2) la reducción del éster maitansinoide que contiene disulfuro preparado en la etapa (1) a un maitansinoide que contiene tiol;
- 15 (3) la introducción de grupos ditiopiridilo en un agente aglutinante celular; y
- (4) el enlace del maitansinoide que contiene tiol producido en la etapa (2) con el agente aglutinante celular de ditiopiridilo de la etapa (3) mediante un enlace disulfuro.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en la que el agente aglutinante celular es un anticuerpo.

20 10. Un procedimiento para la preparación de un complejo de agente aglutinante celular/maitansinoide que comprende la preparación de un compuesto de Fórmula I mediante el procedimiento de la reivindicación 7, usando dicho compuesto de Fórmula I para producir N-metil-L-alanina que contienen un derivado maitansinoide mediante la condensación del maitansinol con el compuesto recién preparado de Fórmula I y la conjugación de dicho derivado con un agente aglutinante celular.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en la que el agente aglutinante celular es un anticuerpo.