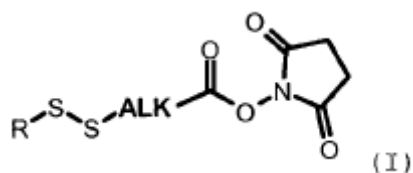


Traduzione Brevetto Europeo N. 2379501 a nome SANOFI,  
dal titolo: "PROCEDIMENTO DI PREPARAZIONE DI ESTERI  
ATTIVATI".

### Descrizione

La presente invenzione si riferisce alla  
preparazione di esteri attivati di formula (I):



nella quale R rappresenta un gruppo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alchile,  
arile, eteroarile, cicloalchile, eterocicloalchile e  
Alk rappresenta un gruppo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alchilene. Questi  
esteri attivati possono essere utilizzati nella  
preparazione di coniugati, vale a dire di anticorpi  
ai quali sono attaccati mediante legame covalente  
composti chimici biologicamente attivi come composti  
citotossici. Maggiori dettagli sulla chimica dei  
coniugati saranno trovati, per esempio, in Birch e  
Lennox, Monoclonal Antibodies: Principles and  
Applications, Cap. 4, Wiley-Liss, New York, N.Y.  
(1995).

### [Tecnica anteriore]

Il documento WO 2004/016801 descrive esteri  
attivati comprendenti un motivo nitro-succinimide.  
Le preparazioni di questi composti descritti nelle

figure da 1 a 6 si fondano su reazioni differenti da quella contemplata nella presente invenzione.

J. Med. Chem. 2006, 49(14), 4392-4408 descrive la preparazione di esteri attivati, in particolare il N-succinimidil-[4-metil-4-(metilditio)]pentanoato sullo schema 6, mediante reazioni differenti da quella contemplata nella presente invenzione.

Langmuir 2000, 16(1), 81-86 descrive sullo schema 1 la preparazione del succinimidil-3-(2-piridilditio)butirrato (SPDB) mediante accoppiamento dell'acido corrispondente con la N-idrossisuccinimide.

I documenti US 6407263, US 5872261, US 5892057 e US 5942628 descrivono esteri attivati e il loro modo di preparazione.

Can. J. Chem. 1982, 60, 976 descrive la preparazione del sale di dicicloesilammina della N-idrossisuccinimide (P<sub>2</sub>) mediante reazione tra dicicloesilammina e N-idrossisuccinimide in acetone. Questo composto ha per N° CAS 82911-72-6.

Can. J. Chem. 1986, 64(11), 2097-2102; J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1985, 4, 765-8; Bull. Soc. Chem. Jpn 1986, 59(8), 2505-8; Coll. Czech. Chem. Comm. 1985, 50(12), 2925-2936 descrivono la preparazione di esteri di succinimide a partire da sali di dicicloesilammina ma senza utilizzare

carbonato di disuccinimidile.

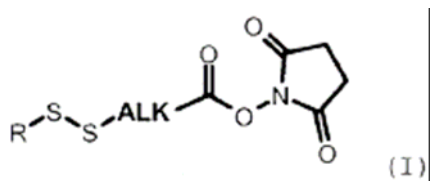
Tetrahedron Letters 1979, 49, 4745-4746 describe DSC e il suo interesse nella sintesi (si veda lo schema 2).

Biochem. J. 1978, 173, 723-737 describe la preparazione di esteri attivati in presenza di N-idrossisuccinimide e di dicicloesilcarbodiimide.

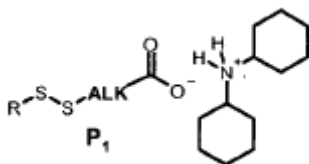
JACS 2003, 125(30), 8994-8995 fa riferimento al piano tecnologico anteriore.

**[Breve descrizione dell'Invenzione]**

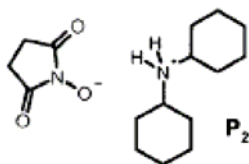
L'invenzione è relativa a un procedimento di preparazione di un estere attivato di formula (I):



nella quale R rappresenta un gruppo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alchile, lineare o ramificato, arile, eteroarile, cicloalchile, eterocicloalchile e Alk rappresenta un gruppo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alchilene, lineare o ramificato, che consiste nel far reagire il sale di dicicloesilammina P<sub>1</sub>:

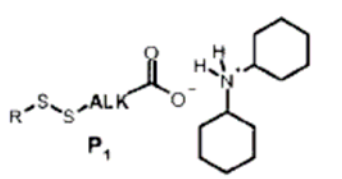


e il carbonato di disuccinimidile (DSC) in un solvente in cui il sale di dicicloesilammina della N-idrossisuccinimide P<sub>2</sub>

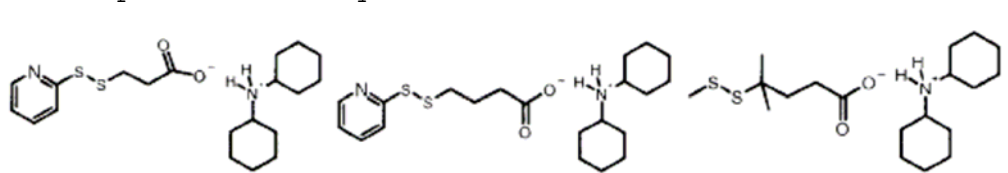


precipita.

L'invenzione è inoltre relativa ai prodotti di formula P<sub>1</sub>:



più in particolare quelli di formula:



[Descrizione dell'invenzione]

Definizioni

- gruppo alchile: un gruppo idrocarburico saturo, lineare o ramificato, ottenuto sottraendo un atomo di idrogeno da un alcano. In particolare si possono menzionare i gruppi seguenti: metile, etile, propile, butile, pentile, esile, 2-metilbutile, 2-metilpentile, 1-metilpentile;
- gruppo alchilene: un gruppo divalente ottenuto sottraendo due atomi di idrogeno da un alcano. In particolare, si possono menzionare i gruppi seguenti: metilene (-CH<sub>2</sub>-), etilene (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), n-propilene (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), butilene (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-);
- gruppo cicloalchile: un gruppo alchile aciclico

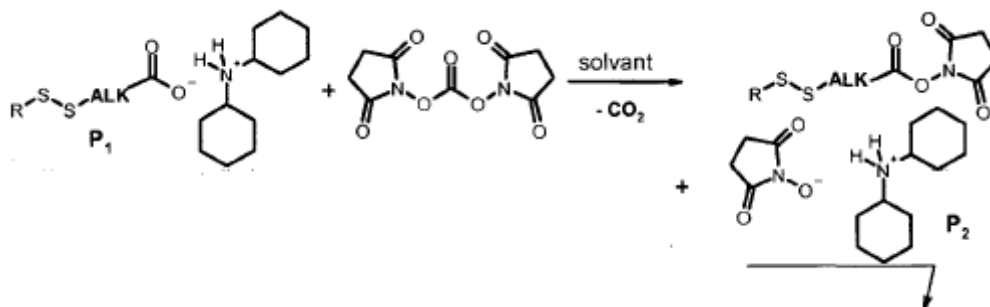
avente da 3 a 10 atomi di carbonio implicati nella struttura ciclica. In particolare, si possono menzionare i gruppi seguenti: ciclopropile, ciclo-pentile, cicloesile;

- gruppo arile: un gruppo aromatico da 6 a 10 atomi di carbonio. In particolare, si possono menzionare i gruppi seguenti: fenile, naftile, indenile, fluore-nile;

- gruppo eteroarile: un gruppo aromatico da 5 a 10 membri comprendente, come atomi che formano il ciclo, uno o più eteroatomi scelti tra O, S o N;

- gruppo eterocicloalchile: un gruppo cicloalchile come definito precedentemente comprendente inoltre come atomo(i) che forma(n) il ciclo, uno o più eteroatomi scelti tra N, O o S.

La preparazione si basa sulla reazione tra il sale di dicicloesilammina  $P_1$  e il carbonato di disuccinimidile (DSC) in un solvente in cui il sale di dicicloesilammina della N-idrossisuccinimide  $P_2$  precipita (**Schema I**).

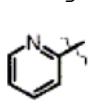


Schema I

(solvant - solvente)

R rappresenta un gruppo:

- (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alchile: per esempio un gruppo metile, etile, propile, butile o pentile, eventualmente ramificato;
- (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)cicloalchile: per esempio il gruppo ciclopropile;
- arile: per esempio il gruppo fenile;
- eteroarile: per esempio il gruppo 2-piridinile (



);

- eterocicloalchile: per esempio il gruppo piperidinile.

Alk rappresenta un gruppo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alchilene, per esempio un gruppo propilene, butilene o pentilene, eventualmente ramificato. Si tratta più in particolare del gruppo (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, dove n designa un numero intero da 1 a 6.

La funzione della dicicloesilammina è quella di promuovere la reazione e di insolubilizzare la N-idrossisuccinimide che è liberata. Questa reazione presenta i seguenti vantaggi:

- semplicità di attuazione: semplice messa a contatto, senza riscaldamento, liberazione lenta e controllata di CO<sub>2</sub>;
- essendo il composto P<sub>1</sub> sotto forma di carbossilato,

non è necessario aggiungere una base supplementare per attivare la reazione;

- il composto  $P_2$  che è liberato è soltanto molto poco solubile nel solvente impiegato e precipita. La maggior parte di  $P_2$  può quindi facilmente essere eliminata mediante una semplice separazione meccanica, per esempio una filtrazione;
- la reazione permette di ottenere facilmente l'estere attivato con una buona resa e una buona purezza.

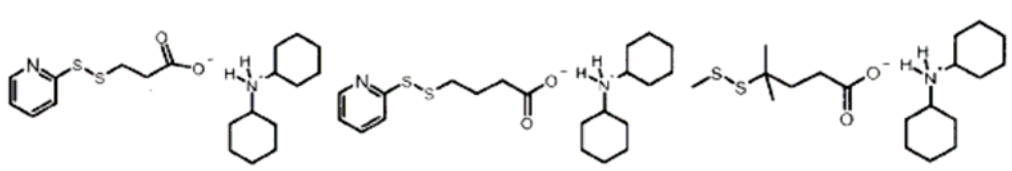
$P_2$  è preparato mediante neutralizzazione dell'acido corrispondente tramite la dicicloesilammina. Il DSC è un prodotto commerciale.

Il solvente è un chetone che presenta meno problemi tossicologici rispetto ai solventi abitualmente utilizzati per questo tipo di reazione (diclorometano o dimetilformammide). Il chetone può essere, per esempio, acetone o metil-isobutil-chetone (MIBK). MIBK è preferito perché, essendo poco miscibile con acqua (1,55% p/p a 20°C), permette un lavaggio acquoso del prodotto, facilitando così l'eliminazione di  $P_2$  residuo. Esso permette anche di eliminare l'acqua residua mediante distillazione azeotropica. Infine, MIBK è un buon solvente dell'estere attivato ma non dei composti  $P_2$ ,  $P_1$  e di

DSC, il che permette una reazione lenta e controllata tra P<sub>1</sub> e DSC: i reagenti possono essere così miscelati inizialmente nella loro totalità senza che ciò ponga un problema in termini di sicurezza (reazione rapida con liberazione incontrollata di CO<sub>2</sub>).

La reazione è condotta a temperatura ambiente (circa 20°C). P<sub>2</sub> può precipitare spontaneamente in alcuni solventi. Al fine di favorire la precipitazione di P<sub>2</sub> si può, dopo aver fatto reagire P<sub>1</sub> e DSC, raffreddare la miscela di reazione (per esempio a una temperatura vicina a 0°C).

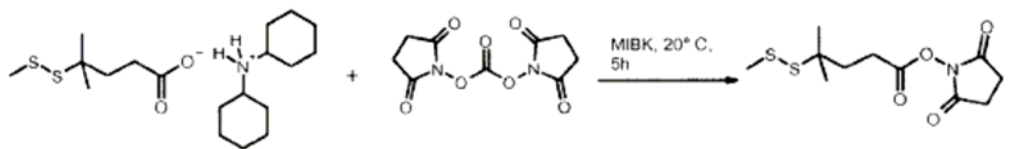
Questa reazione permette in particolare di preparare gli esteri attivati seguenti: il N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP), il N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-butirrato (SPDB) o il N-succinimidil-[4-metil-4-(metilditio)]pentanoato partendo dai sali di acido corrispondenti, vale a dire rispettivamente:



### [Esempi]

#### Esempio 1: Preparazione di N-succinimidil-[4-metil-4-(metilditio)]pentanoato

La reazione è la seguente:



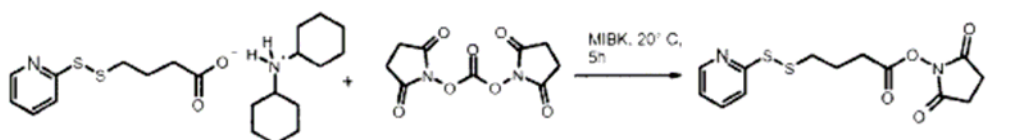
Una sospensione del sale di dicicloesilammina dell'acido 4-metil-4-(metilditio)pentanoico (23 g) e di DSC (18,2 g, 1,1 eq.) in 161 ml di MIBK viene agitata a circa 20°C per 5 ore. La sospensione viene poi raffreddata a circa 0°C, agitata per 1 ora a questa temperatura e poi filtrata.

Il solido viene lavato con 2 x 23 ml di MIBK. Le fasi organiche vengono riunite, lavate con 2 x 58 ml di una soluzione acquosa di HCl 6N, e poi con 92 ml di acqua demineralizzata. La fase organica viene poi concentrata a secco sotto vuoto. Il solido risultante viene solubilizzato in 230 ml di diclorometano (DCM) e la soluzione risultante viene trattata con 46 g di silice, agitata per 10 minuti, e la silice viene poi filtrata e lavata con 2 x 69 ml di DCM. Questa operazione viene ripetuta una seconda volta. La fase organica viene quindi concentrata a circa 2 volumi, poi, a circa 20°C, 391 ml di n-eptano vengono aggiunti in circa 30 minuti. La sospensione bianca risultante viene agitata a questa temperatura per circa 1 ora, raffreddata a circa -10°C in circa 1 ora, poi agitata a questa temperatura per circa 1

ora. Il solido viene poi filtrato, lavato con 2 x 23 ml di n-eptano raffreddato a circa -10°C e poi essiccato sotto vuoto a 40°C per 15 ore. Il 4-N-idrossisuccinimidil-[4-metil-4-(metilditio)]pentanoato viene isolato con una resa del 70,6%. La sua purezza determinata mediante HPLC è del 99,65% (escluso solventi).

**Esempio 2: Preparazione di N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-butirrato (SPDB)**

La reazione è la seguente:



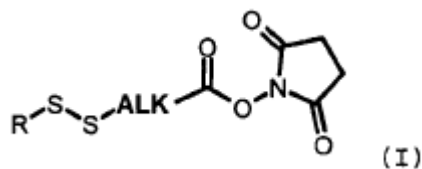
Il sale di dicicloesilammina (40 g, 1 eq.) e il DSC (28,7 g, 1,1 eq.) vengono messi in sospensione in 280 ml di MIBK. La miscela viene agitata per 4 ore a 20±3°C. La sospensione viene raffreddata a 0±3°C, lasciata per 30 minuti a questa temperatura, filtrata e il solido ottenuto viene lavato con MIBK ghiacciato (120 ml). I liquidi madre vengono lavati con acqua (3x176 ml) ed evaporati a secco sotto pressione ridotta con rotavapor con un bagno a 50°C fino a ottenere una quantità di MIBK ≤ 2,5%. Il SPDB grezzo è ottenuto sotto forma di olio giallo.

Il SPDB (32,5 g) è successivamente disciolto in etanolo (455 ml) a 35±2°C. La soluzione ottenuta

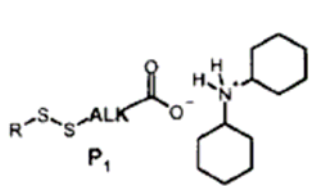
viene raffreddata a  $18 \pm 2^\circ\text{C}$ : il SPDB puro comincia a cristallizzare. 90 ml di n-eptano vengono aggiunti in 10 minuti, la cristallizzazione si intensifica. La miscela viene raffreddata a  $0 \pm 3^\circ\text{C}$  e 820 ml di n-eptano vengono aggiunti in 20 minuti. La miscela viene agitata per 1 ora a  $0 \pm 3^\circ\text{C}$ . Il SPDB puro viene isolato mediante filtrazione, lavato con 2 x 90 ml di n-eptano ghiacciato ed essiccato con essiccatore ( $30^\circ\text{C}$ , 50 mbar). Resa. 84,8%, purezza HPLC: 98,7%.

**Rivendicazioni**

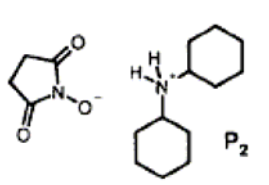
1. Procedimento di preparazione di un estere attivato di formula (I)



nella quale R rappresenta un gruppo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alchile, lineare o ramificato, arile, eteroarile, cicloalchile, eterocicloalchile e Alk rappresenta un gruppo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alchilene, lineare o ramificato, che consiste nel far reagire il sale di dicicloesilammina P<sub>1</sub>



e il carbonato di disuccinimide (DSC) in un solvente in cui il sale dicicloesilammina della N-idrossisuccinimide P<sub>2</sub>



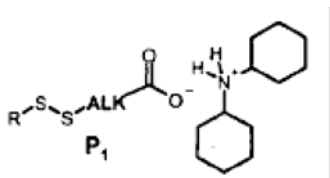
precipita, in cui il suddetto solvente è un chetone.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui R rappresenta un gruppo metile, etile, propile, butile o pentile, eventualmente ramificato o il

gruppo 2-piridinile.

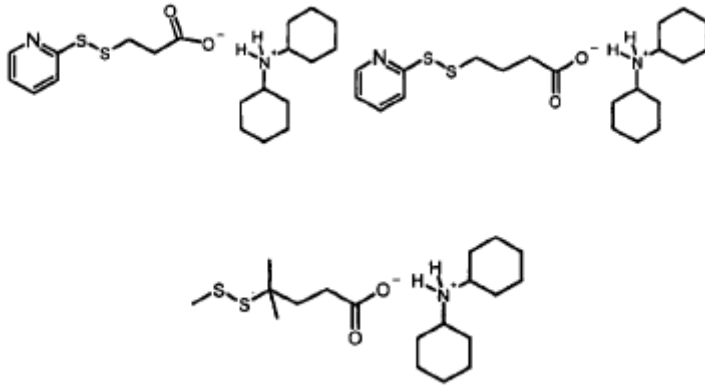
3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui Alk rappresenta un gruppo propilene, butilene o pentilene, eventualmente ramificato.
4. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui Alk rappresenta il gruppo  $(CH_2)_n$ , dove n designa un numero intero da 1 a 6.
5. Procedimento secondo la rivendicazione 1 in cui il chetone è MIBK.
6. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5 in cui, dopo aver fatto reagire  $P_1$  e DSC, la miscela di reazione viene raffreddata per favorire la precipitazione di  $P_2$ .
7. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 in cui  $P_2$  è eliminato mediante una separazione meccanica.
8. Procedimento secondo la rivendicazione 7 in cui la separazione meccanica è una filtrazione.

9. Prodotto di formula  $P_1$ :



nella quale R e Alk sono come definiti in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4.

10. Prodotto secondo la rivendicazione 9 di formula:



Dogana, 22/05/2014

In fede  
Il Mandatario  
Ing. Marco Montebelli  
USBM CPI 001