



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2379501 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

C07D 207/46 (2006.01)
C07D 213/71 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)

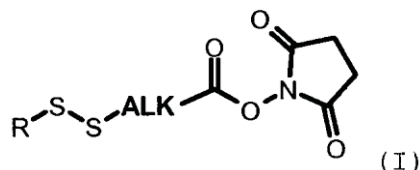
Patentstyret

(45)	Oversettelse publisert:	2014.06.02
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet:	2014.01.22
(86)	Europeisk søknadsnr:	09802171.0
(86)	Europeisk innleveringsdag:	2009.12.15
(87)	Den europeiske søknadens publiseringsdato:	2011.10.26
(30)	Prioritet	2008.12.17, FR, 0807090
(84)	Utpekte stater:	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA RS
(73)	Innehaver:	SANOFI, 54, rue La Boétie, 75008 Paris, FR-Frankrike
(72)	Oppfinner:	BIGOT, Antony, c/o sanofi-aventisDépartement Brevets174 avenue de France, F-75013 Paris, FR-Frankrike
(74)	Fullmektig	Plougmann & Vingtoft, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse:	FREM GANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV AKTIVERTE ESTERE
(56)	Anførte publikasjoner:	WO-A-2004/016801 TOKUTAKE NOBUYA ET AL: "Detection of unusual lipid mixing in cholesterol-rich phospholipid bilayers: the long and the short of it." JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 30 JUL 2003, vol. 125, no. 30, 30 juillet 2003 (2003-07-30), pages 8994-8995, XP002528896 ISSN: 0002-7863 CARLSSON J ET AL: "PROTEIN THIOLATION AND REVERSIBLE PROTEIN-PROTEIN CONJUGATION N-SUCCINIMIDYL 3-(2-PYRIDYLDITHIO)PROPIONATE, A NEW HETEROBIFUNCTIONAL REAGENT" BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, vol. 173, no. 3, 1 janvier 1978 (1978-01-01), pages 723-737, XP001146511 ISSN: 0264-6021 OGURA ET AL: "A NOVEL ACTIVE ESTER SYNTHESIS REAGENT" TETRAHEDRON LETTERS, vol. 49, 1979, pages 4745-4746, XP002528897

FREMGANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV AKTIVERTE ESTERE

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører fremstilling av aktiverte estere med formelen (I):



i hvilken R er en (C-C)alkyl-, aryl-, heteroaryl-, sykloalkyl- eller heterosykloalkylgruppe og Alk er en (C-C)alkylengruppe. Disse aktiverte esterene kan anvendes i fremstillingen av konjugater, dvs. antistoffer til hvilke biologisk aktive forbindelser, slik som cytotoxiske forbindelser, er bundet ved

kovalent binding. Mer informasjon om konjugatkjemi finnes for eksempel i Birch and Lennox, Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Chap. 4, Wiley-Liss, New York, N.Y. (1995).

[Kjent teknikk]

WO 2004/016801 beskriver aktiverte estere omfattende en nitrosuksinimidenhet. Fremstillingene av disse forbindelsene beskrevet i figurene 1 til 6 er basert på andre reaksjoner enn dem som er betraktet i den foreliggende oppfinnelsen.

J. Med. Chem. 2006, 49(14), 4392–4408 beskriver fremstillingen av aktiverte estere, særlig N-suksinimidyl-[4- metyl-4-(metylditio)]pentanoat på skjema 6, ved hjelp av andre reaksjoner enn dem som er betraktet i den foreliggende oppfinnelsen.

Langmuir 2000, 16(1), 81–86 beskriver på skjema 1 fremstillingen av suksinimidyl-3-(2-pyridylditio)butyrat (SPDB) ved kobling av den tilsvarende syren med N-hydroksysuksinimid.

US 6407263, US 5872261, US 5892057 og US 5942628 beskriver aktiverte estere og deres fremgangsmåte for fremstilling.

Can. J. Chem. 1982, 60, 976 beskriver fremstillingen av disykloheksylaminsaltet av N-hydroksysuksinimid (P) ved reaksjon mellom disykloheksylamin og N-hydroksysuksinimid i aceton. Denne forbindelsen har CAS-nr. 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 beskriver fremstillingen av suksinimidestere fra disykloheksylaminsalter, men uten å bruke disuksinimidylkarbonat.

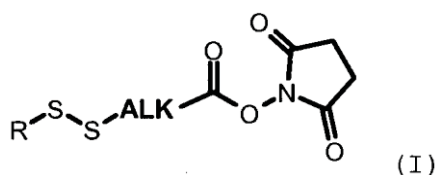
Tetrahedron Letters 1979, 49, 4745–4746 beskriver DSC og dets verdi i syntese (se skjema 2).

Biochem. J. 1978, 173, 723–737 beskriver fremstillingen av aktiverte estere i nærvær av N-hydroksysuksinimid og disykloheksylkarbodiimid.

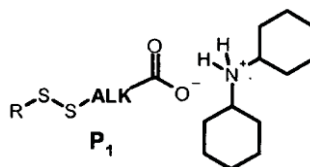
JACS 2003, 125(30), 8994–8995 er del av den tekniske bakgrunnen.

[Kort beskrivelse av oppfinnelsen]

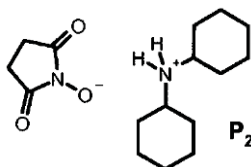
Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av en aktivert ester med formelen (I):



i hvilken R er en rettkjedet eller forgrenet (C-C)alkyl-, aryl-, heteroaryl-, sykloalkyl- eller heterosykloalkylgruppe og Alk er en rettkjedet eller forgrenet (C-C)alkylengruppe som omfattende reaksjon av disykloheksylaminsaltet P :

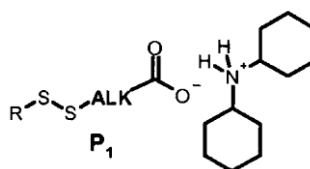


og disuksinimidylkarbonatet (DSC) i et løsemiddel i hvilket disykloheksylaminsaltet av N-hydroksysuksinimid P

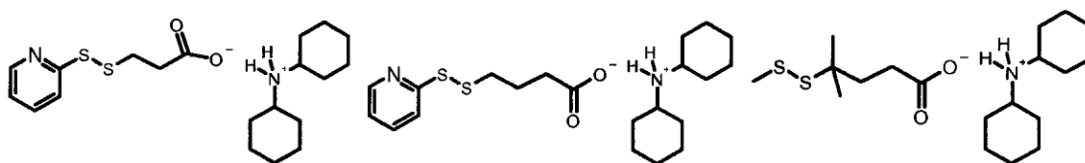


felles ut.

Oppfinnelsen vedrører også produktene med formelen P:



nærmere bestemt dem med formelen:



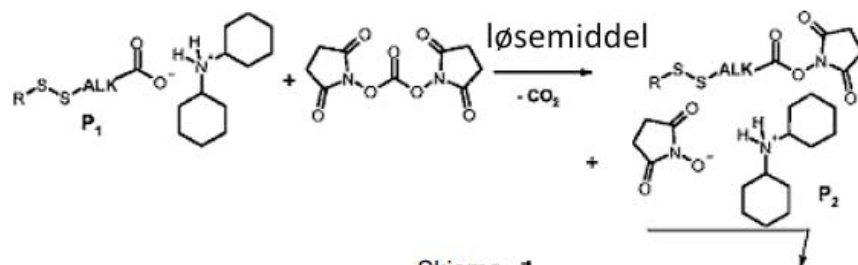
[Beskrivelse av oppfinnelsen]

Definisjoner

- alkylgruppe: en rettkjedet eller forgrenet, mettet alifatisk hydrokarbonbasert gruppe som oppnås ved fjerning av et hydrogenatom fra et alkan. Nevnes kan særlig følgende grupper: metyl, etyl, propyl, butyl, pentyl, heksyl, 2-metylbutyl, 2-metypentyl, 1-metypentyl;
- alkylengruppe: en divalent gruppe som oppnås ved fjerning av to hydrogenatomer fra et alkan. Nevnes kan særlig følgende grupper: metylen (-CH-), etylen (-CHCH-), n-propylen (-CHCHCH-), butylen (-CHCHCHCH-);
- sykloalkylgruppe: en asyklisk alkylgruppe som har fra 3 til 10 karbonatomer involvert i den sykliske strukturen. Nevnes kan særlig følgende grupper: syklopropyl, syklopentyl, sykloheksyl;
- arylgruppe: en aromatisk gruppe som har fra 6 til 10 karbonatomer. Nevnes kan særlig følgende grupper: fenyl, naftyl, indenyl, fluorenyl;
- heteroarylgruppe: en aromatisk gruppe som har fra 5 til 10 ringmedlemmer omfattende, som atomer som danner ringen, ett eller flere heteroatomer valgt fra O, S eller N;
- heterosykloalkylgruppe: en sykloalkylgruppe slik som definert ovenfor, også omfattende, som atom (s) som danner ringen, ett eller flere heteroatomer valgt fra N, O eller S.

Fremstillingen er basert på reaksjonen mellom disykloheksylaminsaltet P og disuksinimidylkarbonatet

(DSC) i et løsemiddel i hvilket disykloheksylaminsalt av N-hydroksysuksinimid P_2 felles ut (**skjema 1**).



Skjema 1

R er:

- en (C-C)alkylgruppe: for eksempel en metyl-, etyl-, propyl-, butyl- eller pentylgruppe, som eventuelt er forgrenet;
- en (C-C)sykloalkylgruppe: for eksempel syklopropylgruppen;
- arylgruppe: for eksempel fenylgruppen;



- heteroarylgruppen: for eksempel 2-pyridinylgruppen ();
- heterosykloalkylgruppen: for eksempel piperidinygruppen.

Alk er en (C-C)alkylengruppe, for eksempel en propylen-, butylen- eller pentylengruppe, som eventuelt er forgrenet. Det er nærmere bestemt $(CH)_n$ -gruppen, idet n betegner et heltall fra 1 til 6.

Disykloheksylaminets funksjon er å fremme reaksjonen og gjøre uløselig N-hydroksysuksinimid som frigjøres. Denne reaksjonen har følgende fordeler:

- Enkel implementering: enkel kontaktering, ingen oppvarming, langsam og kontrollert frigjøring av CO;
- siden forbindelsen P er i karboksylatform, er det ikke nødvendig å tilsette en ytterligere base for å aktivere reaksjonen;
- Forbindelsen P som frigjøres, er bare svært lite løselig i det anvendte løsemiddelet, og den felles ut. Mesteparten av P kan derfor uten videre fjernes ved enkel mekanisk separasjon, f.eks. filtrering;
- Reaksjonen gjør det mulig uten videre å oppnå den aktive esteren med godt utbytte og god renhet.

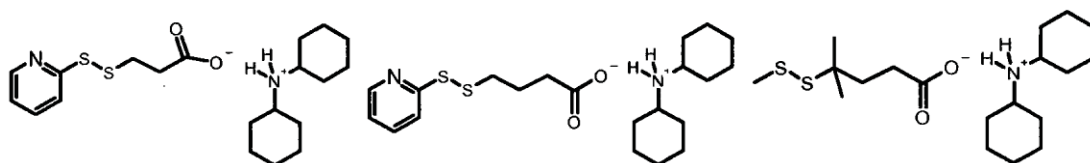
P fremstilles ved nøytralisering av den tilsvarende syren med disykloheksylamin. DSC er et kommersielt produkt.

Løsemiddelet er et keton som viser færre toksikologiske problemer enn løsemidlene som normalt benyttes for denne typen reaksjon (diklormetan eller dimetylformamid). Ketonet kan for eksempel være aceton

eller metylisobutylketon (MIBK). MIBK er foretrukket fordi siden det er lite blandbart i vann (1,55 % vekt/vekt ved 20 °C), gir det mulighet for

vandig vasking av produktet, hvilket således letter fjerning av resterende P. Det gjør det også mulig å fjerne restvann ved azeotropisk destillasjon. MIBK er til slutt et godt løsemiddel for den aktiverte esteren, men ikke for forbindelsene P, P og DSC, hvilket gir mulighet for en langsam og kontrollert reaksjon mellom P og DSC: Reaktantene kan således innledningsvis blandes i sin helhet uten at dette skaper problem med hensyn til sikkerhet (hurtig reaksjon med ukontrollert frigjøring av CO). Reaksjonen utføres ved omgivelsestemperatur (ca. 20 °C). P kan felles ut spontant i visse løsemiddel. For å fremme utfellingen av P er det mulig etter å ha reagert P og DSC å kjøle reaksjonsblandingen (f.eks. til en temperatur nær 0 °C).

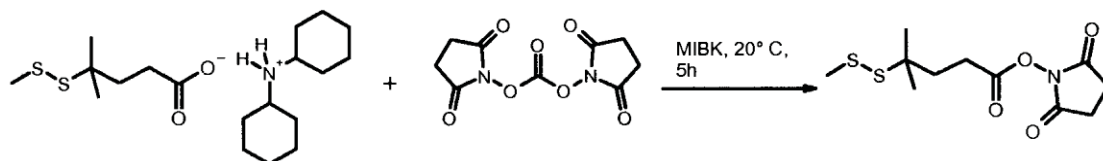
Denne reaksjonen gjør det særlig mulig å fremstille følgende aktiverte estere: N-suksinimidyl-3-(2-pyridylditio)-propionat (SPDP), N-suksinimidyl-3-(2-pyridylditio)-butyrat (SPDB) eller N-suksinimidyl-[4-metyl-4-(metylditio)]pentanoat fra de tilsvarende syresaltene, nemlig henholdsvis:



[Eksempel]

Eksempel 1: fremstilling av N-suksinimidyl-[4-metyl-4-(metylditio)]pentanoat

Reaksjonen er følgende:



En suspensjon av disykloheksylaminsalt av 4-metyl-4-(metylditio)pentanosyre (23 g) og DSC (18,2 g, 1,1 ek.) i 161 ml MIBK omrøres ved ca. 20 °C i 5 h. Suspensjonen kjøles deretter til ca.

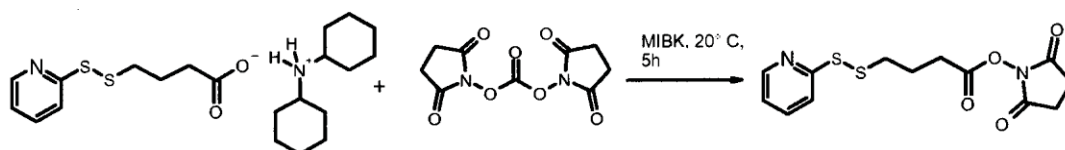
0 °C, omrøres i 1 h ved denne temperaturen og filtreres deretter.

Tørrestoffet vaskes med 2 x 23 ml MIBK. De organiske fasene kombineres og vaskes med 2 x 58 ml av en 6N vandig løsning av HCl og deretter med 92 ml demineralisert vann. Den organiske fasen konsentreres deretter til tørrhet under vakuum. Det resulterende tørrestoffet solubiliseres i 230 ml diklormetan (DCM), og den resulterende løsningen behandles med 46 g silika og omrøres i 10 min, og silikaen filtreres deretter og vaskes med 2 x 69 ml DCM. Denne operasjonen gjentas en gang til. Den organiske fasen konsentreres deretter til rundt halvparten av volumet, og deretter tilsettes 391 ml n-heptan ved ca. 20 °C i løpet av ca. 30 min. Den resulterende hvite suspensjonen omrøres ved denne temperaturen i ca. 1 h, kjøles til ca.

-10 °C i løpet av ca. 1 h og omrøres deretter ved denne temperaturen i ca. 1 h. Tørrestoffet filtreres deretter, vaskes med 2 x 23 ml n-heptan kjølt til ca. -10 °C og tørkes deretter under vakuum ved 40 °C i 15 h. 4-N-hydroksysuksinimidyl-[4-metyl-4-(metylditio)]pentanoatet isoleres med et utbytte på 70,6 %. Dens renhet, bestemt ved HPLC, er 99,65 % (ekskl. løsemiddel).

Eksempel 2: fremstilling av N-suksinimidyl-3-(2-pyridylditio)-butyrat (SPDB)

Reaksjonen er følgende:

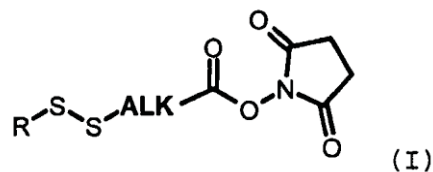


Disykloheksylaminsaltet (40 g, 1 ek.) og DSC (28,7 g, 1,1 ek.) suspenderes i 280 ml MIBK. Blandingen omrøres i 4 h ved 20 ± 3 °C. Suspensjonen kjøles til 0 ± 3 °C, etterlates i 30 min ved denne temperaturen og filtreres, og det oppnådde tørrestoffet vaskes med iskaldt MIBK (120 ml). Morvæskene vaskes med vann (3 x 176 ml) og fordampes til tørrhet under redusert trykk på en roterende fordampner med et bad ved 50 °C inntil en mengde av MIBK ≤ 2,5 % oppnås. Det rå SPDB oppnås i form av en gul olje.

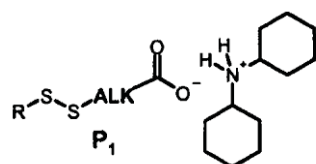
SPDB (32,5 g) oppløses deretter i etanol (455 ml) ved 35 ± 2 °C. Den oppnådde løsningen kjøles til 18 ± 2 °C: Det rene SPDB begynner å krystalliseres. 90 ml n-heptan tilsettes i løpet av 10 min, krystalliseringen intensifiseres. Blandingen kjøles til 0 ± 3 °C, og 820 ml n-heptan tilsettes i løpet av 20 min. Blandingen omrøres i 1 h ved 0 ± 3 °C. Det rene SPDB isoleres ved filtrering, vaskes med 2 x 90 ml iskald n-heptan og tørkes i en ovn (30 °C, 50 mbar). Utbytte: 84,8 %, HPLC-renhet: 98,7 %.

Patentkrav

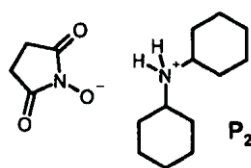
1. Fremgangsmåte for fremstilling av en aktivert ester med formelen (I)



i hvilken R er en rettkjedet eller forgrenet (C-C)alkyl-, aryl-, heteroaryl-, sykloalkyl- eller heterosykloalkylgruppe og Alk er en rettkjedet eller forgrenet (C-C)alkylengruppe, omfattende reaksjon av disykloheksylaminsaltet P

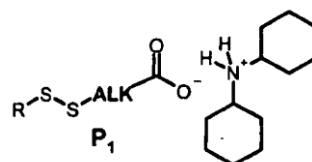


og disuksinimidylkarbonatet (DSC) i et løsemiddel i hvilket disykloheksylaminsaltet av N-hydroksysuksinimid P



felles ut, i hvilket løsemiddelet er et keton.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, i hvilken R er en metyl-, etyl-, propyl-, butyl- eller pentylgruppe, som eventuelt er forgrenet, eller 2-pyridinylgruppen.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, i hvilken Alk er en propylen-, butylen- eller pentylengruppe, som eventuelt er forgrenet.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, i hvilken Alk er (CH)_n-gruppen, idet n betegner et heltall fra 1 til 6.
5. Fremgangsmåte ifølge krav 1, i hvilken ketonet er MIBK.
6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, i hvilken etter å ha reagert P og DSC reaksjonsblandingen kjøles for å fremme utfellingen av P.
7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, i hvilken P fjernes ved mekanisk separasjon.
8. Fremgangsmåte ifølge krav 7, i hvilken den mekaniske separasjonen er filtrering.
9. Produkt med formelen P:



i hvilket R og ALK er slik som definert i et av kravene 1 til 4.

10. Produkt ifølge krav 9 med formelen:

