



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 494**

51 Int. Cl.:
C07H 15/248 (2006.01)
C07C 49/755 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08157069 .9**
96 Fecha de presentación : **28.05.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2128170**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.2009**

54 Título: **Procedimiento para la glucosidación de colchicina y tiocolchicina.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.04.2011

73 Titular/es: **INDENA S.p.A.**
Viale Ortles, 12
20132 Milano, IT

72 Inventor/es: **Besant, Stephen y**
Gabetta, Bruno

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 356 494 T3

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).

DESCRIPCIÓN

CAMPO TÉCNICO

La presente invención desvela un procedimiento para la preparación de glucósidos de colchicina y tiocolchicina y derivados de los mismos.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La colchicina (I, $R_1 = R_2 = \text{OMe}$) es un alcaloide ampliamente usado durante un largo periodo de tiempo en la terapia para el tratamiento de la gota. Además, la colchicina es un agente antiblástico muy potente que actúa bloqueando la formación del huso mitótico en la división celular; esta propiedad se ha investigado minuciosamente para observar cualquier actividad antitumoral, y se han preparado un gran número de derivados de colchicina para este fin. La colchicina y la tiocolchicina (I, $R_1 = \text{SMe}$, $R_2 = \text{OMe}$) son los materiales de partida útiles para la preparación de un serie de fármacos activos.

El glucósido 3-O-demetil-tiocolchicina, o tiocolchicósido (I, $R_1 = \text{SMe}$, $R_2 = \beta\text{-D-O-glucosilo}$), es un principio activo de uso importante destacable en el campo farmacéutico, principalmente en la terapia de enfermedades del sistema músculo-esquelético. El glucósido 3-O-demetilcolchicina, o colchicósido (I, $R_1 = \text{OMe}$, $R_2 = \beta\text{-D-O-glucosilo}$), también es conocido y está dotado con actividades farmacológicas.

Por lo tanto, serán importantes los procedimientos eficaces para la glucosidación de compuestos de tipo colchicina, para facilitar la preparación de ambos compuestos y derivados novedosos para su uso en la investigación farmacológica.

El documento FR 2112131 desvela un procedimiento para la glucosidación de tiocolchicina que comprende la reacción de bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosilo con demetil-tiocolchicina. Este procedimiento no es satisfactorio debido al bajo rendimiento y al tiempo requerido para el procedimiento extenso y articulado.

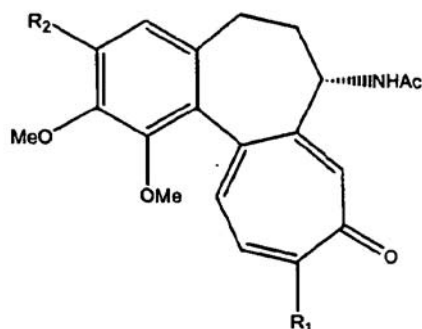
El documento US 5777136 describe un procedimiento de glucosidación que implica el uso de fluoruros de azúcar protegidos, en particular derivados de 1-fluoroglucosa y 1-fluorofucosa protegidos. El procedimiento descrito, en particular, se restringe a la preparación de derivados 3-O-glucosilo o 3-O-fucosilo de colchicina y tiocolchicina. Incluso si los rendimientos que se han descrito son satisfactorios, este procedimiento requiere la preparación de derivados de azúcar activados adecuados, es decir, fluoruros de azúcar, lo que significa una etapa adicional en la síntesis y la preparación y almacenamiento de reactivos de estabilidad relativa.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

El procedimiento de la invención se basa en el uso de derivados de 1-acetil azúcar protegidos y en particular azúcares peracetilados como alternativa a 1-halobazúcares, como

agentes de glucosilación para sustratos de colchicina o tiocolchicina. Estos compuestos están entre los derivados de monosacáridos más simples, baratos y definitivamente estables y su uso es ventajoso para la síntesis de colchinoides de glucosilo.

5 Por lo tanto, la invención se refiere a un procedimiento para preparar compuestos que tienen la fórmula I:

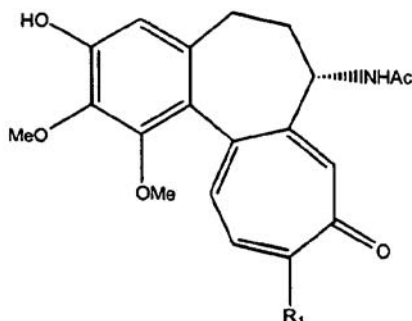


Fórmula I

en la que:

- R₁ es un grupo metoxi o metiltilio;
- R₂ es un resto O-glucosiloxi.

10 El procedimiento para la preparación de los compuestos de fórmula I comprende la reacción de un azúcar 1-acetilado protegido con un compuesto que tiene la fórmula II:



Fórmula II

15 en la que R₁ es como se ha definido anteriormente seguido de la escisión de cualquier grupo protector presente en el resto glucosilo. Los 1-acetil-glucósidos están protegidos normalmente por grupos éster, típicamente grupos acetilo, y por lo tanto la etapa final del procedimiento de la invención es la eliminación de los grupos acetilo protectores.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 La invención implica la reacción de un 1-acetil-azúcar con un compuesto que tiene la fórmula II. Después, el producto obtenido se somete a escisión de los grupos protectores presentes en el resto de glucosa para formar un glucósido de colchicina o tiocolchicina que tiene la fórmula I, en la que:

- R₁ es un grupo metoxi o metiltio;
- R₂ es un resto O-glucosilo.

La reacción de glucosidación se realiza preferentemente en un disolvente seleccionado entre acetonitrilo, nitrometano, hidrocarburos halogenados y mezclas de los mismos. Se prefiere particularmente el uso de acetonitrilo. La reacción se realiza en presencia de un ácido de Lewis, preferentemente trifluoruro de boro, durante un tiempo que varía de 15 minutos a 6 horas, preferentemente de 30 minutos a 2 horas, a temperaturas de 0°C a la temperatura de reflujo del disolvente, preferentemente a temperatura ambiente, en una atmósfera inerte. También se requiere la presencia de una base orgánica para que se desarrolle la reacción.

También se requiere la presencia de una base orgánica para que se desarrolle la reacción. Se prefiere particularmente el uso de 1,1,3,3-tetrametilguanidina. El procedimiento de la invención tiene la ventaja de que se proporciona de forma estereoselectiva sólo uno de los dos isómeros anoméricos posibles. En particular, en el caso de los azúcares que pertenecen a la gluco-serie (sustituyente C-2 ecuatorial, como en D-glucosa, D-galactosa y D-xilosa) se obtiene selectivamente el isómero β -(1,2-trans). Con azúcares que pertenecen a la manno-serie (sustituyente C-2 axial, como en L-ramnosa) como material de partida, se forma exclusivamente el isómero α -(1,2-trans). La eliminación de los grupos protectores puede realizarse mediante hidrólisis básica en medios acuosos, especialmente cuando el intermedio de glucósido de peracetilo no se aísla, o mediante desplazamiento nucleófilo, por ejemplo con aminas secundarias, tales como dimetilamina, dietilamina, pirrolidina, piperidina o similares.

Es también un objetivo específico de la presente invención un procedimiento mejorado para la síntesis del tiocolchicósido o la 3-O- β -D-glucopiranosil-3-O-demetiltiocolchicina bien conocidos.

El procedimiento de la invención proporciona una diversidad de ventajas sobre los procedimientos conocidos para la preparación de colchicina y tiocolchicina o derivados de los mismos. Estas ventajas incluyen:

- la derivación de la preparación de un reactivo de glucosilo activado adecuado, tal como el 1-halo-azúcar;
- el uso de 1-acetil-protégidos-glucosos preparadas de forma fácil y estable (por ejemplo peracetilglucosos);
- la posibilidad de cristalizar el producto final directamente a partir de la mezcla de reacción en bruto;
- la preparación de colchinoides de glucósido obtenidos difícilmente con procedimientos de la técnica anterior, tales como galactósidos, ramnósidos, etc.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran la invención con mayor detalle.

1) Síntesis de tiocolchicósido (3-O-β-D-glucopiranosil-3-O-demetiltiocolchicina)

5 Se suspendió 3-O-demetiltiocolchicina (2,0 g) en acetonitrilo (20 ml) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente seguido de la adición secuencial de 1,1,3,3-tetrametilguanidina (1,8 ml), una solución de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-β-D-glucopiranososa (5,60 g) en acetonitrilo (10 ml) y finalmente trifluoruro de boro (7,2 ml).

10 La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después se enfrió a 5°C y se inactivó mediante la adición de KOH 2 M a un pH ≈ 6 (aproximadamente 20 ml). La fase acuosa se separó y se extrajo con acetonitrilo (10 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron secuencialmente con NaHSO₄ 0,5 M (20 ml), NaHCO₃ al 6% (20 ml) y salmuera (20 ml).

El disolvente se retiró al vacío y se reemplazó por etanol al 95% (30 ml). Se añadió NaOH 2 M (40 ml) y la solución se agitó hasta que se completó (aproximadamente 2 horas).

15 Se añadió NaHSO₄ 1 M a un pH = 7 y después el etanol se retiró por evaporación al vacío.

20 La fase acuosa se extrajo dos veces con diclorometano (2 x 20 ml), la fase orgánica se extrajo de nuevo con agua (20 ml) y después se desechó. Las fases acuosas combinadas se extrajeron con una mezcla 1:1 de diclorometano-etanol hasta que se completó la extracción de tiocolchicósido. La fase orgánica se lavó con una solución de NaCl al 20% (30 ml), después se concentró, dando 20 ml, y se dejó cristalizar en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. El producto se recogió por filtración. Se obtuvieron 2,00 g de tiocolchicósido (rendimiento del 71%) con datos físicos y espectroscópicos idénticos a los indicados en la bibliografía.

2) Síntesis de 3-O-β-D-galactopiranosil-3-O-demetiltiocolchicina

25 Se suspendió 3-O-demetiltiocolchicina (1,0 g) en acetonitrilo (10 ml) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente seguido de la adición secuencial de 1,1,3,3-tetrametilguanidina (0,9 ml), una solución de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-β-D-galactopiranososa (2,80 g) en acetonitrilo (10 ml) y finalmente trifluoruro de boro (3,6 ml).

30 La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después se enfrió a 5°C y se inactivó mediante la adición de NaOH 2 M a un pH = 6 (aproximadamente 10 ml). La fase acuosa se separó y se extrajo con acetonitrilo (10 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron secuencialmente con NaHSO₄ 1 M (10 ml), NaHCO₃ al 6% (10 ml) y salmuera (10 ml).

35 El disolvente se retiró al vacío y se reemplazó por etanol al 95% (20 ml). Se añadió NaOH 2 M (20 ml) y la solución se agitó hasta que se completó (aproximadamente 2 horas).

Se añadió NaHSO_4 0,5 M a un pH = 7 y después el etanol se retiró por evaporación al vacío.

La fase acuosa se extrajo dos veces con diclorometano (2 x 20 ml), la fase orgánica se extrajo de nuevo con agua (20 ml) y después se recogió. Las fases acuosas combinadas se extrajeron con una mezcla de 1:1 de diclorometano-etanol hasta que se completó la extracción de tiocolchicósido. La fase orgánica se lavó con una solución de NaCl al 20% (20 ml), después el disolvente se reemplazó por metanol, se concentró dando 15 ml y se dejó cristalizar en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. El producto se recogió por filtración. Se obtuvieron 855 mg de producto (rendimiento del 61%), p.f. = 255-6°C.

RMN ^1H (DMSO-d_6) δ (ppm): 1,86 (1H, m); 1,87 (3H, s); 2,06 (1H, m); 2,24 (1 H, m); 2,43 (3H, s); 2,55 (1 H, m); 3,45 (1 H, m); 3,57 3H, s); 3,60 (1 H, m); 3,62 (1 H, m); 3,67 (1 H, m); 3,74 (1 H, m); 3,87 (3H, s); 4,36 (1 H, m); 4,52 (1 H, d, J = 4,4 Hz); 4,68 (1 H, t, J = 5,7 Hz); 4,85 (1 H, d, J = 5,7 Hz); 4,91 (1 H, d, J = 7,8 Hz); 5,14 (1H, d, J = 5,6 Hz); 6,88 (1H, s); 7,04 (1H, s); 7,17 (1H, d, J = 10,7 Hz); 7,29 (1H, d, J = 10,7 Hz); 8,60 (1H, d, J = 7,3 Hz).

EM $^+$ (m/z): 1149,0 [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 1126,7 [$2\text{M}+\text{H}$] $^+$, 586,3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 564,2 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 402,2 [$\text{M-gal}+\text{H}$] $^+$.

3) Síntesis de 3-O- α -L-ramnopiranosil-3-O-demetilcolchicina

Se suspendió 3-O-demetilcolchicina (2,0 g) en acetonitrilo (20 ml) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente seguido de la adición secuencial de 1,1,3,3-tetrametilguanidina (1,8 ml), una solución de 1,2,3,4-tetra-O-acetil-P-L-ramnopiranosil (4,77 g) en acetonitrilo (10 ml) y finalmente trifluoruro de boro (8,4 ml).

La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, después se enfrió a 5°C y se inactivó mediante la adición de NaOH 2 M a pH \approx 6. La fase acuosa se separó y se extrajo con acetonitrilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron secuencialmente con NaHSO_4 1 M, NaHCO_3 al 6% y salmuera.

El disolvente se eliminó al vacío y se reemplazó por etanol al 95% (20 ml). Se añadió NaOH 2 M (15 ml) y la solución se agitó hasta que se completó (aproximadamente 2 horas).

Se añadió NaHSO_4 1 M a pH = 7 y después el etanol se evaporó al vacío.

La fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 20 ml), la fase orgánica se extrajo de nuevo con agua (20 ml) y después se desechó. Las fases acuosas combinadas se extrajeron con una mezcla 1:1 de diclorometano-etanol hasta que se completó la extracción de tiocolchicósido. La fase orgánica se lavó con una solución al 20% de NaCl (30 ml), después el disolvente se reemplazó por metanol, se concentró, dando 15 ml y se dejó cristalizar en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. El producto se recogió por filtración. Se obtuvieron 2,03 g de 3-O- α -L-ramnopiranosil-3-O-demetilcolchicina (rendimiento del 78%),

p.f. = 254-5°C.

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ (ppm): 1,19 (3H, d, J = 6,6 Hz); 1,87 (1H, m); 1,88 (3H, s); 2,04 (1 H, m); 2,22 (1 H, m); 2,44 (3H, s); 2,61 (1 H, m); 3,35 (1 H, m); 3,59 (3H, s); 3,70 (1 H, m); 3,71 (1 H, m); 3,85 (3H, s); 4,35 (1 H, m); 4,82 (1 H, d, J = 5,7 Hz); 4,94 (1H, d, J = 5,7 Hz); 5,12 (1H, d, J = 4,3 Hz); 5,39 (1H, d, J = 1,8 Hz); 6,88 (1H, s); 7,05 (1H, s); 7,16 (1H, d, J = 10,7 Hz); 7,29 (1H, d, J = 10,7 Hz); 8,68 (1H, d, J = 7,5 Hz).

EM⁺ (m/z): 1117,1 [2M+Na]⁺, 570,3 [M+Na]⁺, 548,2 [M+H]⁺, 402,2 [M-ra+H]⁺.

4) Síntesis de 3-O-β-D-xilopiranosil-3-O-demetilcolchicina

Se suspendieron 15,0 g de 3-O-demetilcolchicina en 140 ml de acetonitrilo en agitación en una atmósfera de nitrógeno.

Se añadieron 13,5 ml de 1,1,3,3-tetrametilguanidina que convirtió la mezcla en una solución de color rojo intenso. Se añadió una solución de 34,3 g de tetraacetato de D-xilosa en 60 ml de acetonitrilo y finalmente se añadieron gota a gota 45 ml de BF₃Et₂O manteniendo la temperatura interna a aproximadamente 20°C. La solución se agitó durante 2 h hasta que se completó, después se enfrió a 5°C y se ajustó a pH ~7 con 120 ml de NaOH 2 M.

Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo de nuevo con 25 ml de acetonitrilo. La fase orgánica se lavó secuencialmente con 50 ml de NaHSO₄ 1 M, 60 ml de NaHCO₃ al 5% y finalmente con 50 ml de salmuera. La fase orgánica se concentró, dando un volumen de 150 ml, se añadieron 50 ml de *tert*-butilmetil éter y la mezcla se dejó cristalizar a temperatura ambiente durante 1 h. El sólido se recogió por filtración, se lavó con 40 ml de 1:1 de acetonitrilo-*tert*-butilmetil éter y se secó, produciendo 19,8 g de 3-O-β-D-(2',3',4'-triacetil)xilopiranosil-3-O-demetilcolchicina.

Se suspendieron 19,4 g de este intermedio en 300 ml de metanol, se añadieron 16 ml de dietilamina y la mezcla se calentó a 40°C durante 2 h hasta que se completó.

La solución resultante se concentró, dando un volumen de 110 ml y se dejó cristalizar durante 1 h a temperatura ambiente. El sólido se recogió por filtración, se lavó con 25 ml de metanol y se secó, produciendo 13,7 g de producto (rendimiento global: al 70%), p.f. = 233-4°C.

IR cm⁻¹: 3295, 2940, 2867, 1636, 1601, 1558, 1507, 1480, 1424, 1348, 1317, 1074, 1029, 870, 594.

RMN ¹H (DMSO-d₆) δ (ppm): 1,86 (1H, m); 1,87 (3H, s); 2,04 (1H, m); 2,24 (1H, m); 2,43 (3H, s); 2,61 (1H, m); 3,28 (1H, m); 3,31 (1H, m); 3,33 (1H, m); 3,43 (1H, m); 3,57 (3H, s); 3,82 (1H, dd, J = 11,2 Hz, 5,1 Hz); 3,86 (3H, s); 4,36 (1 H, m); 4,98 (1 H, d, J = 7,2 Hz); 5,08 (1 H, d, J = 4,8 Hz); 5,11 (1 H, d, J = 4,8 Hz); 5,34 (1H, d, J = 5,7 Hz); 6,86 (1H, s); 7,05 (1H, s); 7,16 (1H, d, J = 10,7 Hz); 7,28 (1H, d, J = 10,7 Hz); 8,60 (1H, d, J = 7,3 Hz).

EM⁺ (m/z): 1067,7 [2M+Na]⁺, 1066,5 [2M+H]⁺, 556,2 [M+Na]⁺, 534,2 [M+H]⁺, 402,2 [M-

xil+H]⁺.

5) Síntesis de 3-O-β-D-xilopiranosil-3-O-demetilcolchicina

Se suspendieron 2,0 g de 3-O-demetilcolchicina en 18 ml de acetonitrilo en agitación en una atmósfera de nitrógeno.

5 Se añadieron 1,9 ml de 1,1,3,3-tetrametilguanidina, que convirtió la mezcla en una solución de color rojo intenso. Se añadió una solución de 4,9 g de tetraacetato de D-xilosa en 10 ml de acetonitrilo y finalmente se añadieron gota a gota 5,2 ml de BF₃Et₂O manteniendo la temperatura interna a aproximadamente 20°C. La solución se agitó durante 2 h hasta que se completó, después se enfrió a 5°C y se ajustó a pH ~7 con NaOH 2 M.

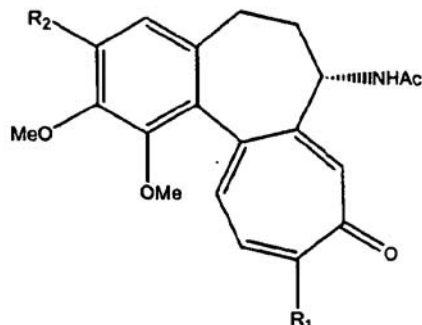
10 Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo de nuevo con 10 ml de acetonitrilo. La fase orgánica se lavó secuencialmente con NaHSO₄ 1 M, NaHCO₃ al 5% y finalmente con salmuera. El disolvente se reemplazó por metanol (30 ml), se añadieron 6,4 ml de dietilamina y la mezcla se calentó a 40°C durante 2 h hasta que se completó.

15 El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna con 85:15 de DCM:MeOH. Las fracciones que contenían el producto se recogieron y el disolvente se eliminó, produciendo 2,29 g de un producto amorfo (rendimiento global: al 86%).

20 RMN ¹H (DMSO-d₆) δ (ppm): 1,86 (1H, m); 1,87 (3H, s); 2,03 (1H, m); 2,23 (1H, m); 2,59 (1H, m); 3,28 (1H, m); 3,31 (1H, m); 3,33 (1H, m); 3,42 (1 H, m); 3,55 (3H, s); 3,81 (1 H, dd, J = 10,8 Hz, 5,0 Hz); 3,86 (3H, s); 3,90 (3H, s); 4,35 (1H, m); 4,97 (1H, d, J = 7,2 Hz); 5,06 (1H, d, J = 4,6 Hz); 5,10 (1H, d, J = 4,8 Hz); 5,33 (1H, d, J = 5,3 Hz); 6,84 (1H, s); 7,04 (1H, d, J = 10,7 Hz); 7,12 (1H, d, J = 10,7 Hz); 7,15 (1H, s); 8,60 (1H, d, J = 7,3 Hz), EM⁺ (m/z): 1056,8 [2M+Na]⁺, 540,3 [M+Na]⁺, 518,2 [M+H]⁺, 386,2 [M-xil+H]⁺.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de compuestos que tienen la fórmula I:

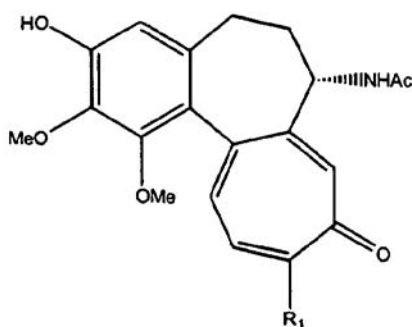


Fórmula I

en la que:

- 5 - R₁ es un grupo metoxi o metiltio;
 - R₂ es un resto O-glucosiloxi;

comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar de una 1-acetil-glucosa protegido con un compuesto que tiene la fórmula II:



Fórmula II

- 10 en la que R₁ es como se ha definido anteriormente seguido de la eliminación de los grupos protectores del resto de glucosilo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dichos 1-acetil-azúcares, de la serie D o L, están protegidos con grupos éster.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 en el que los grupos éster son
- 15 grupos acetilo.
4. El procedimiento de la reivindicaciones 1-3 en el que dichos grupos protectores se escinden mediante hidrólisis básica.
5. El procedimiento de las reivindicaciones 1-3 en el que dichos grupos protectores se escinden a través de desplazamiento nucleófilo por la reacción con una amina.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la reacción se realiza en un disolvente seleccionado entre el grupo que consiste en acetonitrilo, nitrometano, hidrocarburos

halogenados y mezclas de los mismos.

7. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la reacción se realiza en presencia de un ácido de Lewis.
8. El procedimiento de la reivindicación 7 en el que el ácido de Lewis es trifluoruro de boro.
- 5 9. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la reacción se realiza en presencia de una base orgánica.
10. El procedimiento de la reivindicación 9 en el que dicha base es 1,1,3,3-tetrametilguanidina.