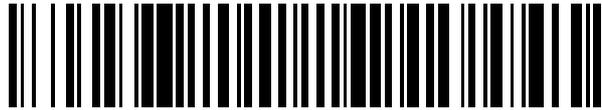


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 023**

51 Int. Cl.:

C07D 213/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2012 E 12700573 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 2668161**

54 Título: **Método y sustancias para la preparación de compuestos de piridinio N-sustituídos**

30 Prioridad:

26.01.2011 EP 11152201

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.02.2015

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**GEBAUER, PETER;
HEINDL, DIETER y
HORN, CARINA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 529 023 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

Método y sustancias para la preparación de compuestos de piridinio N-sustituídos

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a un método para la síntesis de compuestos de piridinio 3-acilados N-sustituídos por reacción de un precursor pentametilina con una amina primaria. En esta reacción se forma un heterociclo de piridinio 3-acilo N sustituido.

10 Los compuestos de piridinio son de especial interés, por ejemplo, en el diseño de fármacos, o como productos intermedios generales para las síntesis orgánicas, especialmente en la síntesis de productos naturales (Cheng, W.-C. y Kurth, M.J., Organic Preparations and Procedures International 34 (2002) 585-608). Algunos de los compuestos de piridinio sustituidos de acuerdo con la presente invención son de gran utilidad en la síntesis de NAD y derivados de los mismos, así como en la síntesis de análogos de NAD y derivados de los mismos, respectivamente.

La ruta sintética estándar en la producción de compuestos de piridinio sustituido es a través de la alquilación de derivados de piridina. Sin embargo, esta reacción es sólo conveniente cuando se usan haluros de alquilo primarios. Cuando se usan haluros de alquilo secundarios o terciarios, la eliminación se produce como una reacción secundaria no deseada y los rendimientos son generalmente bajos. Además, cuando la alquilación se lleva a cabo con haluros de alquilo con el átomo de halógeno unido a un átomo de carbono asimétrico puede ocurrir racemización durante la reacción de desplazamiento nucleofílico.

25 Todas estas limitaciones se superan mediante el uso de la "reacción Zincke", que se basa en la reacción de sales de Zincke con aminas de alquilo o arilo. Las sales de Zincke son sales de piridinio activadas que son capaces de reaccionar con una amina primaria (R-NH₂), en el que en el nitrógeno de la posición 2 o 6, respectivamente, se induce la apertura del anillo que a su vez es seguida por el cierre del anillo en un compuesto de piridinio R-sustituido. La reacción Zincke también se puede realizar con hidrazinas, hidroxilaminas e hidrazidas de ácidos carboxílicos. Estos tipos de reacciones Zincke se utilizan para la síntesis orgánica en fase sólida y en solución (Eda, M. et al., J. Org. Chem. 65 (2000) 5131-5135).

En la técnica la manera predominante para la preparación de las sales Zincke deseadas es mediante la reacción de un derivado de piridina con 2,4 dinitro halobenzol preferiblemente con 2,4 dinitroclorobenzol y 2,4 dinitrobromobenzol.

35 Como es evidente de la anterior descripción del estado de los procesos en la técnica, los reactivos de activación utilizados actualmente son o tóxicos, explosivos o peligrosos y por lo tanto se limitan a aplicaciones de investigación a pequeña escala. Existen intentos dispersos para llevar a cabo la reacción Zincke de una manera respetuosa del medio ambiente, por ejemplo, mediante el uso de la síntesis asistida por microondas. Sin embargo, este intento todavía se basa en compuestos dinitrofenilo explosivos y no es posible escalar este método sin tomar medidas de precaución caras (Vianna, G.H.R. et al., Letters in Organic Chemistry 5 (2008) 396-398).

Otra limitación importante del método Zincke es el hecho de que los reactivos pobres en electrones como las piridinas 3-acil sustituidas apenas reaccionan con bencenos 2,4-dinitro halogenados en las correspondientes sales Zincke (Genisson, Y. et al., Synlett. 5 (1992) 431-434).

Por lo tanto existe una gran necesidad de mejorar la síntesis de compuestos de acilo piridinio N-sustituídos, por ejemplo, evitando los reactivos de activación peligrosos. Nuevos métodos menos críticos permitirán procedimientos de producción más seguros y una producción más fácil, menos arriesgada y más eficiente de estos compuestos a escala mucho mayor.

Se sabe que diversos derivados de 2-alquilaminopentadienimino reaccionan con NH₄OAc o aminas primarias (R-NH₂) en condiciones ácidas en las correspondientes piridinas 3-alquiladas, respectivamente, compuestos de piridinio-sustituídos con 1-R-3-alquilo. Los compuestos 2-alquilaminopentadienimino requeridos son accesibles a partir de derivados N-tercbutilimino de aldehídos, desprotonados con LDA y se hacen reaccionar con cloruro de vinamidinio (Wypych, J.C. et al., J. Org. Chem. 73 (2008) 1169-1172).

Sin embargo, la utilidad de este método es desafortunadamente limitado. No pueden introducirse grupos reactivos, tales como funciones de acilo, en la posición 2 del sistema de aminopentadienimino, lo que, por ejemplo, sería un requisito previo para la síntesis de compuestos de piridinio sustituido con 1-R-3-acilo.

Sorprendentemente, se ha encontrado que algunas de las desventajas de los procedimientos de la técnica anterior se pueden superar mediante el uso de las sustancias y métodos como se describe en la presente invención. En un método de acuerdo con la presente invención primero se proporciona un compuesto aminopentadieniminio. La posterior reacción de este compuesto con una amina primaria (R₆-NH₂) conduce al compuesto de piridinio correspondiente que en la posición 1 está sustituido con R₆. El método descrito en el presente documento a

continuación evita los reactivos de activación crítica antes mencionados. Por otra parte la formación de los derivados de piridinio N-sustituidos es casi cuantitativo y se puede escalar fácilmente.

En base a todos estos hallazgos muchos de los problemas conocidos de la técnica se pueden evitar y superar.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un método para la síntesis de un compuesto de 3-acil-piridinio N-sustituido que comprende los pasos de a) proporcionar una sal de acilo pentametinio b) hacer reaccionar la sal de pentametinio del paso (a) con una amina primaria y c) obteniendo de este modo un compuesto de 3-acil-piridinio N-sustituido.

Esta aproximación es muy útil en la síntesis de derivados acilados de NAD y análogos de NAD, como carba-NAD (= cNAD), respectivamente.

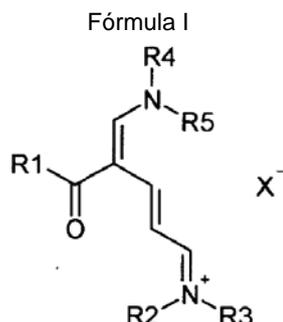
También se describen nuevos compuestos acilo pentametinio.

Descripción detallada de la invención

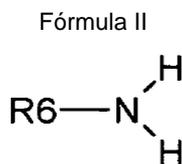
En una primera realización, la presente invención se refiere a un método para la síntesis de un compuesto 3-alquilcarbonilo, 3-arilcarbonilo o 3-heteroarilcarbonilo de piridinio N-sustituido que comprende los pasos de a) proporcionar una sal de acilo pentametinio b) hacer reaccionar la sal de pentametinio del paso (a) con una amina primaria, y c) obtener de esta manera un compuesto 3-alquilcarbonilo, 3-arilcarbonilo o 3-heteroarilcarbonilo de piridinio N-sustituido.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un método para la síntesis de un compuesto 3-alquilcarbonilo, 3-arilcarbonilo o 3-heteroarilcarbonilo de piridinio N-sustituido que comprende los pasos de

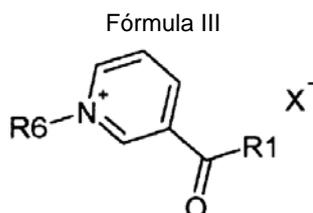
a) proporcionar una sal de pentametinio de acuerdo con la Fórmula I,



en donde X⁻ es un contraión, R1 se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo, arilo y heteroarilo, y R2 a R5 son independientemente metilo o etilo, b) hacer reaccionar la sal de pentametinio del paso (a) con una amina primaria de fórmula II,



en el que R6 es lineal, ramificado, o alquilo cíclico, opcionalmente sustituido, c) obteniendo de este modo un compuesto de piridinio N-sustituido de la Fórmula III,



en el que X⁻, R1 y R6 son como se definen anteriormente.

Los contraiones adecuados y preferidos (X⁻) son dodecil sulfato, cloruro, PF₆⁻, BF₄⁻ y ClO₄⁻. Preferiblemente, el contraión es dodecil sulfato, tetrafluorofosfato o tetrafluoroborato.

5 En una realización, el término alquilo comprende residuos alquilo C1-C10 lineales, ramificados y cíclicos. En una realización, el término arilo se refiere a residuos arilo con 6 a 30 átomos de C. Arilo es por ejemplo fenilo o naftilo o un policíclico aromático condensado superior con un número total de hasta 5 anillos de benceno fusionados. En una realización, el grupo heteroarilo de la presente invención tiene en total 6 a 30 átomos (6-30 átomos). El heteroarilo comprende preferiblemente hasta 5 heteroátomos, seleccionados de S, O y N. Heteroarilo es, por ejemplo furanilo, tiofenilo y piridilo o imidazolilo que puede estar condensado en un anillo arilo, por ejemplo, como en quinolina o benzofurano.

En una forma de realización alquilo es alquilo C1-C10, arilo es arilo C6-C30 y heteroarilo es un heteroarilo de 6 a 30 átomos (=heteroarilo de 6-30 átomos).

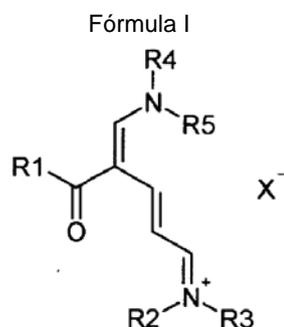
15 Cualquier alquilo, arilo o heteroarilo puede estar sustituido con cualquier sustituyente que sea inerte bajo las condiciones de reacción dadas. Para un experto en la materia es estándar la selección de dicho sustituyente inerte.

El método de acuerdo con la presente invención es apropiado para producir alquilcarbonilo, arilcarbonilo, así como compuestos de piridinio heteroarilcarbonilo.

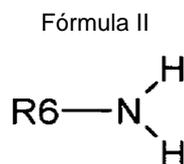
20 En una realización, el método de acuerdo con la presente invención se practica con un compuesto pentametinio de acuerdo con la Fórmula I, en donde R1 es metilo, etilo, propilo, butilo o isopropilo. En una realización, la presente invención se refiere al uso de una sal de pentametinio en un método de acuerdo con la presente invención, en el que R1 es CH₃, es decir, a la producción de un compuesto de piridinio 3-acetil-N sustituido.

25 En una realización, el método de acuerdo con la presente invención se practica con un compuesto pentametinio de acuerdo con la Fórmula I, en el que R2 a R5 son metilo.

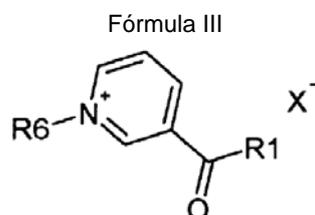
30 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un método para la síntesis de un compuesto de piridinio 3-alquilcarbonilo N-sustituido que comprende los pasos de (a) proporcionar una sal de pentametinio de acuerdo con la Fórmula I,



35 en donde X⁻ es un contraión, R1 es alquilo C1 - C10, R2 a R5 son independientemente metilo o etilo, b) hacer reaccionar la sal de pentametinio del paso (a) con una amina primaria de fórmula II,



40 en el que R6 es alquilo opcionalmente sustituido lineal, ramificado o cíclico, c) obteniendo de este modo un compuesto de piridinio N-sustituido de fórmula III,



en el que X⁻, R1 y R6 son como se han definido anteriormente.

Como se definió anteriormente, R6 es preferiblemente es alquilo opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, o cíclico. En una realización preferida alquilo es un alquilo C1-C6 lineal, o un alquilo C3 - C6 ramificado, o un alquilo C5 - C6 cíclico, o el alquilo sustituido es un alquilo sustituido C1 - C6 lineal, o un alquilo sustituido C3 - C6 ramificado, o un alquilo sustituido C5 - C6 cíclico. Preferiblemente, el compuesto de acuerdo con la Fórmula II es una amina de alquilo lineal o ramificado o es una furanosilamina o una ciclopentilamina. En una realización R6 es un residuo furanosilo o ciclopentilo.

Se ha encontrado sorprendentemente que la síntesis de acuerdo con la presente invención tiene rendimientos muy altos del producto deseado. Por lo tanto, a pesar de las condiciones básicas no se observaron reacciones secundarias significativas con la función acilo ácida CH.

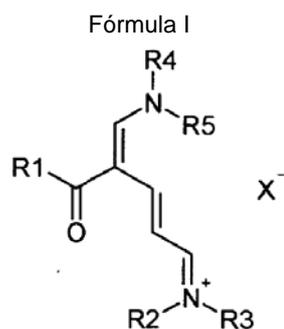
El método de acuerdo con la presente invenciones es especialmente útil en la síntesis de derivados de piridinio acilo. Nosotros, por ejemplo, encontramos que, por ejemplo, la sal de pentametinio 5-dimetilamino-4-acetil-penta-2,4-dieniliden-dimetilamonio tetrafluoroborato se cicla con diferentes aminas primarias (R-NH₂) en un paso con el correspondiente compuesto de piridinio 1-R-3-acil-sustituido. Usando este método, es posible, por ejemplo, obtener 3-acetil-1-[2,3-bishidroxi-4-(fosfonooxi)metil-ciclopentil]piridinio, por ejemplo, como una sal de diisopropiletilamonio. Este compuesto es un excelente precursor en la síntesis del derivado de 3-acetilo de carbaNAD (= cNAD).

En una realización, el método de acuerdo con la presente invención se practica con la amina primaria de acuerdo con la Fórmula II siendo 3-amino-5-(fosfonooximetil)-1,2-ciclo-pentanodiol. Este compuesto de acuerdo con la Fórmula II también se conoce como 2,3-dihidroxi-4-fosfono-oximetil-1-aminociclopentano o como mono- (4-amino-2,3-dihidroxi-ciclopentilmetilo) éster de ácido fosfórico. El experto en la materia apreciará que este compuesto y los otros compuestos preferidos relacionados, se proporcionan convenientemente en forma de sales de diamonio.

En una realización, el método de acuerdo con la presente invención se practica con la amina primaria de acuerdo con la Fórmula II siendo (1R,2S,3R,4R) -2,3-dihidroxi-4-fosfono-oximetil-1-aminociclopentano.

En una realización, el método de acuerdo con la presente invención se practica con la amina primaria de acuerdo con la Fórmula II siendo (1R,2S,3R,4R) -2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-1-aminociclopentano.

Sorprendentemente, se ha encontrado que es posible producir y proporcionar, por ejemplo, por el método descrito en la sección de Ejemplos, nuevos compuestos pentametinio para el público. En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula I,



en donde X⁻ es un contraión, R1 se selecciona entre el grupo que consiste de alquilo C1 - C10, arilo C6 - C30 y heteroarilo con 6 a 30 átomos y R2 a R5 son independientemente metilo o etilo.

En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto pentametinio de acuerdo con la Fórmula I, en donde R1 es alquilo C1-C10.

En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto pentametinio de acuerdo con la Fórmula I, en donde R1 se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo e isopropilo.

En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto pentametinio de acuerdo con la Fórmula I, en donde R1 es metilo.

El enfoque de los experimentos que figuran en la sección de Ejemplos estaba en la conversión de 5-dimetilamino-4-acetil-penta-2,4-dieniliden-dimetilamonio tetrafluoroborato sal de pentametinio con 3-amino-5- [(fosfonooxi)metil]-1,2-ciclo-pentanodiol sal de diamonio. Se ha encontrado que el aminoazúcar fosforilado reacciona casi cuantitativamente

con la sal de pentametinio, por ejemplo, en presencia de tetrafluoroborato como contraión, para obtener el derivado de piridinio 3-acetil-N sustituido.

5 El método presentado puede, sin embargo, extenderse a otras aminas primarias. El experto en la materia apreciará que tales aminas primarias pueden comprender otros sustituyentes que no interfieren con la reacción de ciclación. En una realización preferida, el compuesto R6-NH₂ es una alquilamina primaria sustituida.

10 Las alquilaminas primarias sustituidas preferidas para su uso en un método de acuerdo con la presente invención son los estereoisómeros puros de amino alcoholes y aminoácidos.

10 Preferiblemente un alcohol amino deriva de cualquier aminoácido natural o cualquier aminoácido no natural disponible en el mercado. Preferiblemente, el alcohol amino se selecciona del grupo que consiste de serinol, treoninol, fenilalaninol, 2,5-diamino-1-pentanol (de ornitina), 2,6-diamino-1-hexanol (de lisina).

15 En el caso que el compuesto de acuerdo con la Fórmula II sea un aminoácido, el aminoácido se puede seleccionar de cualquier aminoácido de origen natural o de cualquier aminoácido no natural. En una realización preferida, el aminoácido es un aminoácido de origen natural o bien un aminoácido de origen no natural, preferentemente comercialmente disponible. Preferiblemente, el compuesto de acuerdo con la Fórmula II es un aminoácido seleccionado de serina, treonina, fenilalanina, ornitina, lisina y leucina.

20 Si se desea, en una realización alternativa adicional las di- o poliaminas en las que ningún grupo amino está protegido se puede hacer reaccionar con dos o más equivalentes de la sal de pentametinio, con el fin de formar compuestos di-piridinio o poli-piridinio.

25 Las aminas primarias también preferidas son las aminas sustituidas con restos de azúcar de furanosilo o análogos de tales porciones de azúcar de furanosilo, que opcionalmente están fosforiladas en un grupo OH o comprometen grupos hidroxilo protegidos, mientras que los grupos protectores son bencilo, acetal, sililo y tritilo o comprometen grupos F o metoxi en lugar de grupos OH. Preferiblemente se utiliza un azúcar de furanosilo o dichos análogos que son adecuados para la síntesis de NAD o mononucleósido de nicotinamida y análogos de los mismos.

30 El uso de furanosilaminas para la síntesis de NAD o mononucleósido de nicotinamida y análogos de los mismos se describe en detalle en las siguientes referencias: Kam, B.L. et al., *Biochemistry* 26 (1987) 3453-3461; Sicsic, S. et al., *European Journal of Biochemistry* 155 (1986) 403-407; Kam, B.L. and Oppenheimer, N.J., *Carbohydrate Research* 77 (1979) 275-280; and US 4.411.995.

35 Las furanosilaminas preferidas son los anómeros beta y alfa amino de D- y L-ribosa, xilosa y arabinosa.

40 También son preferidas las ciclopentilaminas, que son los carba análogos de furanosilaminas como las Beta-D-ribofuranosil aminas, 2-desoxiribofuranosilaminas, o 2,3-didesoxi ribosilfuranosilaminas es decir, (1R, 2S, 3R, 4R)-2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-1-aminociclopentano, (1S, 3R, 4R)-3-amino-4-hidroxi-ciclopentanometanol, o (1R-cis)-3-amino-ciclopentano-metanol.

45 El método descrito en la presente invención en una realización se utiliza en la síntesis el análogo de NAD carba-NAD (= cNAD) y de sus derivados, respectivamente. Es especialmente útil en la síntesis de los derivados acilados de cNAD. Carba-NAD y sus usos preferidos se describen en detalle en el documento WO 2007/012494. La descripción completa del documento WO 2007/012494 se incluye adjunto como referencia. En una realización preferida en un método de acuerdo con la presente invención una sal de pentametinio se hace reaccionar con una amina primaria, en la que dicha amina primaria es (1R, 2S, 3R, 5R)-3-amino-5-[(fosfonooxi) metil]-1,2-ciclopentandiol sal de diamonio. Reaccionando 5-dimetilamino-4-acetil-penta-2,4-dieniliden- dimetilamonio tetrafluoroborato con esta amina primaria conduce a la formación de (1R, 2S, 3R, 4R) 3-acetil-1-[2,3-bishidroxi-4-(fosfonooxi)metil-ciclopentil]piridinio (sal de diisopropiletamonio), que es la clave para la síntesis del análogo de acetilo para cNAD (Acetil-cNAD refiere a un compuesto donde el grupo carboxamido está sustituido por un grupo acetilo). CarbaNAD y los análogos y sus usos preferidos se describen en detalle en el documento WO 2007/012494. La descripción completa del documento WO 2007/012494 se incluye adjunto como referencia.

55 Otras aminas primarias sustituidas preferidas se seleccionan de 3-amino tetrahidrofuranos o 3-aminopirolidinas protegidos, por ejemplo, (2R, 4R)-4-aminotetrahidrofuran-2-metanol (un análogo heterocíclico de 2,3-didesoxiribosilamina) ciclohexilaminas y ciclohex-2-enilaminas, por ejemplo, análogos de azúcares de 6 anillos como se describe por Goulioukina, N. et al., *Helvetica Chimica Acta* 90 (2007) 1266-1278.

60 Los ejemplos preferidos de amino azúcares fosforilados son (1R, 4S, 6S)-4-amino-6-hidroxi-2-ciclohexeno-1-metanol-1-(dihidrógeno fosfato), 2-amino-1,5-anhidro-2-desoxi-6-(dihidrógeno fosfato) D-altritol, 2-amino-1,5-anhidro-2,3-didesoxi-y 6-(dihidrógeno fosfato) D-arabino-hexitol.

65 Como el experto en la materia apreciará se puede utilizar incluso aminas primarias que tienen un sustituyente principalmente nucleófilo adicional. En este caso el grupo nucleófilo adicional tiene que estar protegido por un grupo

protector apropiado. Los grupos protectores son bien conocidos en la técnica y revisados en los libros de texto estándar (Greene, TW, Protective groups in organic synthesis, John Wiley & Sons, Inc. (1981) Nueva York, Chichester, Brisbane, Toronto). Preferiblemente, los grupos amino están protegidos por grupos protectores Boc, ftaloil- o trifluoroacetil-, los grupos mercapto se protegen como disulfuro.

También se ha encontrado sorprendentemente por los inventores que la longitud de onda de emisión se desplaza hacia longitudes de onda más largas (400 nm), en comparación con formas NAD no aciladas y / o cNAD. Esta es una ventaja significativa con el fin de evitar la interferencia a partir de compuestos auto-fluorescentes comprendidos en las muestras (biológicas).

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del espíritu de la invención.

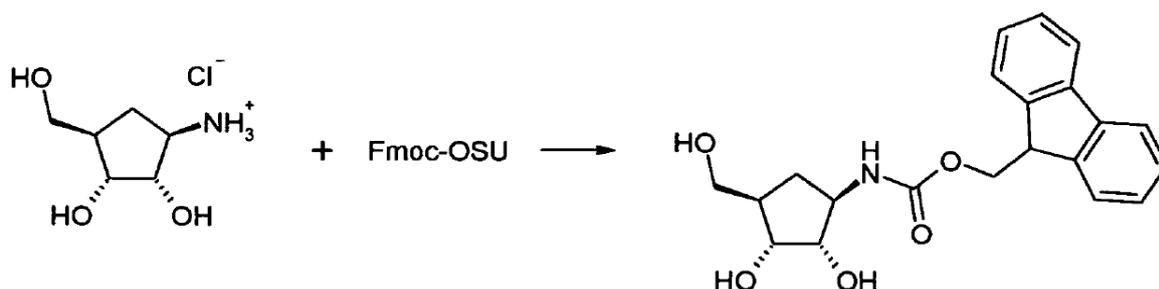
Descripción de la figura:

Figura 1: La Figura 1 ilustra los espectros de absorción de cNADH (línea discontinua), cNADPH (línea continua) y Acetil-cNADH (línea de puntos). El máximo de absorción para la Acetil-cNADH es de aproximadamente 380 nm y se encuentra una absorción significativa incluso en una longitud de onda de 400 nm o superior.

Ejemplos:

Ejemplo 1.1

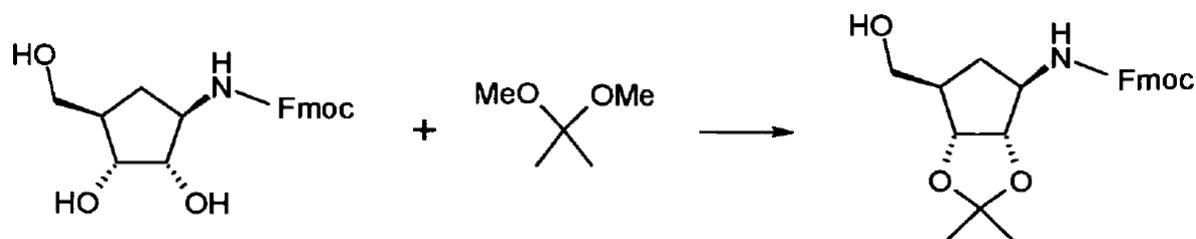
Síntesis de ((1R, 2S, 3R, 4R) -2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-ciclopentil)-carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo



(1R, 2S, 3R, 4R)-2,3-dihidroxi-4-(hidroximetil)-1-aminociclopentan clorhidrato (70,0 g, 380 mmol) se disolvió en agua (660 ml) y se añadió FmocOSu (N-(9-fluorenilmetoxicarbonilo) -succinimida) (148,5 g, 440 mmol) disuelto en dioxano (2,00 l). Entonces se añadió una solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio (800 ml, 880 mmol) lentamente. La mezcla se agitó 3 h a temperatura ambiente hasta que la TLC (gel de sílice Merck 60, cloroformo / metanol / ácido acético 8:2 + 0,1% v/v/v) mostró el consumo completo de los productos de partida. El precipitado obtenido se separó por filtración y el filtrado se añadió al agua (6,00 l). La suspensión resultante se agitó durante 5 min y después se almacenó 12 horas a 4 °C. La suspensión resultante se filtró. El sólido obtenido se lavó con agua fría (3,00 l) y se secó 12 h bajo presión reducida a 45 °C sobre cloruro de calcio. Para una purificación adicional, el producto bruto se suspendió en acetato de etilo, se agitó 1 h, se filtró y se secó a presión reducida produciendo 134 g (95%) del compuesto del título como un sólido blanco.

Ejemplo 1.2:

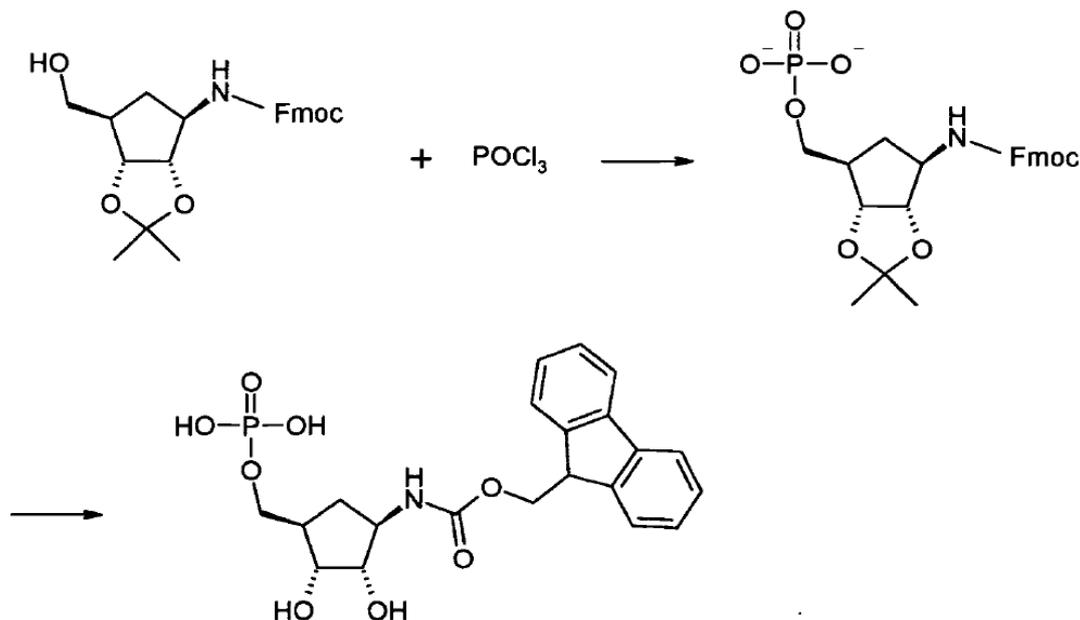
Síntesis de ((3aS, 4R, 6R, 6aR)-6-hidroximetil-2,2-dimetil-tetrahydro-ciclopenta[1,3]dioxol-4-il)-carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo



((1R, 2S, 3R, 4R) -2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-ciclopentilo) carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetil (115 g, 310 mmol), 2,2-dimetoxipropano (360 ml, 3,10 mol) y monohidrato de ácido p-toluenosulfónico (118 g, 620 mmol) se disolvieron en acetona seca (2,00 l). La mezcla se agitó durante 3,5 h a temperatura ambiente hasta consumir por completo el material de partida según la TLC (gel de sílice Merck 60, cloroformo / metanol / ácido acético 9:1 + 0,1% v/v). La suspensión resultante se agitó 15 min a 0 °C y el precipitado se separó por filtración y se lavó con acetona fría. El sólido marrón obtenido se suspendió de nuevo en éter dietílico (800 ml) y se agitó durante 20 min, se filtró, se lavó con éter dietílico (400 ml) y se secó 8 h bajo presión reducida dando 116 g (91%) del compuesto del título.

Ejemplo 1.3

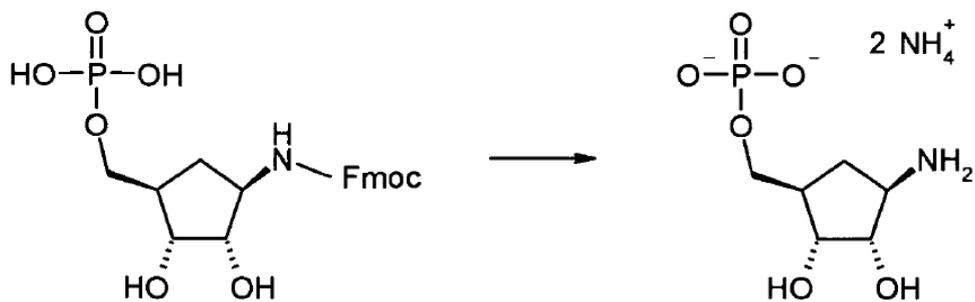
Síntesis de ((1R,2S,3R,4R)-2,3-dihidroxi-4-fosfono-oximetil-ciclopentil)-carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetil:



Un matraz de tres bocas provisto de termómetro se llenó con ((3aS,4R,6R,6aR)-6-hidroximetil-2,2-dimetiltetrahydrociclopenta[1,3]dioxol-4-il)-carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetil (146 g, 357 mmol) seguido de trimetilfosfato seco (1,80 l) disolviendo casi completamente el sólido. Bajo enfriamiento con un baño de hielo se añadió oxiclورو de fósforo recién destilado (305 ml, 3,33 mol) disuelto en fosfato de trimetilo seco (200 ml) gota a gota durante un período de 1 h teniendo cuidado de que la temperatura de la mezcla no subiera por encima de 10 °C. En las mismas condiciones se añadió piridina seca (80,0 ml, 991 mmol) y la mezcla se agitó 2 h bajo enfriamiento con hielo. Después la mezcla se dejó 1 h a temperatura ambiente, se dejó caer lentamente durante un período de 3 h en una solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio (7,00 l). Si la mezcla de reacción se vuelve caliente se enfría con un baño de hielo. Después de la adición completa, la mezcla es todavía ácida (pH = 2). La suspensión resultante se almacena 12 horas a 4 °C. El precipitado obtenido se separó por filtración y el filtrado se agitó con una solución saturada de cloruro de sodio (30,0 l). A continuación la mezcla se dejó 12 horas a 4 °C y el precipitado resultante se separó por filtración o centrifugado. El residuo se añadió a agua (13,0 l) y se agitó vigorosamente durante 2 h. Bajo agitación lenta se añadió diaion húmedo (Supelco HP-20) (5,00 l) y la mezcla se agitó adicionalmente durante 45 min. A continuación se decantó el diaion y se lavó dos veces con agua (5,00 l) de la misma manera. El diaion cargado se introdujo en una columna de cromatografía y se eluyó con 25% de isopropanol dando 76,0 g (46%) del compuesto del título.

Ejemplo 1.4:

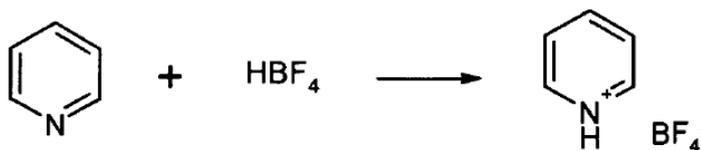
Síntesis de (1R,2S,3R,5R)-3-amino-5-[(fosfono-oxi)metil]-1,2-ciclo-pentanodiol sal de diamonio



5 ((1R,2S,3R,4R)-2,3-dihidroxi-4-fosfono-oximetil-ciclopentil)-carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (42,4 g, 94,3 mmol) se suspendió en metanol (200 ml) seguido por la adición de una solución de amoniaco (25% en H₂O 500 ml). La mezcla se agitó durante 12 h a temperatura ambiente. El precipitado resultante se separó por filtración y el filtrado se evaporó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en agua (500 ml) y se liofilizó obteniéndose 24,4 g (99%) del compuesto del título.

10 Ejemplo 2:

Síntesis de tetrafluoroborato de piridinio

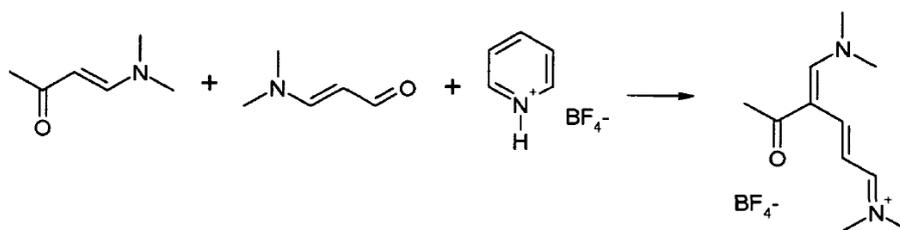


15 Se añadió ácido tetrafluorobórico (250 ml, 2,00 mol) para enfriar (0 °C) piridina (157,7 ml, 1,95 mol) en 25 min obteniendo un precipitado incoloro. Después de añadir completamente el ácido, la mezcla se agitó adicionalmente durante 30 min a la misma temperatura. Después, la mezcla de reacción se filtró. El residuo se lavó dos veces con etanol frío y se secó 12 h a alto vacío para proporcionar 201,9 g (60%) de tetrafluoroborato de piridinio como cristales incoloros.

20

Ejemplo 3:

Síntesis de tetrafluoroborato de 5-dimetilamino-4-acetil-penta-2,4-dieniliden-dimetilamonio

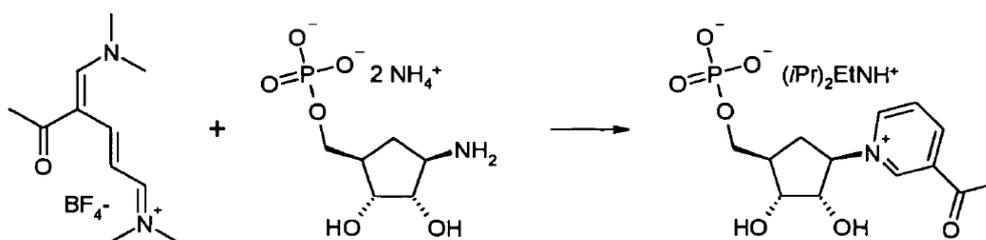


25

30 Se añadió tetrafluoroborato de piridinio (2,21 g, 13,3 mmol) a una solución de (3E)-4-(dimetilamino)-3-buten-2-ona (1,54 ml, 13,3 mmol) en 13,5 ml de anhídrido acético / ácido acético (2: 1). La suspensión resultante se enfrió a 0 °C y se añadió 3-dimetilaminoacroleína (1,33 ml, 13,3 mmol) durante un período de 1 h con agitación vigorosa y refrigeración con un baño de hielo recibiendo un precipitado rojo-marrón. La mezcla de reacción fría se filtró y el sólido restante se lavó con éter dietílico varias veces y se secó bajo presión reducida. La sal de pentametinio se obtuvo como producto bruto de color naranja (2,69 g, 96%) y se utilizó sin ninguna purificación adicional.

35 Ejemplo 4:

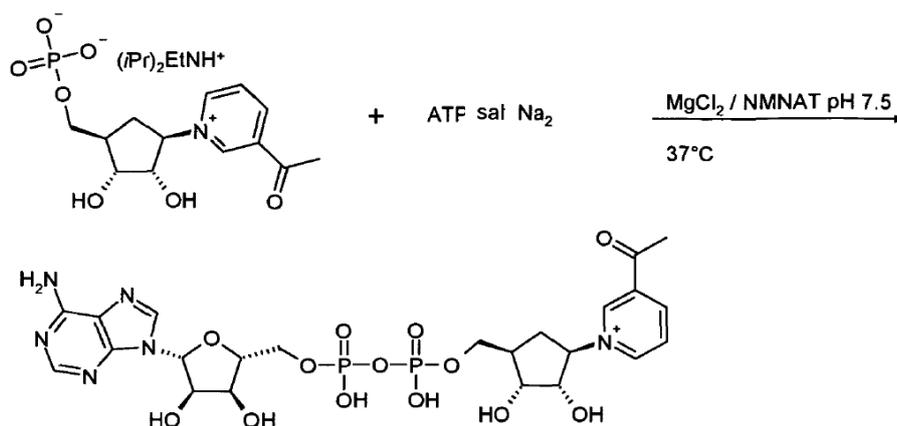
Síntesis de 3-acetil-1-[(1R, 2S, 3R, 4R)-2,3-bishidroxi-4-(fosfonoxi)metil-ciclopentil]piridinio sal de diisopropiletilamonio



se disolvió (1R,2S,3R,5R)-3-amino-5-[(fosfonoxi)metil]-1,2-ciclo-pentandiol sal de diamonio (3,22 g, 12,3 mmol) en 20,0 ml de metanol / H₂O (1:1). Entonces se añadió diisopropiletilamina (4,00 ml, 23,0 mmol) seguido de la evaporación a presión reducida. Este procedimiento se repitió dos veces. El sólido seco obtenido, se suspendió en 100,0 ml de MeOH y se añadió tetrafluoroborato de 5-dimetilamino-4-acetil-penta-2,4-dieniliden-dimetilamonio (2,49 g, 8,83 mmol, producto bruto del ejemplo 3). La suspensión se mezcló con diisopropiletilamina (3,06 ml, 17,6 mmol) y se sometió a reflujo durante 45 min. Después de enfriar a temperatura ambiente se añadió 300 ml de acetato de etilo. El precipitado resultante se separó por filtración y se secó brevemente bajo presión reducida. El sólido obtenido se disolvió en agua, se purificó con carbón activado (5,00 g), se filtró y se liofilizó proporcionando 3,47 g de un sólido higroscópico fuerte de color marrón rojizo (correspondiente al 85% de la sal de piridinio). Este material prepurificado contiene principalmente el compuesto del título (según HPLC / EM) y se utilizó para otras reacciones en la presente pureza.

15 Ejemplo 5

Síntesis de Acetil-cNAD (enzimática)



3-acetil-1-[(1R,2S,3R,4R)-2,3-bis(hidroxi)-4-(fosfonoxi)metil-ciclopentil]-piridinio sal de diisopropiletilamonio (3,55 g, 7,71 mmol), sal disódica de ATP (6,99 g, 11,6 mmol) y cloruro de magnesio hexahidratado (568 mg, 2,79 mmol) se disolvieron en 180 ml de agua. Después de ajustar el pH a 7,5 con NaOH 10 M se añadió una suspensión de enzima nicotinamida mononucleótido adeniltransferasa NMNAT3 (humana, recombinante) (EC 2.7.7.1) de Axxora ALX-201-238 (3,00 ml, 162 U / g). La mezcla se agitó a 37 °C. Después de otras 16 h se añadió 1,00 ml de suspensión enzimática. Este procedimiento se repitió después de otras 8 h. Después de otras 16 h de agitación a 37 °C casi toda la aminoazúcar fosforilada ha reaccionado en el compuesto del título (según HPLC / EM).

30 Ejemplo 6:

Reducción enzimática de Acetil-cNAD, cNAD, cNADP

Acetil-cNADH y para la comparación cNAD, cNADP se redujeron mediante el uso de GlucDH mut 2 (WO2010 / 094632) usando las siguientes condiciones:

Productos químicos:

NaCl (Merck.1.02406.0080)

Tris (708 976 Roche)

40 D(+)-glucosa monohidrato p.a. (Merck 8342)

Acetil-cNAD (ácido libre).

agua bidestilada (Millipore)

ES 2 529 023 T3

HCl 1 N (Merck 1.09973.0001)

Tampón de dilución A (NaCl 0,2 mol / l; Tris 0,1 mol / l; pH 8,5) se preparó como sigue:

- 5 11,7 g de NaCl y 12,1 g de Tris (= tris (hidroxietil) amina) fueron disueltos en 900 ml de agua bidestilada. y el pH se ajustó a pH 8,5 por adición de HCl 1 N y se llenaron hasta 1,00 l con agua bidestilada.

Solución de glucosa:

- 10 2,00 g de D(+)- glucosa monohidrato se disolvieron en 10,0 ml de agua bidestilada. La solución está lista para su uso después de 2 h a temperatura ambiente.

Solución de reserva GlucDH2:

- 15 10,0 mg de la enzima (Lyo) se disolvieron en 1,00 ml de tampón Tris.

Reducción de la solución de acetil-cNAD (15 mmol / l):

- 20 9,90 mg de acetil-cNAD (PM = 659,47g / mol) se disolvieron en 1,00 ml de agua bidestilada. 100 µl de solución de reserva GlucDH2 se disolvieron en 0,90 ml de tampón de dilución (factor de dilución = 10).

Reducción de la cNADP (15 mmol / l):

- 25 10 µl de solución de reserva GlucDH2 se disolvieron en 0,99 ml de tampón de dilución. Se disolvieron 100 µl de esta solución en 0,40 ml de tampón de dilución (factor de dilución = 500).

Reducción de la cNAD (15 mmol / l):

- 30 10 µl GlucDH2 stock solución al se disolvieron en 0,99 ml de tampón de dilución. Se disolvieron 100 µl de esta solución en 0,30 ml de tampón de dilución (factor de dilución = 400).

Las soluciones de reactivo atemperadas (25 °C) se pipetearon en una cubeta de plástico de 1 cm de la siguiente manera:

tampón Tris	2,70 ml
solución de glucosa	0,20 ml
solución acetil-cNAD o cNAD o cNADP (15 mmol / l)	0,10 ml

- 35 Después de mezclar y atemperar a 25 °C, la reacción se inició por adición de 0,05 ml de las correspondientes soluciones de GlucDH2 mencionadas anteriormente. Un espectro UV / VIS se registró después de 30 min.

- 40 A partir de este experimento es obvio que la acetil-cNAD también sirve como una coenzima para una deshidrogenasa.

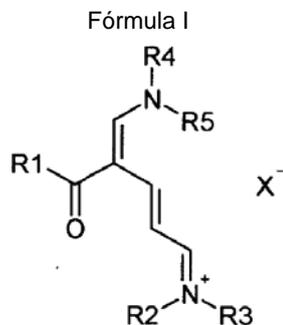
- 45 También se ha encontrado que la longitud de onda de absorción se desplaza hacia longitudes de onda más largas (máximo cercano a 400 nm), en comparación con formas NAD no aciladas y / o cNAD. Los correspondientes espectros de absorción se muestran en la Figura 1. Esta es una ventaja significativa para los ensayos basados en redox, ya que permite reducir o evitar la interferencia a partir de compuestos autofluorescentes comprendidos en muestras (biológicas).

REIVINDICACIONES

1. Un método para la síntesis de un compuesto 3-alcuilarbonilo, 3-arilcarbonilo o 3-heteroarilcarbonilo de piridinio N-sustituido que comprende los pasos de

5

a) proporcionar una sal de pentametinio de acuerdo con la Fórmula I,



10

en donde

X⁻ es un contraión,

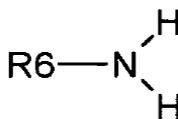
R1 se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo, arilo y heteroarilo, y

15

R2 a R5 son independientemente metilo o etilo,

b) hacer reaccionar la sal de pentametinio del paso (a) con una amina primaria de fórmula II,

Fórmula II



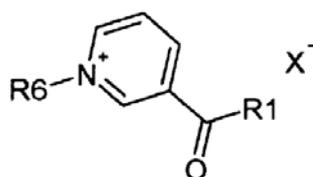
20

en el que R6 es alquilo lineal, ramificado, o cíclico, opcionalmente sustituido,

c) obteniendo de este modo un compuesto de piridinio N-sustituido de la Fórmula III,

25

Fórmula III



en el que X⁻, R1 y R6 son como se definen anteriormente.

30

2. El método de la reivindicación 1, en el que R1 es metilo, etilo, propilo, butilo o isopropilo.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que R2 a R5 son metilo.

35

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la amina primaria de acuerdo con la fórmula II es 3-amino-5-[(fosfonoxi)metil]-1,2-ciclo-pentanodiol.

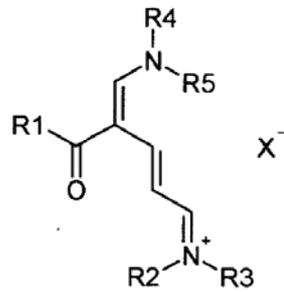
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la amina primaria de acuerdo con la fórmula II es (1R,2S,3R,5R)-3-amino-5-[(fosfonoxi)metil]-1,2-ciclo-pentanodiol.

40

6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la amina primaria de acuerdo con la fórmula II es (1R,2S,3R,4R)-2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-1-aminociclopentano.

7. Un compuesto de Fórmula I,

Fórmula I



en el que

- 5 X⁻ es un contraión,
 R1 se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C1 - C10, arilo C6 - C30 y heteroarilo con 6 a 30 átomos, y
 R2 a R5 son independientemente metilo o etilo .
8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, en el que R1 es alquilo C1 - C10.
- 10 9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que R1 se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo e isopropilo.
- 15 10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 9, en el que R1 es metilo.

Fig.1

