

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 763**

51 Int. Cl.:

C12P 19/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2007 E 07110957 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2014771**

54 Título: **Procedimiento continuo de hidrólisis enzimática**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2015

73 Titular/es:

**ANADYS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**GALLOU, FABRICE. y
BENEY, PASCAL.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 530 763 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

Procedimiento continuo de hidrólisis enzimática

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para la hidrólisis enzimática regioselectiva de los grupos alcohol protegidos, por ejemplo, como ésteres o ésteres de aminoácidos o grupos fosfato.

10 El documento WO05/121162 describe determinados compuestos de D-ribofuranosilo que se preparan mediante hidrólisis selectiva en el grupo en 5' del resto de ribosa del grupo alcohol protegido. Sin embargo, el procedimiento de hidrólisis enzimática tal como se describe en el documento WO05/121162 tiene defectos inherentes al procedimiento heterogéneo tales como por ejemplo, un tiempo de reacción largo, una selectividad limitada en la hidrólisis, un requerimiento de un recipiente grande para cada lote, varias etapas de filtración y sin un reciclado fácil de la enzima.

15 La presente invención proporciona ahora un procedimiento mejorado para la hidrólisis enzimática regioselectiva que supera muchos de los defectos del procedimiento de hidrólisis regioselectiva usado anteriormente. Según la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que, usando un procedimiento continuo para la hidrólisis enzimática regioselectiva de sustratos que tienen más de un grupo hidrolizable, puede lograrse una mayor selectividad de la hidrólisis y menos impurezas con un producto de hidrólisis no deseado. Además, un procedimiento continuo de este tipo constituye una solución económica y a largo plazo con respecto al procedimiento discontinuo largo y costoso usado anteriormente que tiene una baja producción. El procedimiento de la invención puede reducir drásticamente el ciclo de tiempo y minimizar el impacto del bajo rendimiento volumétrico global en comparación con, por ejemplo, el procedimiento descrito en el documento WO05/121162. Esto es particularmente relevante para las ampliaciones a escala del procedimiento cuando aumentan los volúmenes del procedimiento.

20 Por consiguiente, en su aspecto más amplio, la presente invención proporciona un procedimiento para la hidrólisis enzimática regioselectiva de un sustrato que comprende más de un grupo hidrolizable en el que dicha hidrólisis enzimática se realiza en un modo continuo.

25 En el procedimiento continuo según la presente invención, se hace pasar normalmente una disolución tamponada de aducto a través de una enzima inmovilizada. El término "continuo" según la presente invención se refiere a un procedimiento que se hace pasar de manera continua (sin interrupciones) a través de la columna. Tras un tiempo de residencia adecuado, el aducto se hidroliza completamente ya que puede monitorizarse *in situ*, por ejemplo, mediante monitorización del pH de la disolución que comprende el producto recogido después de la columna y extraído posteriormente. Es necesario ajustar los parámetros críticos del procedimiento continuo individualmente dependiendo, por ejemplo, del sustrato, la enzima etc. y pueden determinarse empíricamente caso por caso. Tales parámetros incluyen, por ejemplo, el tiempo de residencia, el relleno de la columna, el pH óptimo, la temperatura, la concentración de aducto, la elección del disolvente orgánico. El tiempo de residencia, por ejemplo, se ajusta de tal manera que el aducto se hidroliza de manera óptima, es decir con alta selectividad y conversión rápida y puede ser normalmente de desde 0,1 min hasta 300 min. El tiempo de residencia, por ejemplo, depende de la actividad enzimática, la temperatura, el pH, el sistema de disolventes y se ajusta de tal manera que permita el procesamiento continuo y la hidrólisis óptima tal como se definió anteriormente. El pH y la temperatura se escogen habitualmente según las condiciones que necesite la enzima para la reacción de hidrólisis. Por ejemplo, el pH puede estar en el intervalo de entre, por ejemplo, 5 y 8 o, por ejemplo, de 5,5 a 7,5. La temperatura puede estar en el intervalo de, por ejemplo, 15°C a 70°C.

30 Puede usarse cualquier tampón adecuado para la reacción enzimática, tal como, por ejemplo, un tampón fosfato, un tampón amonio, un tampón carbonato, un tampón acetato.

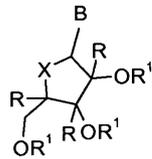
35 Además, puede usarse un componente orgánico adecuado para permitir la solubilización completa del aducto y el producto. Los componentes orgánicos típicos incluyen, por ejemplo, acetona, metiletilcetona, metilisobutilcetona, metanol, etanol, iso-propanol, n-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metoxietanol, 2-etoxietanol, *tert*-butil metil éter tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, dioxano, acetonitrilo, diclorometano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, líquidos iónicos, gases comprimidos tales como dióxido de carbono, agua, o similares, y mezclas de los mismos. También pueden imaginarse otros alcoholes, éteres, cetonas.

40 Adicionalmente, pueden usarse aditivos, por ejemplo, para acrecentar la velocidad de la reacción. Los aditivos típicos incluyen, por ejemplo, PEG (a del 1% al 10%), NaCl, Na₂SO₄, FeCl₃. La concentración adecuada de tales aditivos puede determinarse empíricamente y puede estar normalmente en un intervalo de concentración de 0,05 M a 1 M. Convenientemente, los aditivos pueden añadirse a la disolución de aducto.

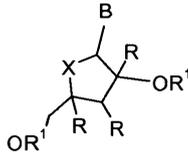
45 La enzima se inmoviliza sobre un soporte físico, por ejemplo, un soporte sólido. Un soporte físico para la enzima inmovilizada adecuado para la presente invención incluye, por ejemplo, una columna, un tanque con agitación continua, un reactor de lecho relleno, un reactor de membrana, una membrana. Puede usarse cualquier enzima adecuada para la hidrólisis según la presente invención, tal como por ejemplo, esterasas, hidrolasas, lipasas.

Los sustratos adecuados para los procedimientos de la presente invención contienen al menos dos grupos que son hidrolizables, es decir por ejemplo, dos acetatos, benzoatos. Ejemplos típicos de tales grupos son grupos de alcohol protegidos como ésteres, ésteres de aminoácidos, fosfatos. En una realización, los sustratos son piranósidos o furanósidos.

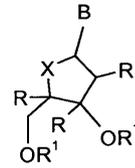
- 5 Según un aspecto de la presente invención, el sustrato es un compuesto tal como representa generalmente (sin estereoquímica) mediante las fórmulas (1) a (21)



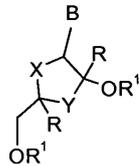
(1)



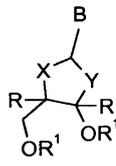
(2)



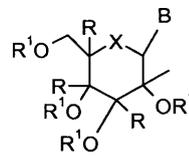
(3)



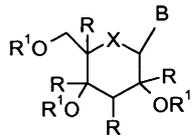
(4)



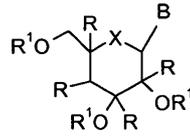
(5)



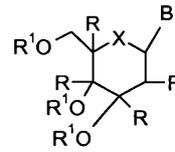
(6)



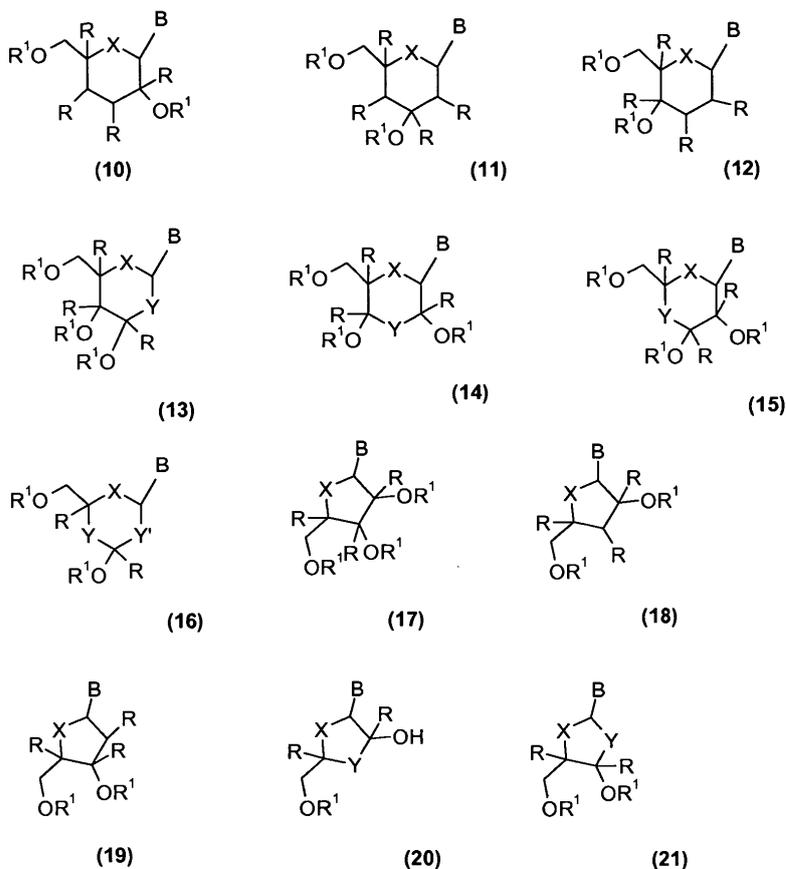
(7)



(8)



(9)



en las que R es independientemente H, alquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, $-NR'R''$, $-SR'''$, halógeno; R' y R'' son independientemente alquilo, $-SR'''$, $-SO'''$, $-SO_2R'''$; R''' es independientemente H, alquilo, arilo; R¹ es independientemente H, $-C(O)R^3$, un grupo de aminoácido L, D o racémico $-C(O)CH_2NHR^4$, $-C(O)CH(\text{alquil } C_{1-6})NHR^4$, fosfato; R³ es un alquilo C₁₋₁₈; R⁴ es H, $-C(O)CH(\text{alquil } C_{1-6})NH_2$ o $-C(O)CH(CH_2\text{-aril})NH_2$; B es una base nitrogenada; X, Y e Y' son independientemente $-CH_2-$, $-CHR'$, $-CR'R''$ u $-O$, NR''', S en la que R' y R'' son independientemente alquilo y R''' es H o alquilo o CO(Z), siendo Z O-alquilo o NH-alquilo o N-(alquilo)₂ y R² es H, $-C(O)CH(\text{alquil } C_{1-6})NH_2$ o $-C(O)CH(CH_2\text{-aril})NH_2$.

El término "alquilo", tal como se usa en el presente documento, incluye radicales hidrocarbonados monovalentes saturados que tienen restos lineales, ramificados o cíclicos (incluyendo restos bicíclicos y espirocíclicos condensados y con puente) o una combinación de los restos anteriores. Los ejemplos de grupos alquilo preferidos incluyen alquilos C₁₋₁₈ o C₁₋₁₂. Un grupo arilo puede no estar sustituido o estar sustituido en cualquier posición. Normalmente, porta 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes. En otra realización preferida, el alquilo es alquilo inferior, tal como por ejemplo, C₁₋₆ más preferiblemente C₁₋₄. Se prefieren particularmente metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*- o *terc*-butilo, n-pentilo o pentilo ramificado. Un grupo alquilo puede no estar sustituido o estar sustituido en cualquier posición. Normalmente, porta 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes.

El término "alqueno", tal como se usa en el presente documento, incluye restos alquilo que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono en el que el alquilo es tal como se definió anteriormente e incluyendo los isómeros E y Z de dicho resto alqueno. El término "alquino", tal como se usa en el presente documento, incluye restos alquilo que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono en el que el alquilo es tal como se definió anteriormente.

El término "arilo", tal como se usa en el presente documento, incluye un radical orgánico derivado de un hidrocarburo aromático mediante la eliminación de un hidrógeno y es normalmente un grupo arilo C₆₋₁₀. Un grupo arilo puede no estar sustituido o estar sustituido en cualquier posición. Normalmente, porta 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes. Los ejemplos típicos incluyen fenilo o naftilo.

El término "fosfato", tal como se usa en el presente documento, incluye uno o varios grupos fosfato, por ejemplo, $-(HO(PO)OH)_m$ $-(HO(PO(OH))OH)_n$, m es 0, 1 ó 2 y n es 0, 1, 2, 3, 4, 5.

Los grupos alquilo o arilo según la presente invención también pueden estar sustituidos adicionalmente, por ejemplo, con uno o más sustituyentes halo (F, Cl, Br, I) o uno o más de los siguientes sustituyentes: ciano, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxilo, alquilo C_{1-C6}, alqueno C_{2-C6}, alquino C_{2-C6}, hidroxilo, alcoxilo C_{1-C6}, $-NH_2$, $-NH-$

alquilo, -N(alquilo)₂, -NH-arilo, -N(alquil)(arilo), -N(arilo)₂, -NHCHO, -NHC(O)-alquilo, -NHC(O)-arilo, -N(alquil)C(O)H, -N(alquil)C(O)alquilo, -N(aril)C(O)H, -N(aril)C(O)alquilo, -NHCO₂-alquilo, -N(alquil)CO₂-alquilo, -NHC(O)NH₂, -N(alquil)C(O)NH₂, -NHC(O)NH-alquilo, -NHC(O)N(alquilo)₂, -N(alquil)C(O)NH-alquilo, N(alquil)C(O)N(alquilo)₂, -NHSO₂-alquilo, -N(alquil)SO₂-alquilo, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -OC(O)alquilo, -OC(O)arilo, -CO₂-alquilo, -CO₂-arilo, -CO₂H, -C(O)NH₂, -C(O)NH-alquilo, -C(O)N(alquilo)₂, -C(O)NH-arilo, -C(O)N(arilo)₂, -C(O)N(alquil)(arilo), -S(O)alquilo, -S(O)arilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-arilo, -SO₂NH₂, -SO₂NH-alquilo y -SO₂N(alquilo)₂.

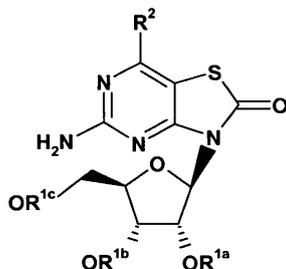
El término "halo" o "halógeno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a F, Cl, Br o I.

El término base nitrogenada en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier base adecuada para incorporarse en un ácido nucleico, tal como se ejemplifica, por ejemplo, en el documento WO05/121162.

10 En una realización, un grupo alcohol primario protegido hidrolizable, por ejemplo, un éster de un alcohol primario, se hidroliza selectivamente en presencia de uno o más grupos alcohol secundario protegidos hidrolizables, por ejemplo, un éster de un alcohol secundario.

En un aspecto preferido de la presente invención, el ribofuranósido es una ribofuranosiltiazolo[4,5-*d*]pirimidina. Se describen compuestos adecuados, por ejemplo, en el documento WO05/121162 que se refiere a nucleósidos de 3-β-D-ribofuranosiltiazolo[4,5-*d*]pirimidina. En una realización, el compuesto es el compuesto 89 del documento WO05/121162.

Por consiguiente, en una realización preferida el sustrato es un compuesto de fórmula 22.



en la que:

20 R^{1a}, R^{1b} y R^{1c} son independientemente H, -C(O)R³, un grupo de aminoácido L, D o racémico -C(O)CH₂NHR⁴, -(O)CH(alquil C₁₋₆)NHR, o R^{1b} y R^{1c} son colectivamente -C(O)-, que junto con los átomos de oxígeno forman un anillo de carbonato de cinco miembros;

R² es H, OR⁵ o N(R⁶)₂; R³ es un alquilo C₁₋₁₈; R⁴ es H, -C(O)CH(alquil C₁₋₆)NH₂ o -C(O)CH(CH₂-aril)NH₂; R⁵ es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₃₋₇, alquinilo C₃₋₇, -(CR⁷R⁸)_t(arilo C₆-C₁₀), -(CR⁷R⁸)_t(cicloalquilo C₃-C₁₀), -(CR⁷R⁸)_t(grupo heterocíclico C₄-C₁₀), -(CR⁷R⁸)_{t-1}OH, -(CR⁷R⁸)_{t-0}CO₂-alquilo C₁₋₁₈ y -(CR⁷R⁸)_{t-0}N(R⁹)CO₂-alquilo C₁₋₁₈ y SO₂(arilo), en los que t es un número entero desde 0 hasta 6, y en los que los restos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo y heterocíclico de los grupos anteriores están sustituidos opcionalmente con sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxilo, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, hidroxilo, alcoxilo C₁₋₆, -NH₂, -NH-alquilo, -N(alquilo)₂, -NH-arilo, -N(alquil)(arilo), -N(arilo)₂, -NHCHO, -NHC(O)alquilo, -NHC(O)arilo, -N(alquil)C(O)H, -N(alquil)C(O)alquilo, -N(aril)C(O)H, -N(aril)C(O)alquilo, -NHCO₂-alquilo, -N(alquil)CO₂-alquilo, -NHC(O)NH₂, -N(alquil)C(O)NH₂, -NHC(O)NH-alquilo, -NHC(O)N(alquilo)₂, -N(alquil)C(O)NH-alquilo, N(alquil)C(O)N(alquilo)₂, -NHSO₂-alquilo, -N(alquil)SO₂-alquilo, -C(O)alquilo, -C(O)arilo, -OC(O)alquilo, -OC(O)arilo, -CO₂-alquilo, -CO₂-arilo, -CO₂H, -C(O)NH₂, -C(O)NH-alquilo, -C(O)N(alquilo)₂, -C(O)NH-arilo, -C(O)N(arilo)₂, -C(O)N(alquil)(arilo), -S(O)alquilo, -S(O)arilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-arilo, -SO₂NH₂, -SO₂NH₂-alquilo y -SO₂N(alquilo)₂; R⁶ es independientemente H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃-C₁₀ o junto con el nitrógeno forma un anillo heterocíclico de 5 ó 6 miembros; R⁷ y R⁸ son independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆; y R⁹ es H, alquilo C₁₋₆ o -CH₂-arilo; y en el que dicho compuesto comprende al menos dos grupos hidrolizables.

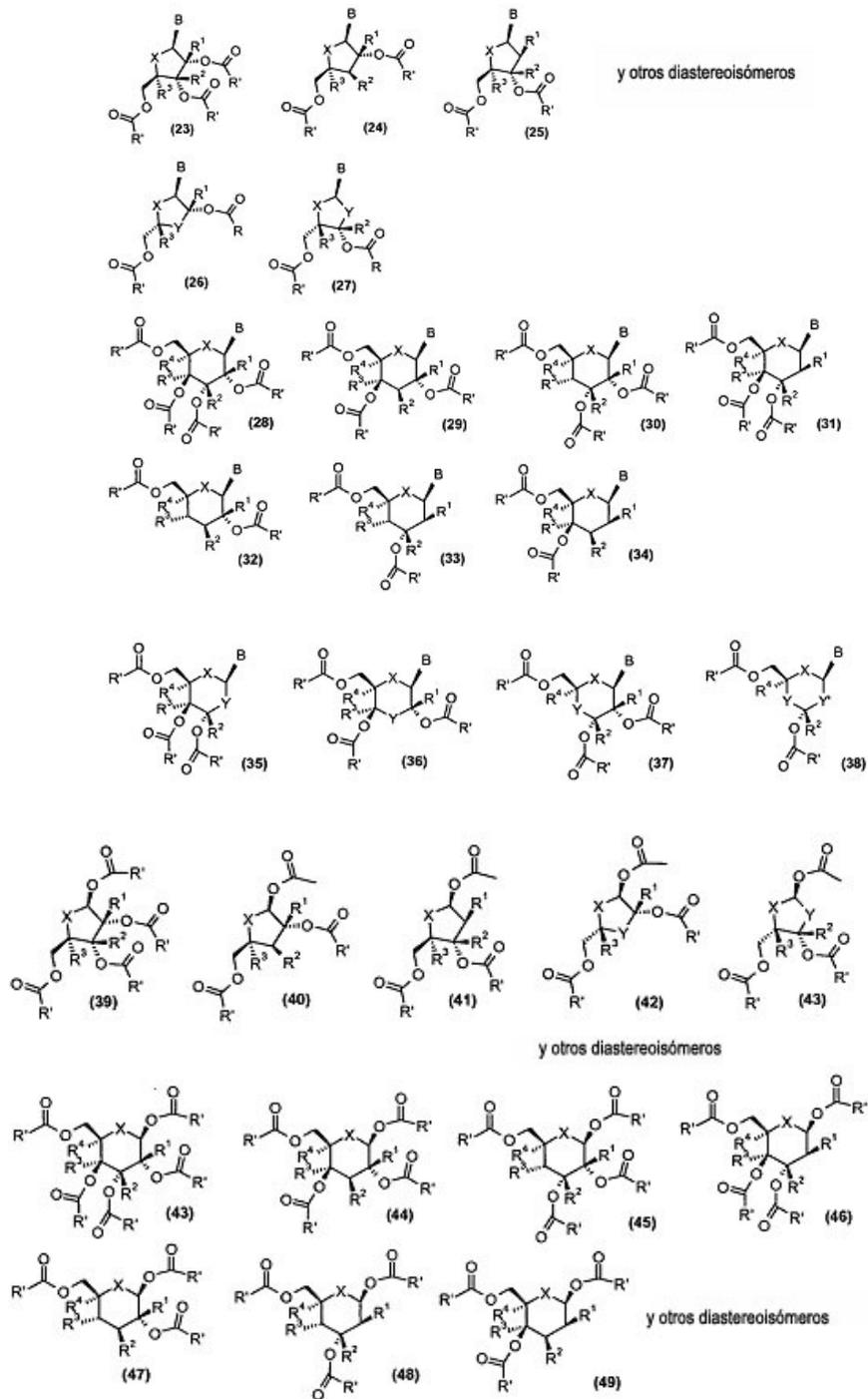
En una realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula 22, en el que R² es H u OR⁵ y en el que dicho compuesto comprende al menos dos grupos hidrolizables.

40 En otra realización, la invención se refiere a compuestos de fórmula 22 en los que R^{1a}, R^{1b} y R^{1c} son independientemente H, -C(O)R³, un grupo de aminoácido L, D o racémico -C(O)CH(alquil C₁₋₆)NH₂; R² es OR⁵; R³ es un alquilo C₁₋₁₈; R⁵ es independientemente alquilo C₁₋₆, alquenilo C₃₋₇, alquinilo C₃₋₇, -(CR⁷R⁸)_t(arilo C₆-C₁₀), -(CR⁷R⁸)_t(grupo heterocíclico C₄-C₁₀) y -(CR⁷R⁸)_{t-0}N(R⁹)CO₂-alquilo C₁₋₁₈, en los que t es un número entero desde 0 hasta 4 a menos que se indique lo contrario, y en los que los restos alquilo, alquenilo, arilo y heterocíclico de los grupos anteriores están sustituidos opcionalmente con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente de halo, ciano, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxilo, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, hidroxilo, alcoxilo C₁₋₆, -CO₂-alquilo, -CO₂-arilo, -OC(O)-alquilo y -OC(O)-arilo; R⁷ y R⁸ son independientemente H, alquilo C₁₋₆ o

alqueno C₂-C₆; y R⁹ es H, -CH₃, o -CH₂CH₃.

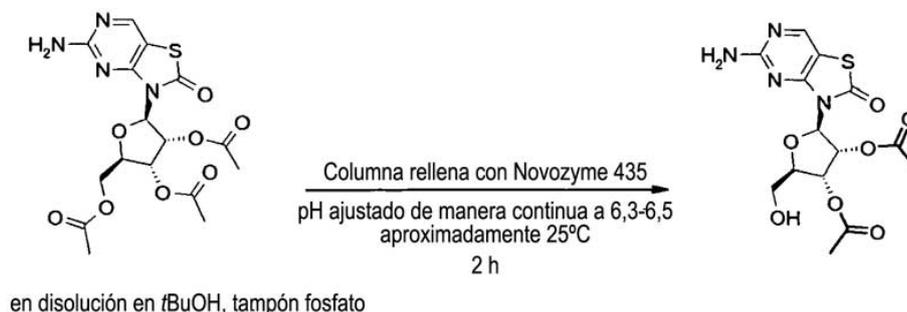
En otra realización, la invención se refiere a compuestos de fórmula 22 en los que R^{1a}, R^{1b} y R^{1c} son independientemente H, -C(O)R³, R² es H y en los que R³ es alquilo inferior. En otra realización, R^{1a}, R^{1b} y R^{1c} son H, -C(O)R³, R² es H y en los que R³ es alquilo inferior.

5 Los ejemplos de otros sustratos adecuados para la hidrólisis regioselectiva mediante un procedimiento continuo según la presente invención incluyen:



10 en los que R se define como anteriormente; en los que R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son independientemente H, alquilo, hidroxilo, hidroxialquilo -NR²R³, SR^m, halógeno; en los que R¹, Rⁿ y R^m se definen como anteriormente y en los que B es una base nitrogenada.

Ejemplo 1

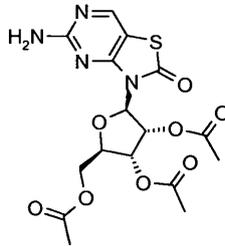


Se cargó un filtro Nutsche de 1 cm de diámetro con aproximadamente 1 g de lipasa de *Candida Antarctica* Novozym 435. Se hizo pasar una disolución de un aducto (aproximadamente 1 g disuelto en 9 ml de t-butanol y 16 ml de tampón fosfato pH 7,0) a través del filtro a aproximadamente 1,6 ml/min (aproximadamente 0,2 bar de presión) hasta que se completó. Se mantuvo de manera continua el pH de la mezcla filtrada entre 6,3 y 6,5 con una disolución de Na_2HPO_4 . Se completó la reacción tras aproximadamente 2 h. Después se separaron fácilmente las fases y se extrajo la fase acuosa una vez con aproximadamente 20 ml de 2-metiltetrahidrofurano. Se lavaron las fases orgánicas combinadas una vez con agua y se concentraron a presión reducida dando el producto bruto con un rendimiento >90% y con <1% de subproducto de sobrehidrólisis.

Este procedimiento continuo de la presente invención tiene varias ventajas con respecto a un procedimiento discontinuo tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO05/121162, por ejemplo, rendimiento mejorado, reacción más rápida, procedimiento continuo posible para tratamiento final, sin más filtración, se recicla la enzima fácilmente, producción aumentada, desechos reducidos, y de manera importante, selectividad mejorada e hidrólisis minimizada a los compuestos de monoacetato y tris-hidroxilo no deseados. Se obtuvo el producto bruto con un rendimiento de aproximadamente el 90% con el 3-5% de sobrehidrólisis mediante el método tal como se describe en el documento WO05/121162 mientras que puede obtenerse con un rendimiento superior al 90% con menos del 1% de subproductos de sobrehidrólisis en modo continuo.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la hidrólisis enzimática regioselectiva de un sustrato que comprende hacer pasar una disolución tamponada a través de una enzima inmovilizada en un procedimiento continuo, en el que el sustrato es



5

la enzima es lipasa de *Candida Antarctica* Novozym 435;

la disolución tamponada tiene un pH de 5,5 a 7,5; y

la lipasa de *Candida Antarctica* hidroliza de manera regioselectiva el éster en la posición 5' del sustrato.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el sustrato está en una disolución tamponada y se hace pasar la disolución tamponada a través de la enzima inmovilizada a una velocidad de 0,1 ml/min a 50 ml/min o de 0,5 ml/min a 10 ml/min.

10

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la disolución tamponada comprende un tampón fosfato, un tampón amonio, un tampón carbonato o un tampón acetato.

4. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la disolución tamponada comprende un tampón fosfato.

15