

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 710**

51 Int. Cl.:

C07H 19/24 (2006.01)

A61K 31/706 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07H 15/244 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2011 E 11805950 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2646456**

54 Título: **Proceso para la preparación de derivados de morfolinil antraciclina**

30 Prioridad:

02.12.2010 US 418949 P

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

14.04.2015

73 Titular/es:

**NERVIANO MEDICAL SCIENCES S.R.L. (100.0%)
Viale Pasteur 10, Casella Postale N. 11
20014 Nerviano (MI), IT**

72 Inventor/es:

**CARUSO, MICHELE;
LUPI, VITTORIA y
SALSA, MATTEO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 533 710 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

Proceso para la preparación de derivados de morfolinil antraciclina

5 Esta solicitud no provisional presentada bajo los términos del 37 CFR §1.53 (b), reivindica el beneficio bajo los términos del 35 USC §119 (e) de la Solicitud Provisional de los EE.UU. N° de serie 61/418.949 presentada el 2 de diciembre de 2010.

10 La invención se refiere a un proceso para la preparación de derivados de morfolinil antraciclina caracterizado por que el anillo de morfolino está puentado con un átomo de oxígeno en la posición C-4' del residuo de azúcar.

15 Estos derivados de morfolinil antraciclina, proceso para su preparación, composiciones farmacéuticas que los comprenden y su uso como agentes terapéuticos, particularmente en el tratamiento del cáncer, se describen y reivindican en la solicitud de patente internacional WO 98/02446.

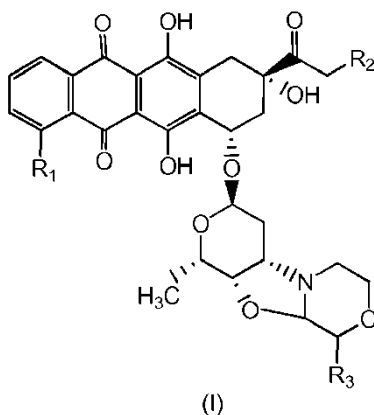
15 Las morfolinil antraciclina son análogos semisintéticos de las antraciclina y están dotadas de una notable actividad antitumoral (véase: Bioactives Molecules Vol.6, ED. J.W. Lown, Elsevier 1988; Curr Pharm Des. 5(3): 217-27, 1999).

20 Estos compuestos pueden ser preparados de acuerdo con los procesos químicos conocidos haciendo reaccionar el derivado N-óxido de un derivado de morfolinil antraciclina con una sal de hierro en presencia de un agente complejante de hierro como se describe en la solicitud de patente internacional WO 98/02446 citada anteriormente.

25 Los conjugados de anticuerpos de las morfolinil antraciclina tienen actividad antitumoral selectiva (WO 2009/099741; WO 2010/009124)

25 Se ha descubierto ahora sorprendentemente que dichos derivados de morfolinil antraciclina se pueden preparar ventajosamente mediante un proceso novedoso que permite obtener los productos deseados con altos rendimientos y pureza.

30 Por lo tanto, es un primer objetivo de la presente invención un proceso para preparar un derivado de morfolinil antraciclina de fórmula (I):



35 en la que

R₁ es hidrógeno, OH o OCH₃,

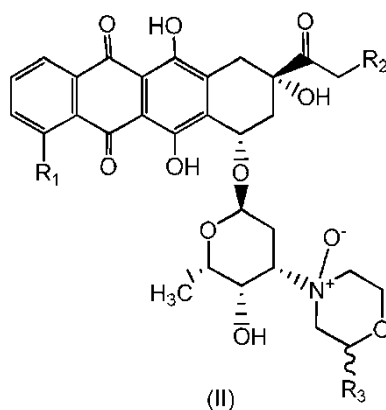
R₂ es hidrógeno o OH y

R₃ es hidrógeno o OalquiloC₁-C₅, o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo,

40

cuyo proceso comprende:

(i) hacer reaccionar cloruro cianúrico con un derivado N-óxido de antraciclina de fórmula (II):



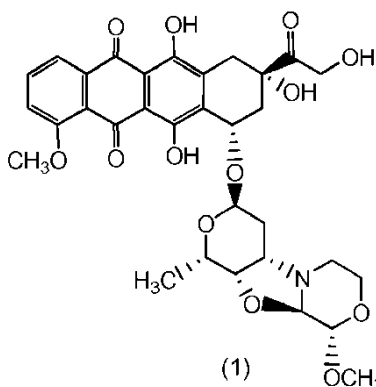
en la que R₁, R₂ y R₃ son como se ha definido anteriormente y

- 5 (ii) opcionalmente, convertir el compuesto resultante de fórmula (I) en una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los ejemplos de derivados de morfolinil antraciclina de fórmula (I) específicos son los compuestos enumerados a continuación:

- 10 3'-desamino-3"-4'-anhidro-[2"(S)-metoxi-3"(R)-hidroxi-4"-morfolinil]doxorubicina (1);
 3'-desamino-3"-4'-anhidro-[2"(S)-metoxi-3"(R)-hidroxi-4"-morfolinil]idarrubicina (2);
 3'-desamino-3"-4'-anhidro-[2"(S)-metoxi-3"(R)-hidroxi-4"-morfolinil]daunorrubicina (3);
 3'-desamino-3"-4'-anhidro-[2"(S)-metoxi-3"(R)-hidroxi-4"-morfolinil]carminomicina (4) y
 15 3'-desamino-3"-4'-anhidro-[2"(S)-etoxi-3"(R)-hidroxi-4"-morfolinil]doxorubicina (5), o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un derivado ilustrativo específico de morfolinil de fórmula (I) es 3'-desamino-3"-4'-anhidro-[2"(S)-metoxi-3"(R)-hidroxi-4"-morfolinil]doxorubicina (1). La Fórmula (I) es un metabolito de la nemorrubicina, también conocido como PNU-159682, (Quintieri et al (2005) *Clinical Cancer Research*, 11(4):1608-1617; Beulz-Riche et al (2001) *Fundamental & Clinical Pharmacology* 15(6): 373-378; EP 0889898; WO 2004/082689; WO 2004/082579). PNU-159682 fórmula (1) es más citotóxico que la nemorrubicina y la doxorubicina *in vitro* y es eficaz en modelos tumorales *in vivo*. Los conjugados anticuerpo-fármaco que comprende PNU-159682 de fórmula (1) proporcionan la destrucción selectiva de células (WO 2010/009124).

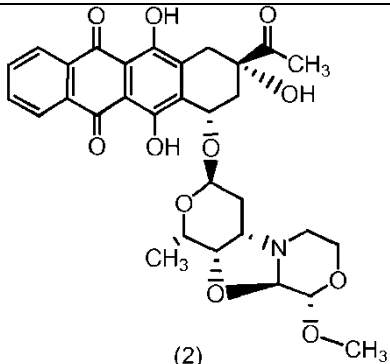
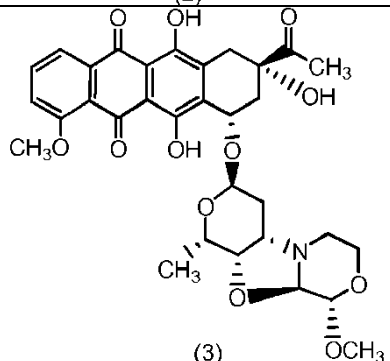
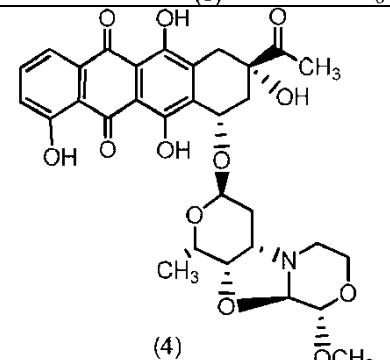
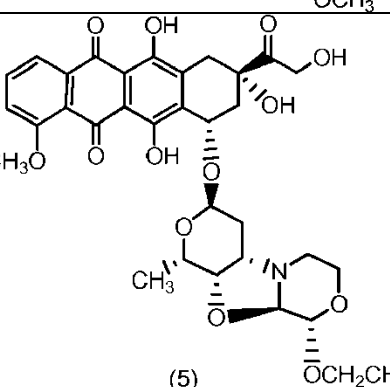


25 El término "Oalquilo C₁-C₅" se refiere a grupos hidrocarbilo alifáticos saturados lineales o ramificados que tienen de 1 a 5 átomos y están unidos al resto de la molécula a través del átomo de oxígeno.

- 30 La reacción de ciclación del Ejemplo 1 continúa con la formación de un solo isómero. La reacción se realiza normalmente en disolventes apróticos tales como diclorometano, cloroformo, acetona, 1,4-dioxano, dimetilformamida, 1,2-dicloroetano o acetonitrilo y en presencia de una base, tal como trietilamina, 4-dimetilaminopiridina, carbonato de sodio, carbonato de cesio o de potasio. La reacción se lleva a cabo generalmente de 0 °C a temperatura ambiente y de 5 a 60 minutos. Condiciones ilustrativas son acetonitrilo como disolvente y
 35 carbonato de potasio como base, a temperatura ambiente durante 30 minutos.

El N-óxido del compuesto de partida de fórmula (II) se puede preparar a través de la oxidación del dimetildioxirano de un derivado de morfolinil antraciclina como se describe en el documento GB 2 296 495 A.

Los siguientes derivados de morfolinil antraciclina, genéricamente descritos y reivindicados en la solicitud de patente internacional WO 98/02446, así como las composiciones farmacéuticas que los comprenden y su uso como agentes terapéuticos, particularmente en el tratamiento del cáncer, son nuevos:

 <p>(2)</p>	<p>3'-desamino-3''-4'-anhidro-[2''(S)-metoxi-3''(R)-hidroxi-4''-morfolinil]idarrubicina (2)</p>
 <p>(3)</p>	<p>3'-desamino-3''-4'-anhidro-[2''(S)-metoxi-3''(R)-hidroxi-4''-morfolinil]daunorrubicina (3)</p>
 <p>(4)</p>	<p>3'-desamino-3''-4'-anhidro-[2''(S)-metoxi-3''(R)-hidroxi-4''-morfolinil]carminomicina (4)</p>
 <p>(5)</p>	<p>3'-desamino-3''-4'-anhidro-[2''(S)-etoxi-3''(R)-hidroxi-4''-morfolinil]doxorubicina (5)</p>

5 Las vías adecuadas de administración incluyen la administración parenteral. Para la administración parenteral de una formulación líquida, se puede preparar usando el compuesto activo y un diluyente o vehículo estéril que puede o bien disolver el compuesto activo o proporcionar una suspensión del mismo. La formulación parenteral puede prepararse en una forma de un sólido estéril para la reconstitución antes de la administración con un vehículo

10 adecuado tal como solución salina fisiológica, agua estéril u otro vehículo estéril.

Los compuestos descritos son útiles en métodos de tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tales como la leucemia, el adenocarcinoma de colon y otros tumores sólidos y neoplasias malignas hematológicas.

5 Una cantidad terapéuticamente eficaz se administra a un paciente que tiene una enfermedad hiperproliferativa, tal como un tumor, para aliviar o mejorar el trastorno del paciente. Se puede administrar una cantidad suficiente para inhibir la progresión de la enfermedad, por ejemplo, el crecimiento del tumor. La dosis que se administra puede determinarse usando los intervalos de dosis conocidos para la doxorubicina y la daunorrubicina modificados por referencia a la actividad mostrada por los presentes compuestos en ensayos *in vitro* e *in vivo*. La dosis adecuada está generalmente en el intervalo de 0,01 a 100 mg/m², dependiendo de la naturaleza y gravedad de la enfermedad
10 que se está tratando y del estado general del paciente.

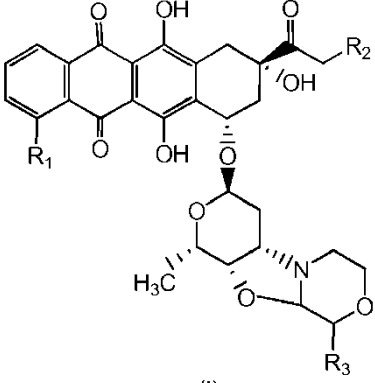
Actividad biológica: Ensayo de proliferación celular *in vitro*

15 Se sembraron células de ovario humano A2780 y cáncer de mama humano MCF7 (1250 células/pocillo) en placas blancas de 384 pocillos en medio completo (RPMI 1640 o EMEM más suero bovino fetal al 10 %) y se trataron con compuestos disueltos en DMSO al 0,1 %, 24 h después de la siembra. Las células se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ y después de 72 horas las placas se procesaron usando el ensayo CellTiter-Glo® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

20 CellTiter-Glo® es un método homogéneo basado en la cuantificación del ATP presente, un indicador de las células metabólicamente activas. El ATP se cuantifica usando un sistema basado en la luciferasa y la D-luciferina resultante en la generación de luz. La señal luminiscente es proporcional al número de células presentes en el cultivo.

25 Se añadió una cantidad de 25 microlitros/pocillo de solución de reactivo a cada pocillo y después de 5 minutos agitando, la microplaca se lee con un luminómetro para establecer los valores de CI₅₀. La señal luminiscente es proporcional al número de células presentes en el cultivo.

Tabla 1: Actividad citotóxica *in vitro* (CI₅₀) de los compuestos de fórmula (I)



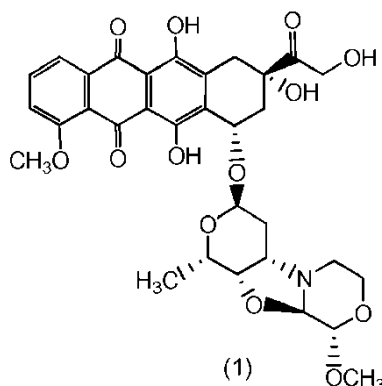
(I)

compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	A2780 (CI ₅₀ picoM)	MCF7 (CI ₅₀ picoM)
1	OMe	OH	OMe	0,024	0,022
2	H	H	OMe	0,000807	0,000912
3	OMe	H	OMe	0,000817	0,00144
4	OH	H	OMe	0,000421	0,000721
5	OMe	OH	OEt	0,000321	0,00714

30 Los siguientes ejemplos ilustran pero no limitan el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

3'-desamino-3''-4'-anhidro-[2''(S)-metoxi-3''(R)-hidroxi-4''-morfolinil]doxorubicina (1).

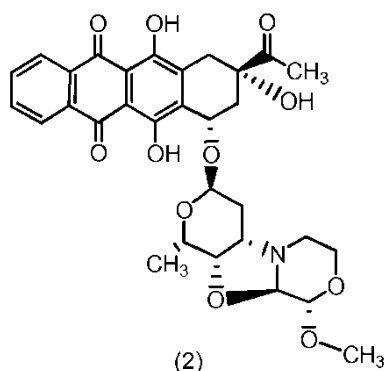


5

A una solución de N-óxido de 3'-desamino-3''[2(S)metoxi-4-morfolinil]-doxorubicina (preparada como se describe en el documento GB 296495 A) (50,0 mg, 0,076 mmol) en 12,5 ml de acetonitrilo seco, se añadieron carbonato de potasio en polvo (31,5 mg, 0,228 mmol) y cloruro cianúrico (2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina, N^o Reg CAS 108-77-0, 28,0 mg, 0,152 mmol). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos, hasta que ya no era detectable material de partida (análisis TLC, EtOH:CH₂Cl₂ = 1:9). A continuación se añadió una solución de 3-amino-1,2-propanodiol (42,0 mg, 0,46 mmol) en agua (1 ml) a la mezcla de reacción y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (4 x 30 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOH:CH₂Cl₂ = 0,2:9,8) sobre gel de sílice (malla 230-400), proporcionando 24,4 mg de 3'-desamino-3''-4'-anhidro-[2''(S)-metoxi-3''(R)-hidroxi-4''-morfolinil]doxorubicina (1) como un sólido rojo (rendimiento = 50 %). RMN de ¹H (500 MHz, acetonitrilo-*d*₃) δ ppm 1,29 (d, J = 6,41 Hz, 3 H) 1,68 (dt, J = 15,02, 5,86 Hz, 1 H) 1,89 (dt, J = 15,02, 5,50 Hz, 1 H) 2,07-2,13 (m, 1 H) 2,46 (dt, J = 14,66, 2,02 Hz, 1 H) 2,69-2,75 (m, 1 H) 2,76-2,81 (m, 1 H) 2,95 (d, J = 18,50 Hz, 1 H) 3,08 (t, J = 5,50 Hz, 1 H) 3,14 (dd, J = 18,59, 1,92 Hz, 1 H) 3,37 (s, 3 H) 3,41-3,47 (m, 1 H) 3,52-3,58 (m, 1 H) 3,73 (ddd, J = 11,50, 8,11, 2,93 Hz, 1 H) 4,01 (s, 3 H) 4,02-4,08 (m, 2 H) 4,25 (d, J = 2,93 Hz, 1 H) 4,53 (d, J = 2,93 Hz, 1 H) 4,61 (s, 1 H) 4,63-4,75 (m, 2 H) 5,22 (dd, J = 3,94, 2,11 Hz, 1 H) 5,36 (t, J = 5,59 Hz, 1 H) 7,54 (d, J = 8,06 Hz, 1 H) 7,84 (t, J = 8,06 Hz, 1 H) 7,96 (dd, J = 7,69, 0,73 Hz, 1 H). MS (ESI): 642 [M + H]⁺. Tiempo de retención = 4,88. De acuerdo con la misma metodología utilizada para la preparación de la 3'-desamino-3''-4'-anhidro-[2''(S)-metoxi-3''(R)-hidroxi-4''-morfolinil]doxorubicina (1), pero empleando derivados sustituidos adecuados, se prepararon los siguientes compuestos:

25

3'-desamino-3''-4'-anhidro-[2''(S)-metoxi-3''(R)-hidroxi-4''-morfolinil]idarrubicina (2).

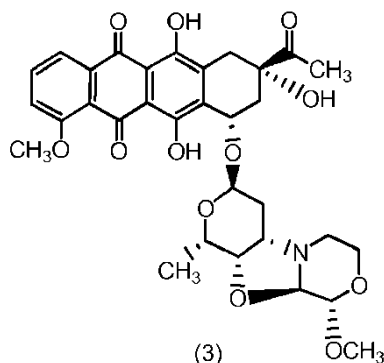


30

RMN de ¹H (acetonitrilo-*d*₃) δ: 8,29-8,34 (m, 2H), 7,86-7,95 (m, 2H), 5,35 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 5,19 (dd, J = 4,1, 2,1 Hz, 1H), 4,54 (s, 1H), 4,54 (s, 1H), 4,26 (d, J = 2,9 Hz, 1H), 4,09 (dd, J = 6,6, 1,7 Hz, 1H), 4,03 (dd, J = 7,1, 1,8 Hz, 1H), 3,74 (ddd, J = 11,5, 8,2, 3,0 Hz, 1H), 3,51-3,58 (m, 1H), 3,44 (c, J = 6,0 Hz, 1H), 3,37 (s, 3H), 3,06 - 3,11 (m, 1H), 2,91-2,98 (m, 1H), 2,67-2,81 (m, 2H), 2,44 (dt, J = 14,8, 2,1 Hz, 1H), 2,35 (s, 3H), 2,06 (dd, J = 14,6, 4,4 Hz, 1H), 1,85-1,91 (m, 1H), 1,71 (dt, J = 15,0, 5,9 Hz, 1H), 1,29 (d, J = 6,6 Hz, 3H). MS calc: 596,2127; MS hallado: 596,2117. MS (ESI): 596 [M + H]⁺. Tiempo de retención = 6,32 min

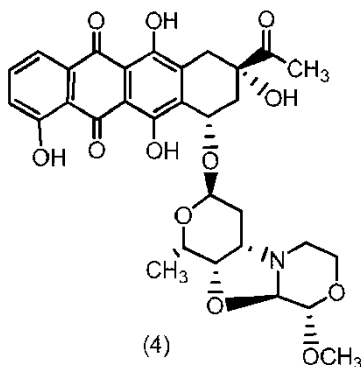
35

3'-desamino-3''-4'-anhidro-[2''(S)-metoxi-3''(R)-hidroxi-4''-morfolinil]daunorrubicina (3)



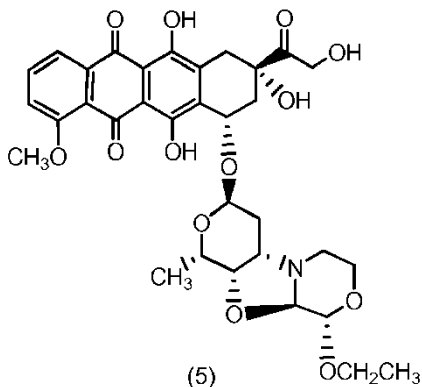
- 5 RMN de ^1H (acetonitrilo- d_3) δ : 7,94-7,99 (m, 1H), 7,84 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,54 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 5,35 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 5,19 (m, 1H), 4,55 (s, 1H), 4,54 (d, $J = 2,9$ Hz, 1H), 4,26 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 4,09 (dd, $J = 6,6, 1,7$ Hz, 1H), 3,97-4,05 (m, 4H), 3,74 (s, 1H), 3,54 (m, 1H), 3,44 (c, $J = 6,1$ Hz, 1H), 3,37 (s, 3H), 3,2 - 3,10 (m, 1H), 2,88-3,01 (m, 1H), 2,64-2,86 (m, 2H), 2,43 (dt, $J = 14,8, 2,1$ Hz, 1H), 2,34 (s, 3H), 2,05 (dd, $J = 14,7, 4,3$ Hz, 1H), 1,88 (dt, $J = 15,1, 5,7$ Hz, 1H), 1,70 (dt, $J = 15,1, 5,8$ Hz, 1H), 1,29 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H) MS calc: 626,2232; MS hallado: 626,2208. MS (ESI): 626 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Tiempo de retención = 5,66 min

3'-desamino-3''-4'-anhidro-[2''(S)-metoxi-3''(R)-hidroxi-4''-morfolinil]carminomicina (4).



- 15 RMN de ^1H (acetonitrilo- d_3) δ : 7,81-7,91 (m, 1H), 7,84 (m, 1H), 7,35 (dd, $J = 8,3, 1,1$ Hz, 1H), 5,24-5,40 (m, 1H), 5,19 (m, 1H), 4,54 (d, $J = 2,9$ Hz, 1H), 4,53 (s, 1H), 4,26 (d, $J = 2,9$ Hz, 1H), 4,06-4,14 (m, 1H), 4,04 (dd, $J = 7,1, 1,8$ Hz, 1H), 3,74 (m, 1H), 3,55 (m, 1H), 3,45 (m, 1H), 3,37 (s, 3H), 3,07-3,11 (m, 1H), 2,94-2,98 (m, 1H), 2,69-2,80 (m, 2H), 2,42-2,46 (m, 1H), 2,35 (s, 3H), 1,99-2,11 (m, 1H), 1,85-1,92 (m, 1H), 1,66-1,75 (m, 1H), 1,29 (d, $J = 6,56$ Hz, 2 H). MS calc: 612,2076; MS hallado: 612,2054. MS (ESI): 612 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Tiempo de retención = 6,28 min

3'-desamino-3''-4'-anhidro-[2''(S)-etoxi-3''(R)-hidroxi-4''-morfolinil]doxorubicina (5).



- 25 RMN de ^1H (acetonitrilo- d_3) δ : 7,96 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,83 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,53 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 5,36 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 5,21 (s, 1H), 4,69 (t, $J = 5,4$ Hz, 2H), 4,63 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 4,62 (s, 1H), 4,24 (s, 1H), 4,04 - 4,04 (m, 2H), 4,00 (s, 3H), 3,70-3,82 (m, 2H), 3,37-3,60 (m, 3H), 3,13 (d, $J = 18,8$ Hz, 1H), 3,08 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H), 2,94 (d,

ES 2 533 710 T3

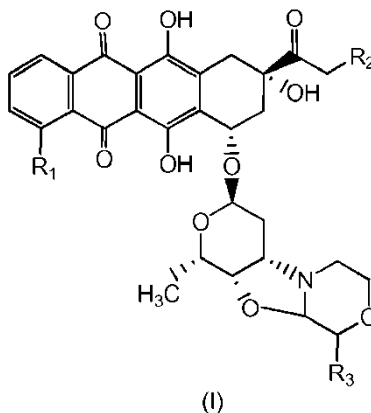
J = 18,6 Hz, 1H), 2,66-2,83 (m, 2H), 2,46 (d, J = 14,9 Hz, 1H), 2,07 – 2,12 (m, 1H), 1,86 - 1,92 (m, 1H), 1,63-1,77 (m, 1H), 1,29 (d, J = 6,4 Hz, 3H), 1,20 (t, J = 7,1 Hz, 3H). MS calc: 656,2338; MS hallado: 656,2325 MS (ESI): 656 [M + H]⁺. Tiempo de retención = 5,22 min

5 Método analítico de HPLC/MS

El equipo de HPLC consistía en un sistema Waters 2795 Alliance HT® equipado con un detector 2996 Waters PDA y un espectrómetro de masas de cuadrupolo único Micromass mod. ZQ, equipado con una fuente de iones para electronebulización (ESI). El control del instrumento, la adquisición de los datos y el procesamiento de los datos fueron proporcionados por el software Empower and MassLynx 4.0. La HPLC se llevó a cabo a 30 °C a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min utilizando una columna Waters X Terra MS C18-3,5 μM (4,6 x 50 mm). La fase móvil A era acetato de amonio 5 mM pH = 5,2 tampón con acetonitrilo (95:5) y la fase móvil B era H₂O/acetonitrilo (5:95); el gradiente fue de 10 a 90 % de B en 8 minutos y después rampa hasta 100 % de B en 1,0 minutos. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en positivo y en el modo de ión negativo, la tensión capilar se estableció en 3,5 kV (ES⁺) y 28 V (ES⁻); la temperatura de la fuente era de 120 °C; la tensión de cono era 14 V (ES⁺) y 2,8 kV (ES⁻); se estableció análisis completo, rango de masa de 100 a 1000 m/z.

REIVINDICACIONES

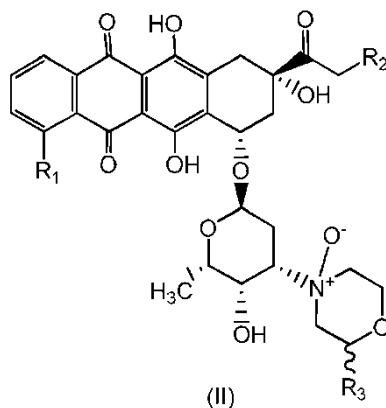
1. Un proceso para preparar un derivado de morfolinil antraciclina de fórmula (I):



5

en la que

- 10 R₁ es hidrógeno, OH o OCH₃,
 R₂ es hidrógeno u OH y
 R₃ es hidrógeno u OalquiloC₁-C₅, o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo, proceso que comprende hacer reaccionar cloruro cianúrico con un derivado N-óxido de antraciclina de fórmula (II):



15

en la que R₁, R₂ y R₃ son como se ha definido anteriormente y y donde se forma el derivado morfolinil antraciclina de fórmula (I).

20 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la reacción de un compuesto de fórmula (II) para dar un compuesto de la fórmula (I) se lleva a cabo en un disolvente aprótico seleccionado de diclorometano, cloroformo, acetona, 1,4-dioxano, dimetilformamida, 1,2-dicloroetano y acetonitrilo.

25 3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el compuesto de fórmula (I) es 3'-desamino-3"-4'-anhidro-[2"(S)-metoxi-3"(R)-hidroxi-4"-morfolinil]doxorubicina.

4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la conversión del producto de fórmula (I) resultante en una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la reacción de un compuesto de fórmula (II) para dar un compuesto de la fórmula (I) se lleva a cabo en presencia de una base seleccionada de trietilamina, 4-dimetilaminopiridina, carbonato de sodio, carbonato de cesio y carbonato de potasio.