

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 136**

51 Int. Cl.:

C12P 17/00 (2006.01)
C12P 19/28 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
C07H 1/00 (2006.01)
C07H 19/23 (2006.01)
C12P 17/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2016 PCT/EP2016/065958**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17005784**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2016 E 16734706 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3320102**

54 Título: **Método para la síntesis de pentostatina**

30 Prioridad:

07.07.2015 EP 15175659

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

02.06.2020

73 Titular/es:

**SYNBIAS PHARMA AG (100.0%)
Pestalozzistrasse 2
8200 Schaffhausen, CH**

72 Inventor/es:

**ZABUDKIN, OLEKSANDR;
SCHICKANEDER, CHRISTIAN;
MATVIENKO, IAROSLAV y
SYPCHENKO, VOLODYMYR**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 764 136 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 para la síntesis de pentostatina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para la producción estereo-selectiva de pentostatina que comprende una reacción de transglicosilación enzimática entre 6,7-dihidroimidazo-[4,5-d]-[1,3]-diazepin-8(3H)-ona y 2'-desoxirribonucleósido, seguido de una hidrogenación de transferencia asimétrica catalizada por rutenio. El método da lugar a la producción de pentostatina con rendimiento elevado y con un exceso > 99% del anómero β deseado.

Antecedentes de la invención

10 La pentostatina es un análogo de purina citostático que actúa como uno de los inhibidores más potentes de adenosina desaminasa que es usada para el tratamiento de diversos tipos de trastornos linfoproliferativos. El nombre sistemático de la pentostatina es (R)-3-((2R,4S,5R)-4-hidroxi-5-(hidroximetil)tetrahydrofuran-2-il)-3,6,7,8-tetrahydro-imidazo[4,5-d]-[1,3]diazepin-8-ol) y su estructura química se ilustra en la FIG. 1.

15 Actualmente, el método principal para la producción a gran escala de pentostatina se refiere a la fermentación de cultivos de *Streptomyces anlibilicus* NRRL 3238. Sin embargo, este método tiene varios inconvenientes graves que incluyen un rendimiento muy bajo del producto final (solo aproximadamente 13 g a partir de 1000 l de caldo de fermentación), así como un procedimiento purificación cromatográfica complicado y costoso (Woo, P.W.K. et al. (1974) J. Heterocycl. Chem. 11, 641-645).

20 La síntesis química total de pentostatina plantea un reto ya que la molécula contiene (i) una base heterocíclica única e inestable, (ii) un 2-desoxi-azúcar que desafía los intentos de glicosilación estereo-controlada para favorecer el anómero β y (iii) un grupo hidroxilo quiral central. El mérito de cualquier transformación química se mide mediante sus resoluciones a estas tres dificultades claves.

25 El primer esquema de síntesis de pentostatina fue establecido en 1979 (Baker, D.C., and Putt, S.R. (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 6127-6128). La vía de síntesis se expone esquemáticamente en la FIG. 2 e incluye un total de once etapas. Implica la producción de un compuesto heterocíclico de imidazo[4,5-d]-[1,3]diazepina seguido de glicosidación no selectiva (con la parte del anómero β deseado que representa solo un 14%) y reducción. El rendimiento global es solamente de 1,6% (en comparación con los materiales de partida).

30 Posteriormente, se establecieron varias modificaciones y mejoras de este método (véase, por ejemplo, Chan, E. et al. (1982) J. Org. Chem. 47, 3457-3464; Chen, B.C. et al. (2002) Tetrahedron Lett. 43, 1595-1596; Ho, J.Z. et al. (2003) J. Org. Chem. 68, 109-114), todos los cuales están todavía dificultados por el rendimiento bastante bajo debido a la falta de estereo-especificidad durante las etapas de síntesis individuales.

El documento WO 2014/177585 A2 describe un esquema de síntesis que emplea como material de partida un compuesto heterocíclico de imidazo[4,5-d]-[1,3]diazepina que incluye una funcionalidad hidroxilo. Sin embargo, este procedimiento requiere el calentamiento de tiempo prolongado de la mezcla de reacción a 50°C, lo que puede conducir a la formación de subproductos no deseables.

35 El documento WO 2005/027838 A2 describe un esquema de síntesis para la producción de pentostatina que comprende una expansión del anillo de una funcionalidad O-C-N en una hipoxantina o derivado de 2-desoxiinosina, que da lugar a un rendimiento mejorado. Sin embargo, debido a su complejidad química global, esta vía de síntesis no es adecuada tampoco para la producción a gran escala de pentostatina.

40 Por tanto, hay una necesidad continuada de métodos mejorados para la síntesis de pentostatina que superen las limitaciones de las vías de síntesis establecidas. En particular, hay una necesidad de un método mejor laborioso y económico para la producción a gran escala de pentostatina, mejorando así la estereo-especificidad de las etapas de reacción individuales del anómero β deseado de (8-R)-pentostatina.

Consecuentemente, es un objeto de la presente invención proporcionar un método mejorado para la síntesis de pentostatina.

45 **Sumario de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método para la síntesis estereo-selectiva de pentostatina, que comprende: (i) hacer reaccionar 6,7-dihidroimidazo-[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona y un 2-desoxirribonucleósido; y (ii) reducir el derivado de 8-ceto-pentostatina obtenido en la etapa (i) mediante hidrogenación de transferencia asimétrica catalizada por rutenio, en que la reacción en la etapa (i) está enzimáticamente catalizada por nucleósido desoxirribosiltransferasa.

En una realización preferida, el 2-desoxirribonucleósido es usado es 2-desoxi-uridina.

10 En una realización particular, el 2-desoxirribonucleósido es usado en una cantidad de 1,5 a 10 equivalentes molares de la cantidad de 6,7-dihidroimidazo[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona. Preferentemente, el 2-desoxirribonucleósido es usado en una cantidad de 4 a 7 equivalentes molares de la cantidad de compuesto de 6,7-dihidroimidazo[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona.

En otra realización particular, la reacción en la etapa (i) se realiza a una temperatura entre 10°C y 50°C. Preferentemente, la reacción en la etapa (i) se realiza a una temperatura entre 25°C y 35°C.

En otra realización particular, la reacción en la etapa (i) se realiza a un valor del pH entre 6,0 y 9,0. Preferentemente, la reacción en la etapa (i) se realiza a un valor del pH entre 7,5 y 8,0.

15 En una realización preferida, la reacción en la etapa (ii) está catalizada por RuCl(p-cimeno)[(R,R)-Ts-DPEN]. De forma particularmente preferida, la reacción en la etapa (ii) se realiza en una mezcla de trietilamina y ácido fórmico.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 la estructura química de (R)-3-((2R,4S,5R)-4-hidroxi-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2-il)-3,6,7,8-tetrahidroimidazo[4,5-d][1,3]diazepin-8-ol) (es decir, pentostatina).

20 La Figura 2 ilustra un esquema de síntesis representativa para la producción de pentostatina que está establecido en la técnica.

La Figura 3 ilustra un esquema de síntesis representativa para la producción estereo-selectiva de pentostatina según la presente invención.

25 La Figura 4 ilustra un cromatograma de HPLC representativo de la mezcla de reacción después de la reducción de 8-ceto-pentostatina usando NaBH₄ en metanol de acuerdo con el esquema de síntesis establecido descrito por Chan, E. et al. (1982) J. Org. Chem. 47, 3457-3464. El cromatograma pone de manifiesto la presencia concomitante de pentostatina (es decir, el isómero 8-R) y el isómero 8-S concomitante en una relación de aproximadamente 55% a 45%.

30 La Figura 5 ilustra un cromatograma de HPLC representativo de la mezcla de reacción después de la reducción de 8-ceto-pentostatina sin proteger usando una hidrogenación de transferencia asimétrica catalizada con rutenio según la presente invención. El cromatograma pone de manifiesto la presencia (casi) exclusiva de isómero 8-R deseado (es decir, pentostatina). El isómero 8-S está presente solamente como un resto en una cantidad de aproximadamente 0,2%.

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de la combinación de una reacción de transglicosilación enzimática de 6,7-dihidroimidazo-[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona con un 2-desoxirribonucleósido y una posterior hidrogenación de transferencia asimétrica catalizada con rutenio, realizada sobre el derivado de 8-ceto-pentostatina sin proteger obtenido, da lugar a un aumento significativo en el rendimiento de pentostatina (aproximadamente 4 veces en comparación con los métodos establecidos), desplazando la estereo-selectividad de la reacción global hacia en enorme exceso y, preferentemente, completamente hacia el anómero deseado de (8-R)-pentostatina. Aunque no se desean vinculaciones teóricas, es asumible suponer que la presencia del grupo ceto es crítica para evitar la formación de estereoisómeros no deseados en el átomo de carbono C-8, de forma que en la etapa posterior el derivado de 8-ceto-pentostatina obtenido puede ser empleado en forma no protegida, lo que hace que el esquema de síntesis global sea significativamente menos laborioso.

45 La presente invención se describirá en lo que sigue con respecto a realizaciones particulares y haciendo referencia a algunos dibujos, pero la invención debe entenderse que no está limitado a los mismos sino solamente por las reivindicaciones anejas. Los dibujos descritos son solamente esquemáticos y representativos y deben ser

considerados como no limitativos.

5 Cuando la expresión "que comprende" se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones, no excluye otros elementos o etapas. Para los fines de la presente invención, la expresión "que consiste en" se considera que es una realización preferida de la expresión "que comprende". Si en lo que sigue se define un grupo que comprende al menos un cierto número de realizaciones, esto debe entenderse también que define un grupo, que consiste preferentemente solo en estas realizaciones.

Cuando se usa un artículo indefinido o definido para hacer referencia a un nombre singular, por ejemplo, "uno", "una", "el" o "la", esto incluye un plural de ese nombre, salvo que se establezca específicamente otra cosa.

10 En el caso de que se indiquen valores numéricos en el contexto de la presente invención, el experto en la técnica comprenderá que el efecto técnico de la característica en cuestión está asegurado en un intervalo de exactitud, que normalmente abarca una desviación del valor numérico dado de $\pm 10\%$ y, preferentemente, de $\pm 5\%$.

Se proporcionarán otras definiciones de términos en lo que sigue en el contexto en que son usados los términos. Los siguientes términos o definiciones se proporcionan solamente para ayudar a la comprensión de la invención. Estas definiciones no se debe considerar que tienen un alcance menor que lo comprendido por un experto en la técnica.

15 La presente invención se refiere a un método para la síntesis estereo-selectiva de pentostatina, que comprende:

(i) hacer reaccionar 6,7-dihidroimidazo-[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona y un 2-desoxirribonucleósido; y

(ii) reducir el derivado de 8-ceto-pentostatina obtenido en la etapa (i) mediante hidrogenación de transferencia asimétrica catalizada con rutenio;

en que la reacción en la etapa (i) está enzimáticamente catalizada por nucleósido desoxirribosiltransferasa.

20 La reacción de transglicosilación en la etapa (i) está catalizada por nucleósido desoxirribosiltransferasa (es decir, nucleósido:purina(pirimidina) desoxi-D-ribosiltransferasa que tiene el número de EC 2.4.2.6). Esta enzima cataliza la reacción general: 2-desoxi-D-ribosil-base¹ + base² = 2-desoxi-D-ribosil-base² + base¹. Normalmente, la enzima empleada es una enzima recombinante, que está disponible en el comercio a partir de diversos proveedores.

25 La 6,7-dihidroimidazo-[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona se puede hacer reaccionar con cualesquiera 2-desoxirribonucleósidos, como 2-desoxirribonucleósidos que se producen de forma natural, así como con sus análogos producidos de forma artificial. Ejemplos de 2-desoxirribonucleósidos adecuados incluyen 2-desoxi-adenosina, 2-desoxi-citosina, 2-desoxi-guanina, 2-desoxi-uridina- 2-desoxi-timidina, 2-desoxi-inosina y sus 5-aza-derivados.

En una realización preferida, el 2-desoxirribonucleósido usado es 2-desoxi-uridina.

30 Como la reacción de transglicosilación en la etapa (i) es reversible, la cantidad de 2-desoxirribonucleósido usado normalmente es mayor que la cantidad de 6,7-dihidroimidazo[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona, es decir, el 2-desoxirribonucleósido es usado en un exceso en moles.

35 En una realización particular, el 2-desoxirribonucleósido es usado en una cantidad de 1,5 a 10 equivalentes molares de la cantidad de 6,7-dihidroimidazo[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona. Preferentemente, el 2-desoxirribonucleósido es usado en una cantidad de 4 a 7 equivalentes molares de la cantidad de 6,7-dihidroimidazo[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona. Por ejemplo, el 2-desoxirribonucleósido es usado en una cantidad de 4,0, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, o 7,0 equivalentes molares de la cantidad de 6,7-dihidroimidazo[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona, siendo particularmente preferido un exceso en moles de 5,6, 5,8 o 6,0

40 Normalmente, la reacción en la etapa (i) se realiza a una temperatura entre 10°C y 50°C. Preferentemente, se realiza a una temperatura entre 25°C y 35°C. Por ejemplo, la reacción en la etapa (i) se puede realizar a una temperatura de 25°C, 28°C, 30°C, 32°C o 35°C.

Además, la reacción en la etapa (i) se realiza normalmente a un valor del pH entre 6,0 y 9,0. Preferentemente, se realiza a un valor del pH entre 7,5 y 8,0. Por ejemplo, la reacción en la etapa (i) se puede realizar a un pH de 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 o 8,0.

45 Debido a la estereo-especificidad de la transglicosilación enzimática, el único producto es el β -anómero deseado, es

decir, el derivado de 8-ceto-pentostatina, que da lugar adicionalmente a una simplificación significativa del esquema de síntesis y no hay necesidad de etapas de purificación adicionales con el fin de separar el anómero α . El rendimiento del derivado de 8-ceto-pentostatina obtenido por tanto es hasta dos veces mayor en comparación con los métodos de glicosilación establecidos.

5 El documento US 20090012288 A1 describe la preparación de un catalizador de rutenio mediante la reacción de di- μ -cloro-bis[(p-cimeno)cloro-rutenio] y N-(arilsulfonil)-1,2-diariletil-diamina y el uso de este catalizador para la reducción estereo-selectiva de un derivado de 8-ceto-pentostatina protegido. Sin embargo, no se podía esperar que casualmente un catalizador de rutenio funcionara también en una hidrogenación de transferencia asimétrica
10 realizada sobre un derivado no protegido. En lugar de ello, era razonable suponer la formación de una cantidad significativa de productos secundarios.

En una realización preferida, la reacción en la etapa (ii) está catalizada por RuCl(p-cimeno)[(R,R)-Ts-DPEN] (es decir, [N-[(1R,2R)-2-(amino- κ N)-1,2-difeniletil]-4-metilbencenosulfonamidato- κ N] cloro[(1,2,3,4,5,6- η)-1-metil-4-(1-metiletil)benceno]-rutenio).

De forma particularmente preferida, la reacción en la etapa (ii) se realiza en una mezcla de trietilamina y ácido fórmico, es decir, bajo condiciones de reacción comparablemente suaves. Normalmente, la mezcla empleada comprende 3 volúmenes de trietilamina y 1 volumen de ácido fórmico.

Las condiciones de reacción empleadas en la etapa (ii) dan lugar a un desplazamiento hacia un valor de exceso > 99% del isómero 8-R deseado.

Como consecuencia, el método de la presente invención da lugar a un aumento de 4 veces del rendimiento del producto de reacción final pentostatina en comparación con los métodos establecidos en la técnica.

La invención se describe adicionalmente mediante las figuras y los ejemplos que siguen, se son solamente para fines de ilustrar realizaciones específicas de esta invención y no están concebidos como una limitación de la materia objeto reivindicada en modo alguno.

Ejemplos

25 Ejemplo 1: Síntesis de 3-((2R,4S,5R)-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-tetrahydro-furan-2-il)-6,7-dihidroimidazo[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona

Se disolvieron 1,5 g de cloruro de potasio en 0,5 l de tampón de fosfato 20 mM, pH 8,0. Seguidamente se añadieron 10 g de 2'-desoxiuridina y 20 ml de solución de nucleósido desoxirribosiltransferasa (10 mg/ml) bajo agitación. La solución resultante se calentó a 25-30°C y se añadieron 2,0 g de 6,7-dihidroimidazo-[4,5-d][1,3]diazepin-8(3H)-ona y monodimetil-sulfóxido. La mezcla resultante se purificó usando cromatografía de columna de fase inversa a baja presión para obtener 1,58 g (78%) de sustancia pura (más de 99% de pureza, determinada mediante HPLC).

30 Ejemplo 2: síntesis de (R)-3-((2R,4S,5R)-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-tetrahydro-furan-2-il)-3,6,7,8-tetrahydroimidazo[4,5-d]-[1,3]diazepin-8-ol (es decir, pentostatina).

Bajo atmósfera de N₂, se añadió 1,0 g de 3-((2R,4S,5R)-4-hidroxi-5-(hidroximetil)-tetrahydrofuran-2-il)-6,7-dihidroimidazo[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona a un matraz con 20 mg de RuCl(p-cimeno)[(R,R)-Ts-DPEN]. Se añadió una mezcla desgasificada de 10 ml de trietilamina y 3,3 ml de ácido fórmico. La mezcla de reacción se agitó un día a 40°C bajo purga con N₂ hasta que se consiguió una conversión 99% (determinada mediante HPLC). Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió en 200 ml de tampón de fosfato 100 mM, pH 7,5. El producto se purificó usando cromatografía de columna de fase inversa a baja presión para obtener 0,84 g (83%) de pentostatina pura con una relación de isómeros 8R/8S de aproximadamente 1000:1 (determinada mediante HPLC).

La relación de isómeros 8-R/8-S de pentostatina se determinó mediante HPLC. La Figura 5 ilustra un cromatograma de HPLC representativo de la mezcla de reacción después de una reducción de 8-ceto-pentostatina no protegida usando una hidrogenación de transferencia asimétrica catalizada por rutenio según la presente invención. El cromatograma pone de manifiesto la presencia (casi) exclusiva del isómero 8-R deseado (es decir, pentostatina) en una cantidad de aproximadamente 99,8% (tiempo de retención: 9,7 minutos). El isómero 8-S no deseado solo está presente como un resto en una cantidad de aproximadamente 0,2% (tiempo de retención: 8 minutos).

Como un ejemplo comparativo, se produjo pentostatina de acuerdo con el esquema de síntesis establecido por Chan, E. et al. (1982) J. Org. Chem. 47, 3457-3464. El esquema de reacción incluye la reducción de 8-ceto-pentostatina usando NaBH₄ en metanol. La Figura 4 ilustra un cromatograma de HPLC representativo de la mezcla de reacción después de la etapa de reducción. El cromatograma pone de manifiesto la presencia concomitante de pentostatina (es decir, el isómero 8-R) en una cantidad de

ES 2 764 136 T3

54,3% (tiempo de retención: 9,4 minutos) y el isómero 8-S contaminante en una cantidad de 45,7% (tiempo de retención: 8,2 minutos), respectivamente, demostrando así las propiedades superiores del esquema de síntesis de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Método para la síntesis estereo-selectiva de pentostatina, que comprende:
 - (i) hacer reaccionar 6,7-dihidroimidazo-[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona y un 2-desoxirribonucleósido; y
 - (ii) reducir el derivado de 8-ceto-pentostatina obtenido en la etapa (i) mediante hidrogenación de transferencia asimétrica catalizada por rutenio;
- 5 en que la reacción en la etapa (i) está enzimáticamente catalizada por nucleósido desoxirribosiltransferasa.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el 2-desoxirribonucleósido es 2-desoxiuridina.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el 2-desoxirribonucleósido es usado en una cantidad de 1,5 a 10 equivalentes molares de la cantidad de 6,7-dihidroimidazo[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona.
- 10 4. El método de la reivindicación 3, en el que el 2-desoxirribonucleósido es usado en una cantidad de 4 a 7 equivalentes molares de la cantidad de 6,7-dihidroimidazo[4,5-d]-[1,3]diazepin-8(3H)-ona.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la reacción en la etapa (i) se realiza a una temperatura entre 10°C y 50°C.
- 15 6. El método de la reivindicación 5, en el que la reacción en la etapa (i) se realiza a una temperatura entre 25°C y 35°C.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la reacción en la etapa (i) se realiza a un valor del pH entre 6,0 y 9,0.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la reacción en la etapa (i) se realiza a un valor del pH entre 7,5 y 8,0.
- 20 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la reacción en la etapa (ii) está catalizada por RuCl(p-cimeno)[(R,R)-Ts-DPEN].
10. El método de la reivindicación 9, en el que la reacción en la etapa (ii) se realiza en una mezcla de trietilamina y ácido fórmico.

FIGURA 1

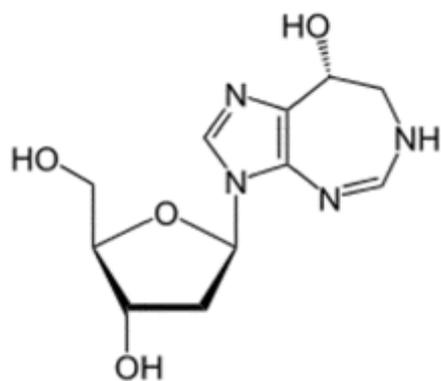


FIGURA 2

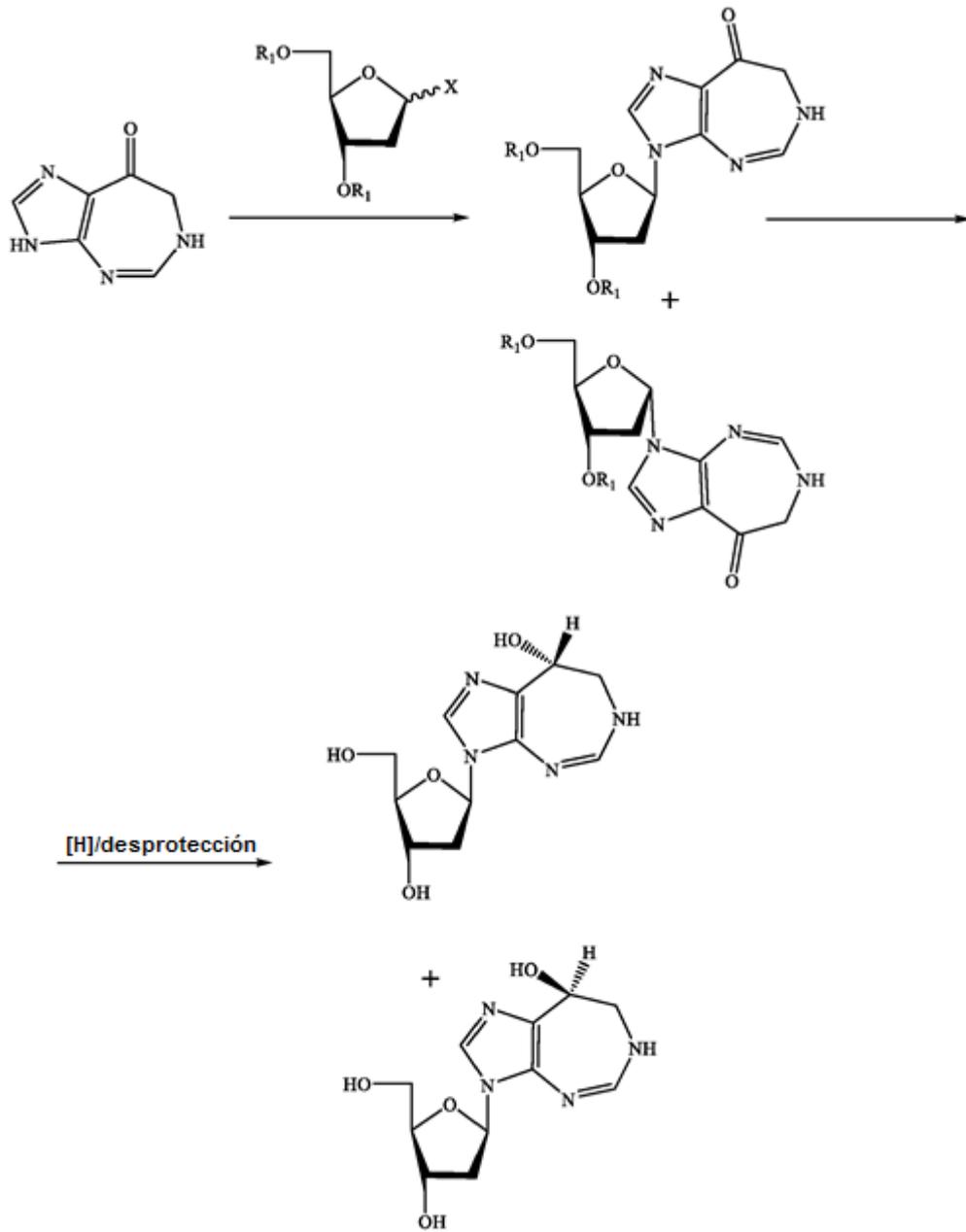


FIGURA 3

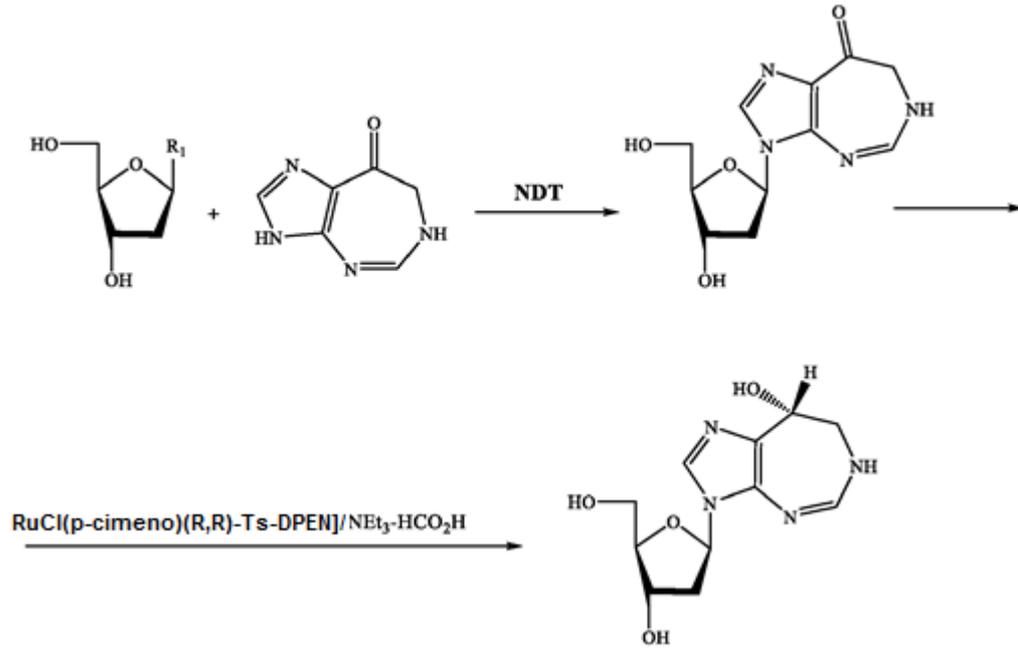


FIGURA 4

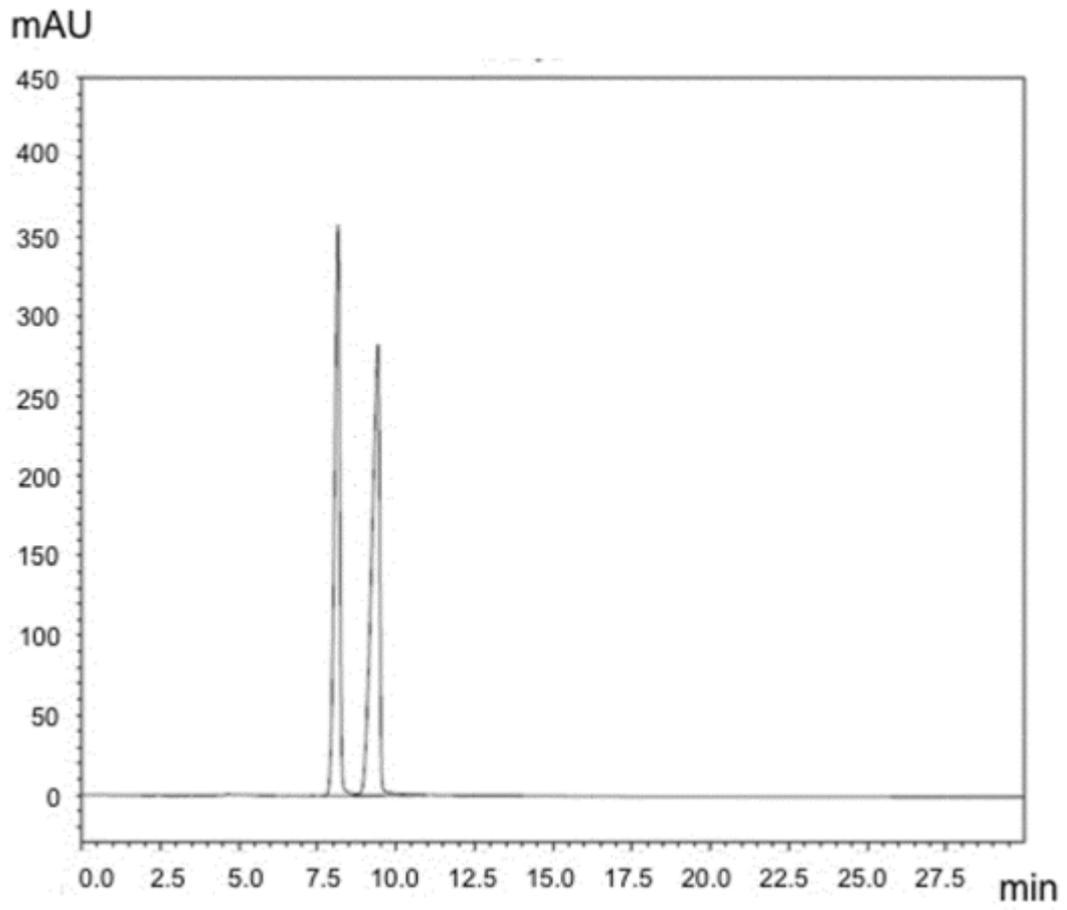


FIGURA 5

