República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0613494-7 A2**

BRPI0613494A2

(22) Data de Depósito: 31/05/2006
(43) Data da Publicação: 11/01/2011
(RPI 2088)

(51) Int.Cl.:
C07D 495/04

(54) Título: **SÍNTESE DE DEOXIBIOTINIL HEXAMETILENODIAMINA-DOTA**

(30) Prioridade Unionista: 30/06/2005 IT RM2005 A 000345

(73) Titular(es): SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A.

(72) Inventor(es): MARIA DI MARZO, MAURO MARZI

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006062800 de 31/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/003478de 11/01/2007

(57) Resumo: SÍNTESE DE DEOXIBIOTINIL NEXAMETILENODIAMINA-DOTA.A presente invenção refere-se a um processo para a síntese de deoxibiotinil hexametilenodiamina-DOTA. O dito processo compreende reagir a biotinil hexametilenodiamina com tri-t-butil-DOTA na presença de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino fosfônio, como o agente de condensação, e trietilamina, como a base.

PI0613494-7

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"SÍNTESE DE DEOXIBIOTINIL HEXAMETILENODIAMINA-DOTA".**

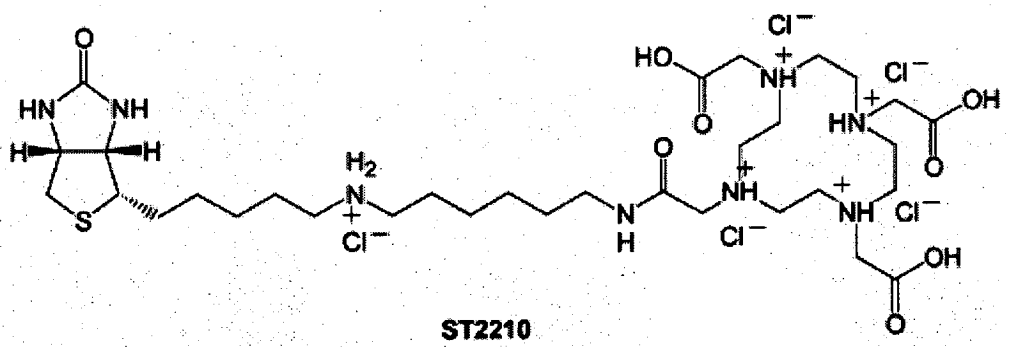
CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um procedimento melhorado para a síntese de deoxibiotinil hexametilenodiamina-DOTA.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O composto de deoxibiotinil hexametilenodiamina-DOTA foi descrito no pedido de patente internacional WO 02066075 sob o nome da Requerente. DOTA é ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecanotetra-acético (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecanotetra-acético).

A fórmula estrutural de deoxibiotinil hexametilenodiamina-DOTA é aqui relatada com relação à integralidade.

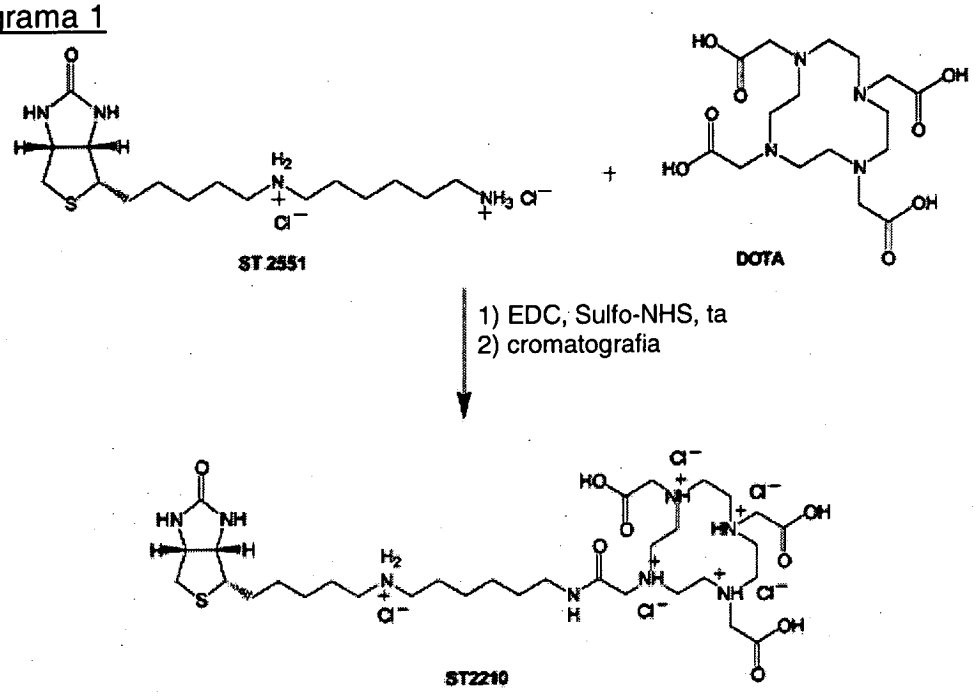


ST2210

O processo para a sintetização deste produto é também descrito no mesmo pedido de patente WO 02066075 e também relatado no exemplo na página 15 do pedido acima mencionado. O composto aqui relatado como ST2210 corresponde ao composto 4 do Exemplo do WO 02066075. Em particular o produto intermediário cloridrato de biotinil hexametilenodiamina (ST2551 ou o composto 3 do exemplo do WO 02066075), foi obtido com cromatografia preparatória com um rendimento de 55 % e um título não definido.

O produto de deoxibiotinil hexametilenodiamina-DOTA final (ST2210 ou composto 4 do exemplo da WO 02066075), foi obtido mediante a condensação de ST2551 com DOTA como ilustrado no diagrama 1.

Diagrama 1



A reação conduzida desta maneira produziu produtos sintéticos inferiores (a presença em DOTA de quatro equivalentes de funcionalidade carboxílica não protegidos, envolveu a formação de vários subprodutos) e problemas com a purificação. De fato, para obter o produto final foi necessário utilizar a HPLC em uma escala preparatória com um rendimento de 20 %.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

No estudo ampliado, de modo a melhorar o rendimento do processo e tornar o processo de purificação mais fácil, métodos de síntese alternativos foram examinados.

O processo de síntese melhorado possui as seguintes vantagens sobre aquele descrito no começo:

1. na etapa de acoplamento ou condesação (descrito no WO 02066075 como "etapa d") o uso de tri-terc-butil-DOTA evita a formação de mais produtos de condensação, devido à reatividade parcial das carboxilas livres, que ocorreram mesmo quando se trabalha sob condições de pH controladas;

2. ainda na mesma etapa, o agente de condensação e a base foram trocados; o rendimento melhorado foi obtido usando hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfônio (PyBOP – Hexafluorofosfato de

benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfônio), como o agente de condensação e trietilamina (TEA) como a base;

3. biotinil hexametilenodiamina (ST2251) é usada como uma base livre, tendo mostrado que o uso do dicloridrato causou um aumento na quantidade de produtos indesejáveis; em particular existiu uma formação perceptível de um subproduto correspondente ao dímero, em que o ST2551 reage com 2 moléculas de tri-t-butil-DOTA;

4. a etapa final consiste na hidrólise dos três grupos de terc-butila em solução aquosa de ácido, por exemplo, usando de 3N a 6N de HCl em relações diferentes com o produto durante momentos variando entre 1 hora e 12 horas, com rendimentos variando entre 96 % e 98 %;

5. eliminação do processo de síntese de dois estágios de cromatografia preparatória um tanto laboriosos;

6. obter um produto com uma titulação de 94 % a 96 %.

Portanto o objeto da presente invenção é um processo para a sintetização de deoxibiotinil hexametilenodiamina-DOTA que compreende a reação de biotinil hexametilenodiamina com tri-t-butil-DOTA na presença de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfônio, como o agente de condensação, e trietilamina, como a base.

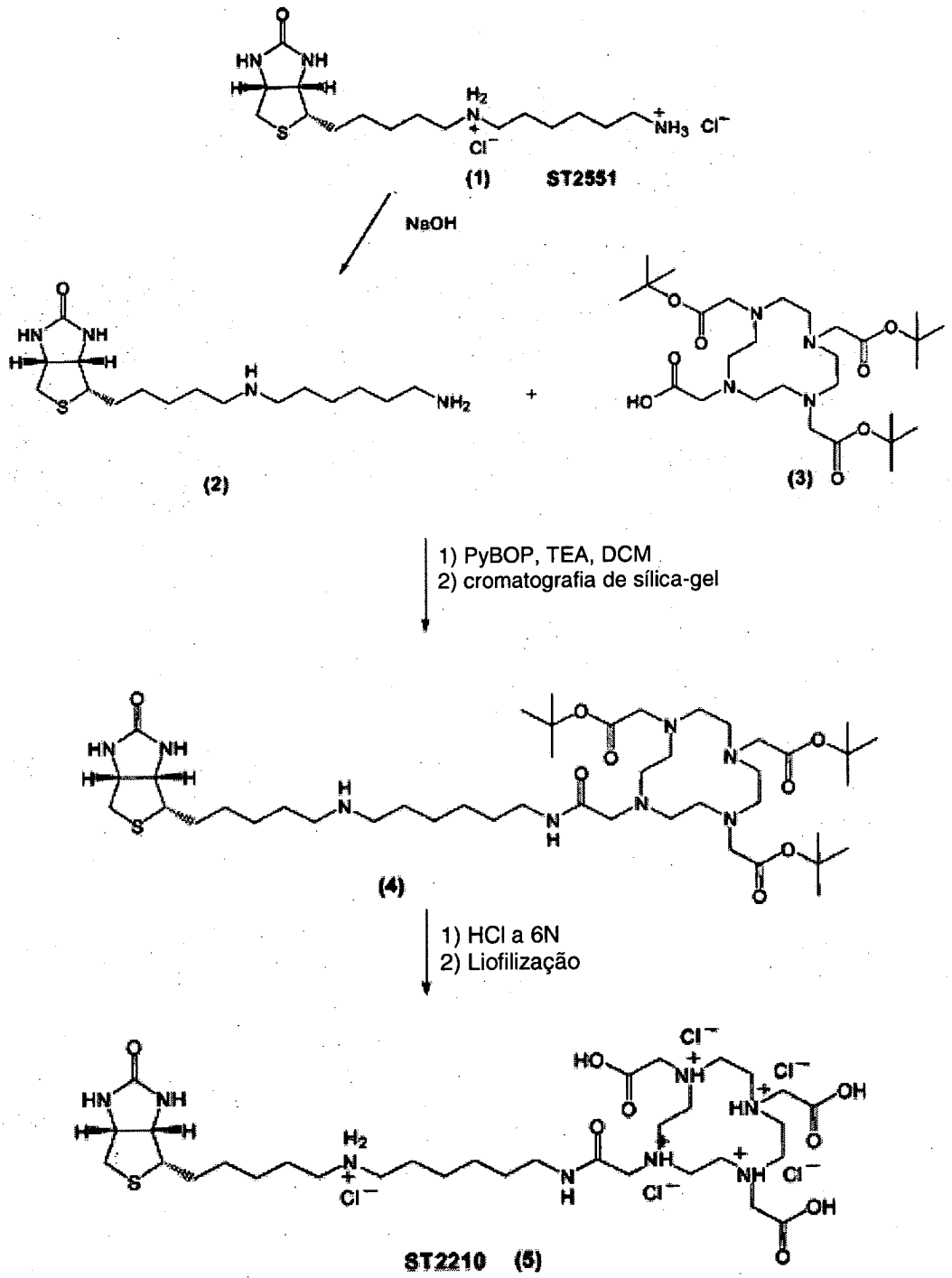
O processo da presente invenção portanto envolve uma etapa que segue a etapa de condensação que é a hidrólise em pHs ácidos.

A condensação é preferivelmente realizada em um solvente orgânico. Mais preferivelmente este solvente é diclorometano.

Destes analisados, o melhor método de síntese desenvolvido é aquele que envolveu os estágios ilustrados no diagrama 2.

Além disso, a invenção é ilustrada com os Exemplos que não são de nenhuma maneira limitativos da própria invenção.

Diagrama 2



EXEMPLOS (para a numeração dos compostos se referir ao Diagrama 2)

Métodos

Os testes realizados foram monitorados usando um sistema de HPLC analítico conectado a um detector de formação de diodo e a um espectrômetro de massa com uma eletropulverização. O método analítico desenvolvido envolve o uso de uma coluna analítica ACE C-18 (150 x 4,60

mm, 5 μ), uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min e um gradiente de eluição linear de 5 a 95 % de B em 20 min (A = H_2O + 0,1 % TFA; B = AcCN + 0,1 % TFA), ou 10 a 90 % de B em 20 min, ou alternativamente uma solução isocrática a 10 % de B durante 6 min, seguido pelo gradiente 10 a 90 % de B em 20 min. Com relação ao produto final ST2210, um método que opera em uma solução isocrática de B a 15 % é usado durante 40 min. A faixa de comprimentos de onda examinada pelo detector é de 205 a 400 nm.

O monitoramento rápido por TLC envolve o uso de misturas eluentes do tipo ácido OEt: isopropanol: NH_3 30 % ou DCM : isopropanol:NH_3 30 % (4:5:1), revelando os produtos separados (não visíveis por UV) por meio de I_2 ou reagente de fosfomolíbdico.

Preparação de biotinil hexametilenodiamina (ST2551) como a base livre (2.)

O produto ST2551 [(1), pureza de 91 %, 400 mg, 1,0 mmol) foi dissolvido em água (20 ml) e a solução foi colocada em um funil de separação; uma solução de NaOH a 2M (20 ml) foi adicionada e o produto precipitado foi extraído com DCM (40 ml) três vezes. As fases orgânicas combinadas foram desidratadas com Na_2SO_4 anídrico e evaporadas sob pressão reduzida. O produto foi obtido (2) como um sólido branco (290 mg, rendimento = 98 %).

^{1}H-RMN (200 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 1,25 - 2,05 [m, 16H, $CH(CH_2)_4$ e $NHCH_2(CH_2)_4$)]; 2,50 - 3,30 (m, 9H, 2 x HCHS e CHS e 3 x CH_2N); 4,32 (m, 1H, CHCHNH); 4,51 (m, 1H, CHCHNH); 5,77 (s, 1H, CONH); 6,05 (s, 1H, CONH).

ES-MS m/z: 329,5 $[M + H]^+$.

Síntese de deoxibiotinil hexametilenodiamina-terc-butil-DOTA (4).

Uma solução de tri-terc-butil-DOTA [(3), 524 mg, 0,915 mmol, 1 eq], PyBOP (714 mg, 1,37 mmol, 1,5 eq) e trietilamina (166 μl, 1,19 mmol, 1,3 eq) em DCM (5 ml) deixada sob agitação em temperatura ambiente durante 10 minutos, foi adicionada gota a gota à uma solução de ST2551-base livre [(2), 300 mg, 0,915 mmol, 1 eq) em DCM (5 ml), obtida mediante o aquecimento da mistura em 40 °C durante 5 min. Foi deixada reagir à temperatura ambiente durante 3 horas, monitorando a integralidade da reação por

TLC e LC-MS, de acordo com os métodos acima.

No final da reação o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, o resíduo foi dissolvido em DCM e foi lavado duas vezes com NaOH a 1M. A fase orgânica foi desidratada em Na_2SO_4 e evaporada sob vácuo. O resíduo assim obtido passaria por cromatografia em uma coluna de sílica-gel (relação em peso de produto bruto: sílica 1:30), usando como o sistema eluente uma mistura de DCM: isopropanol 5:4 a qual é adicionada uma concentração crescente de NH_3 aquoso a 30 % (de 0,2 a 1). A coluna foi acondicionada com a mistura de DCM inicial: isopropanol: NH_3 (5: 4: 0,2) e o processo continuou com o gradiente de NH_3. [a mistura eluente geralmente se torna homogênea após a agitação; somente na fase final da eluição, com NH_3 = 1 pode-se comprovar ser necessário adicionar isopropanol para melhorar a miscibilidade, neste caso usando a relação volumétrica (4:5:1) (DCM:isopropanol:NH_3). Um produto oleoso ligeiramente amarelo foi obtido que tendeu a produzir um sólido espumoso sob vácuo [(4), 600 mg, rendimento = 74 %).

^{1}H-RMN (300 MHz, DMSO-d_6, T = 50°C) δ (ppm): 1,16 - 1,70 (m, 43H, $CH(CH_2)_4$ e $NHCH_2(CH_2)_4$ e 9 x CH_3); 2,40 - 3,32 (m, 34H, 2 x HCHS e 3 x CH_2N, 8 x DOTA-anel CH_2 e CHS e 4 x DOTA CH_2CO e NH amina); 4,13 (m, 1H, CHCHNH); 4,29 (m, 1H, CHCHNH); 6,18 (s, 1H, NH biotina); 6,21 (s, 1H, NH biotina); 8,10 (t, 1H, NH amida).

^{13}C-RMN (75 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 27,22; 27,35; 27,56; 28,50; 28,61; 29,04; 29,23; 30,14; 30,25; 30,39; 39,14; 40,42; 50,07; 52,59; 52,82; 53,24; 54,72; 56,14; 56,92; 57,38; 59,31; 60,05; 61,90; 80,75; 163,34; 170,98; 171,25.

ES-MS m/z: 883,4 $[M + H]^+$.

<u>Síntese de deoxibiotinil hexametilenodiamina -DOTA [ST2210, (5)].</u>

Uma solução de (4) (210 mg, 0,238 mmol) em HCl a 6N [1 ml, 20 % p/v solução de (4)] foi deixada sob agitação em temperatura ambiente durante 1 hora. Depois a mistura foi evaporada em pressão reduzida, o resíduo foi dissolvido em H_2O (aprox. 1:50 p/v) e a solução foi submetida à liofilização. Um sólido branco foi obtido (205 mg, 96 %), ^{1}H-RMN (200 MHz, DMSO-

d_6) δ (ppm): 1,30 - 1,77 [m, 16H, $CH(CH_2)_4$ e $NHCH_2(CH_2)_4$]; 2,59 (d, 1H, HCHS); 2,77 - 2,88 (m, 7H, HCHS e 3 x CH_2N); 2,98 - 3,70 (m, 25H, 8 x DOTA-anel CH_2 e CHS e 4 x DOTA CH_2CO); 4,15 (m, 1H, CHCHNH); 4,31 (m, 1H, CHCHNH); 7,58 (br s, 2H, 2 x biotina NH); 8,86 (t, 1H, NH amida); 9,19 (br s, 2H, NH_2^+).

^{13}C-RMN (75 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 25,77; 25,85; 26,32; 26,53; 26,70; 28,74; 29,16; 47,08; 47,16; 48,54; 49,00; 51,35; 53,13; 54,51; 55,38; 56,02; 59,90; 61,61; 163,44; 165,58; 168,90; 172,31.

ES-MS m/z: 715,4 $[M + H]^+$.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a sintetização de deoxibiotinil hexametilenodiamina-DOTA que envolve a reação de biotinil hexametilenodiamina com tri-t-butil-DOTA na presença de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfônio, como o agente de condensação, e trietilamina, como a base.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a biotinil hexametilenodiamina é reagida com tri-t-butil-DOTA em um solvente orgânico.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2, em que o solvente orgânico é diclorometano.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, que envolve uma etapa subseqüente de hidrólise em um ambiente aquoso com um pH ácido.

RESUMO

Patente de Invenção: **"SÍNTESE DE DEOXIBIOTINIL HEXAMETILENODIAMINA-DOTA".**

A presente invenção refere-se a um processo para a síntese de deoxibiotinil hexametilenodiamina-DOTA. O dito processo compreende reagir a biotinil hexametilenodiamina com tri-t-butil-DOTA na presença de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino fosfônio, como o agente de condensação, e trietilamina, como a base.