

(11) Número de Publicação: **PT 1932918 E**

(51) Classificação Internacional:
C12P 19/40 (2007.10) **C12N 9/10** (2007.10)
C07D 473/40 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2006.12.15	(73) Titular(es): EXPLORA LABORATORIES SA VIA RIME, 38 6850 MENDRISIO	CH
(30) Prioridade(s):		
(43) Data de publicação do pedido: 2008.06.18	(72) Inventor(es): GABRIELE ZUFFI SIMONE MONCIARDINI	IT IT
(45) Data e BPI da concessão: 2009.09.16 002/2010	(74) Mandatário: MARIA MANUEL RAMOS LUCAS LARGO DE S. DOMINGOS N° 1 2910-092 SETÚBAL	PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE CLADRIBINA**

(57) Resumo:

Descrição

MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE CLADRIBINA

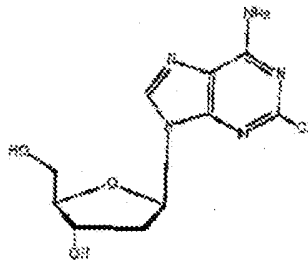
Campo da Aplicação

A presente invenção diz respeito a um método para produzir cladribina (2-cloro-2'-desoxiadenosina).

Mais especificamente, a invenção diz respeito a um método para produzir cladribina através de uma reacção de transglicosilação.

Técnica anterior

Como é do conhecimento geral, a cladribina (2-cloro-2'-desoxiadenosina) é uma molécula usada como medicamento antineoplásico no tratamento de leucemia e outras neoplasias e tem a seguinte fórmula (I);



Foram descritos vários métodos de síntese de Cladribina, entre eles, é realçado o seguinte.

O Pedido de Patente US N°. 5,208,327 (Chen, R.H.K., registado em 16 de Abril de 2002) descreve um método de síntese de cladribina, começando com a guanosina em 7 passos de síntese química com o uso de numerosos reagentes.

O Pedido de Patente US N°. 6,252,061, descreve a síntese, a qual prevê uma halogenação directa de 2,6-diaminopurina desoxirribose, numa mistura de solventes próticos e apróticos, na presença de um ácido Lewis e um nitrito orgânico. A síntese prevê uma coluna de purificação do produto final.

O Pedido de Patente Internacional WO 2004/028462 descreve uma síntese para uma halogenação directa de 2'-desoxiguanosina, seguida por uma separação cromatográfica para cada intermediário.

O pedido de patente EP 173 059 descreve uma síntese que prevê uma condensação de purina base e uma desoxirribose adequadamente protegida.

O Pedido de Patente US n°. 2002/0052491, descreve uma síntese que começa com a Cloroadenina e desoxirribose adequadamente protegida, com rendimentos melhorados em relação à EP 173,059 e eliminação do passo da coluna de purificação.

O Pedido de Patente US n°. 2004/0039190, descreve uma reacção entre uma cloroadenina adequadamente protegida e uma desoxirribose adequadamente protegida, com rendimentos melhorados em relação à US 2002/0052491.

A produção de cladribina através de processos de síntese química tem limitações significativas, visto tais processos muitas vezes consistirem de uma reacção com múltiplas etapas, o que compreende reacções de protecção e não protecção que começa nos componentes que são dispendiosos e/ou difíceis de encontrar no mercado, e por vezes, envolve

reações não-estereoespecíficas (isto é, que leva à produção do produto final em ambas as conformações α e β). Tais processos são, por conseguinte, longos e dispendiosos, e os rendimentos são raramente satisfatórios. Este tipo de processos, devido à sua natureza, não são adequados a serem empregues numa escala industrial.

Por outro lado, as reações enzimáticas, tais como, por exemplo, as reações de glicosilação e transglicosilação, são melhor adequadas para uso a um nível industrial e a variedade das enzimas disponíveis na natureza, permite seleccionar a estereoespecificidade e regioselectividade desejadas da reacção. Então, tais reações, normalmente requerem um passo final de purificação (por exemplo, através de precipitação ou filtração) da mistura do produto a fim de isolar, ao nível de pureza desejado, o produto da enzima, o substrato não reactivo e dos possíveis co-produtos da reacção (por exemplo, isómeros).

Outra vantagem das reações enzimáticas, em relação às reações de síntese, é o facto de que as enzimas que são usadas, em adição a estarem disponíveis no mercado, são também facilmente encontradas em grandes quantidades e a baixo custo, na natureza, por exemplo no cultivo de células bacterianas.

Por conseguinte, é possível cultivar a bactéria que produz a enzima de interesse e isolar a enzima das células bacterianas. Alternativamente, as reações enzimáticas podem ser efectuadas ao usar a totalidade das células bacterianas, a solução mais recente normalmente conduzindo a reações menos eficientes (por conseguinte, com menores

rendimentos) que são, contudo, mais convenientes e económicos.

As reacções enzimáticas podem ser classificadas em reacções de enzimas livres e reacções de enzimas imobilizadas. No primeiro caso, as enzimas são adicionadas à mistura de reacção, enquanto no segundo caso, as enzimas (ou células bacterianas) são imobilizadas nos portadores adequados.

A imobilização das enzimas ou células bacterianas, leva à vantagem de não ter de separar as enzimas da mistura do produto no final da reacção e de permitir, por conseguinte, recuperar as enzimas ou células e reutilizá-las para uma reacção subsequente. A imobilização permite, além do mais, efectuar as reacções continuamente ou em lotes, obtendo, por conseguinte, maiores rendimentos e atingindo uma maior aptidão para uso a uma escala industrial.

Por fim, as reacções enzimáticas podem ser optimizadas através de manipulação genética das bactérias que produzem a enzima. Tais manipulações são normalmente destinadas a conferir um maior rendimento enzimático ou actividade enzimática. No entanto, pode dizer respeito, a outros factores tais como a supressão da produção de outras possíveis enzimas pelo microrganismo, a estereoselectividade ou regioselectividade da enzima de interesse, etc.

As reacções enzimáticas para produzir cladribina são descritas em vários artigos e patentes. Entre estes, realçamos o seguinte.

Em Michailopulo, I A et al (1993) Nucleosides & Nucleotides, 12 (3&4) 417-422, a síntese bioquímica de Cladribina, é descrita começando pela cloroadenina e desoxiguanosina na presença de células E. coli.

O Pedido de Patente US nº. 2006/0094869, descreve uma reacção entre cloroadenina e desoxirribose-1-fosfato na presença da enzima purina nucleósido fosforilase (PNP) purificada.

Os documentos acima mencionados descrevem os processos de produção da cladribina que enquanto vantajosos, com respeito aos métodos químicos acima previstos, envolveu, mesmo assim, várias desvantagens, incluindo baixos rendimentos, substratos (por exemplo, desoxiguanosina e desoxirribose 1-fosfato) que são difíceis de encontrar e por fim, passos de processo (tal como o isolamento final da coluna cromatográfica) de aplicação industrial difícil.

O mais recente passo de isolamento e purificação do produto final tem sido normalmente o mais problemático de todo processo da produção inteira da cladribina através de meios enzimáticos.

O problema técnico subjacente na presente invenção é por conseguinte tornar disponível um método para a produção de cladribina, o que permite obter rendimentos de produto que são iguais a ou maiores que aqueles da técnica anterior, começando nas matérias-primas económicas e fáceis de encontrar e os quais são ao mesmo tempo economicamente vantajosas e permitem um fácil isolamento do produto final.

Sumário da Invenção

Tal problema é resolvido de acordo com a presente invenção, por um método para produzir cladribina (2-cloro-2'-desoxiadenosina) que compreende os passos de:

- a) reacção de 2-desoxiuridina com 2-cloroadenina, na presença de uridina fosforilase (UPase) e purina nucleósido fosforilase (PNPase) num meio de reacção aquosa que contém possivelmente até 40% v/v de um solvente aprótico dipolar, para obter cladribina dissolvida no dito meio de reacção;
- b) isolamento da cladribina por precipitação através de concentração e alcalinização do meio da reacção até um pH de 11.5-12.5.

As enzimas UPase e PNPase, podem ser apresentadas no meio da reacção na forma de enzimas livres ou enzimas imobilizadas em portadores adequados, ou podem ser produzidas in situ por células que as produzem, que por sua vez podem ser apresentadas no meio da reacção numa forma livre ou forma imobilizada.

Quando são usadas células produtoras de enzimas UPase ou células produtoras de enzimas PNPase, ou quando são usadas células produtoras de enzimas UPase e PNPase, tais células são de preferência imobilizadas por absorção numa fraca resina de troca de anião, em particular numa fraca resina de troca de anião com grupos de amino funcionais. Particularmente preferida é uma resina escolhida do grupo que compreende resinas Dowex MWA1 (Dow Chemical), Diaion WA30 (Mitsubishi), Duolite A7®, Amberlite FPA54®, Amberlyst 21 e Duolite A568® (Rohm & Haas). A mais recente resina é particularmente preferida para os objectos da presente invenção.

O processo para obter a imobilização das células produtoras de UPase e/ou PNPase em resinas fracas de troca de anião, é descrito no pedido EP 06005241 do mesmo Requerente.

De acordo com uma realização da invenção, as células supracitadas são células das espécies *Escherichia coli*.

Particularmente preferido é o uso de células *Escherichia coli* da estirpe DH5alpha, transformada através de vectores plasmídico com sequências indicadas na Sequência ID N°. 1 e 2.

O solvente aprótico dipolar supracitado é geralmente representado por dimetilformamida ou por dimetilsulfóxido ou misturas do mesmo e é de preferência dimetilformamida.

O passo da alcalinização supracitado é de preferência efectuado para obter um pH igual a cerca de 12.

De preferência, 2-desoxiuridina e 2-cloroadenina são feitos reagir num rácio molar que varia de 1:1 a 3:1, vantajosamente cerca de 2:1.

A reacção entre 2-desoxiuridina e 2-cloroadenina, é geralmente efectuada num meio de solução tampão, por exemplo através de um fosfato de solução de tampão, a um pH no intervalo de 6.5-8.5, de preferência 7.3-7.8.

A reacção é geralmente conduzida a uma temperatura no intervalo de 50-70°C, adequadamente a cerca de 60°C.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, a reacção entre 2-desoxiuridina e 2-cloroadenina, é efectuada por

adicionar gradualmente, a um meio da reacção aquosa com solução de tampão a pH 7-8 e que contém as enzimas e 2-desoxiuridina, uma solução de 2-cloroadenina numa mistura de água e solvente aprótico dipolar, a uma velocidade tal que 2-cloroadenina mantém-se na solução até ter sido convertida no produto final, isto é, de tal modo que nenhuma precipitação de 2-cloroadenina ocorre durante a reacção.

A solução supracitada de 2-cloroadenina é de preferência preparada ao suspender 2-cloroadenina num solvente aprótico dipolar e adicionar uma solução concentrada de um hidróxido alcalino até ter sido obtida uma completa dissolução de 2-cloroadenina.

O solvente aprótico dipolar em questão, é de preferência dimetilformamida e o hidróxido alcalino é de preferência KOH, usado numa concentração com intervalo de 20-30% w/v.

É prevista uma adição de uma solução aquosa de um ácido forte ao mesmo tempo que a adição da solução 2-cloroadenina, em tal extensão para manter o pH da mistura da reacção entre 6.5 e 8.5, de preferência entre 7.3 e 7.8.

Como ácido forte, podem ser usados os ácidos minerais tais como HCl or H_3PO_4 , ou ácidos orgânicos podem ser usados como, por exemplo, ácido cítrico.

Os passos supracitados de concentração e alcalinização do meio da reacção no final da reacção podem ser efectuados em qualquer ordem mas de preferência a alcalinização é efectuada em primeiro lugar, seguida pela concentração.

Quando são utilizadas as enzimas imobilizadas ou células imobilizadas, antes de proceder com os passos da alcalinização e concentração, o passo de filtração ou centrifugação é efectuado para remover as enzimas imobilizadas ou células imobilizadas da mistura da reacção.

O precipitado obtido no final de tais passos é filtrado e possivelmente recristalizado com uma mistura hidroalcoólica, por exemplo com 95:10 etanol/água v/v.

Graças ao método de acordo com a presente invenção, é possível efectuar uma reacção estereoespecífica, que conduz à formação de altos rendimentos do produto desejado só na sua configuração β . Além do mais, o método de acordo com a presente invenção resolve os inconvenientes mencionados na técnica anterior e permite o isolamento da cladribina produzida numa forma extremamente simples, eficaz e económica, tornando assim o método facilmente transmissível para a produção industrial. Em particular, o passo de isolamento da cladribina dos outros componentes da mistura de reacção é brilhantemente executado com uma simples variação do pH, sem ter de recorrer a separações cromatográficas dispendiosas, e permite obter o produto com um alto nível de pureza.

Descrição detalhada

Como acima determinado, é preferido para conduzir a reacção de transglicosilação de acordo com a invenção ao usar, em vez de enzimas UPase e PNPase tal como, células imobilizadas produtoras de UPase e/ou PNPase. Tais células são de preferência células *Escherichia coli* geneticamente

modificadas, capazes de expressar quantidades consideráveis de UPase ou PNPase.

Tais células foram obtidas da seguinte forma:

1. Construção e Estirpes Recombinantes que expressam a enzima UPase ou enzima PNPase

As estirpes recombinadas foram elaboradas ao transformar uma estirpe hospedeira de *Escherichia coli* com um plasmídeo com um alto número de cópias que contém o gene de interesse e um indicador para a selecção.

A estirpe hospedeira é a estirpe DH5alpha, encontrada facilmente no mercado (GIBCO-BRL) e extensivamente descrita na literatura. É uma estirpe derivada da *Escherichia coli* K12 e por conseguinte considerada de segurança classe 1, assim adaptada para um uso do tipo industrial.

O gene UdP, codificação para a enzima UPase, e o gene deoD, codificação para a enzima PNPase, já foi bem descrito na literatura e as suas sequências são conhecidas e disponíveis na base de dados EMBL, caracterizado pelos números de acesso X15679 para UdP e M60917 para deoD.

Os genes foram amplificados através de RCP (Reacção em Cadeia da Polimerase) usando primários sintéticos adequadamente preparados.

Os genes foram inseridos, usando as enzimas adequadas de restrição KpnI e Sall para UdP e EcoRI para Sall para deoD, na zona do polylinker do plasmídeo com um alto número das

cópias pUC18, bem caracterizados na literatura e comercialmente disponíveis.

Em ambos os plasmídios (que contêm o gene UdP e que contêm o gene deoD), a resistência ao antibiótico canamicina foi então inserida, obtida através de digestão com a enzima de restrição HindIII do plasmídio pBSL14, que está comercialmente disponível.

Finalmente, para ambos os plasmídios (que contêm o gene UdP e que contêm o gene deoD), a resistência a Ampicilina foi destruída através de eliminação, através de digestão com a enzima AvaII.

Inesperadamente, foram descobertos dois sites reconhecidos pela enzima de restrição Avall, com a formação consequente de 3 fragmentos de plasmídio em vez dos dois esperados, visto que na literatura só um site de restrição para esta enzima foi indicado.

Os plasmídios finais foram obtidos ao recuperar os dois maiores fragmentos e eliminando o fragmento desnecessário que foi formado. As características principais das novas estirpes geneticamente modificadas são indicadas na seguinte tabela.

TABELA

Estirpe	Hospedeiro	Plasmídio	Indicador de selecção	Proteína expressa	Presença AmpR
EXP05/03	DH5alpha	pUC18	Canamicina	UPase	Não

EXP05/ 04	DH5alpha	pUC18	Canamicin a	PNPase	Não
--------------	----------	-------	----------------	--------	-----

A sequência dos plasmídios de acordo com a tabela anterior é indicada nas listas no final da descrição e em particular a sequência do plasmídio pUC18 que contém o gene UdP que corresponde à Sequência Id. No. 1 e a sequência do plasmídio pUC18 que contém o gene deoD que corresponde à Sequência Id. No. 2.

2. Preparação do biocatalisador

O biocatalisador é preparado usando estirpes de *Escherichia coli* geneticamente preparadas que são capazes de sobre-expressar as actividades fosforilase devido a enzimas Uridina fosforilase e Purina Nucleósido Fosforilase, no caso específico, as estirpes EXP05/03 e EXP 05/04. A imobilização das suspensões das células que contêm a actividade enzimática UPase e actividade enzimática PNPase é preparada começando da mistura de suspensões de células preparadas para ter um rácio entre a actividade enzimática devido à enzima UPase e a actividade enzimática devido à enzima PNPase no intervalo de 1:1- 3:1. Neste exemplo, a imobilização é descrita por uma mistura de suspensões de células nas quais o rácio entre a actividade enzimática devido à enzima UPase e a actividade enzimática devido à enzima PNPase é cerca de 3:1.

Cerca de 20 (peso seco) gramas de resina Rohm & Haas Duolite A568 foi adicionada a 200 ml de uma mistura de suspensões de células compostas por células que contêm a actividade enzimática UPase (EXP05/03) na medida de cerca

de 115 unidades/ml e células que contêm a actividade enzimática PNPase (EXP 05/04) na medida de cerca de 33 unidades/ml.

A mistura é mantida à temperatura ambiente com agitação moderada durante 48 horas. A mistura de imobilização é depois filtrada. A resina é lavada com água até serem obtidas águas de lavagem limpas (cerca de 2 litros).

A resina com as actividades enzimáticas imobilizadas é então preservada a 4°C em 0.1 M de solução tampão de fosfato de potássio com pH 7.5.

3. Actividade da Resina com Células Imobilizadas

A actividade catalítica das enzimas UPase e PNPase associada à resina com células imobilizadas, é determinada com uma reacção de transglicosilação efectuada usando condições standardizadas.

200g ou 400g de portador sólido com células imobilizadas com uma actividade enzimática UPase e actividade enzimática PNPase (peso húmido) como descrito no ponto anterior, são adicionados a 10 ml de mistura de reacção.

A reacção é efectuada com a seguinte solução: 40 mM de arabinofuranosil uracil (Ara-U), 40 mM de adenina, 30 mM de fosfato de potássio monobásico - pH 7.2, a uma temperatura mantida a 60°C. Depois de 60 minutos a 60°C, a reacção é parada ao diluir a reacção 1:50 em água. A percentagem de adenina convertida em arabinofuranosil adenina (ARA-A) é determinada ao analisar uma alíquota da mistura de reacção com uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

equipada com uma coluna Nucleosil 100-5 (Macherey - Nagel) de tamanho 250 x 4.6 mm, eluindo com uma solução tampão de fosfato de potássio monobásico 10 mM - 6% de metanol. A actividade catalítica das enzimas UPase e PNPase (Actividade catalítica de transglicosilação) associada é expressa em unidades/ g líquido (micromoles por minuto de Adenina convertida para formar ARA-A nas condições do ensaio/grama peso líquido de extracto de célula) e é calculada com respeito à percentagem de conversão de adenina.

4. Fermentação das células que contém a actividade enzimática UPase ou actividade enzimática PNPase

As estirpes recombinadas EXP05/03 (codificação para a enzima UPase) e EXP05/04 (codificação para a enzima PNP) foram fermentadas em separado lote a lote ao usar um fermentador com um volume útil de 15 litros, que contém 15 de meio de cultura com a seguinte composição (por litro):

13.3 g KH_2PO_4 ;
40 g soitone;
36 g extracto de levedura;
1.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
0.02 g canamicina

O fermentador foi inoculado com cerca de 150 ml de suspensão bacteriana que foi deixada a crescer previamente durante cerca de 24 h a 37°C. A fermentação foi efectuada usando os seguintes parâmetros. 37°C de temperatura, agitação mecânica de cerca de 250 r.p.m., fluxo do ar automaticamente controlado para manter o valor pO_2 a 20% da concentração da saturação, pH controlado a 7 ± 0.2 através

de adição de 10% de solução de amoníaco ou 20% de uma solução de ácido fosfórico.

Uma vez a fermentação terminada (completa em cerca de 24 horas), o extracto de célula foi recolhido para centrifugação, lavado com 100 mM de solução tampão de fosfato de potássio com pH 7.0, recolhida mais uma vez para centrifugação e preservada na forma de extracto de célula húmido a uma temperatura de -20°C.

5. Determinação das Actividades Enzimáticas

a) Determinação da actividade enzimática devido à enzima UPase.

Uma quantidade conhecida (100 ou 200 microlitros) de suspensão das células que expressam a enzima UPase (EXP05/03), diluída em 1:100 ou 1:1000 como peso húmido/volume em solução tampão de fosfato de potássio com pH 7.0-7.2, é adicionada a 800 microlitros de uma solução de 75 mM Uridina em 100 mM, pH 7.0-7.2 fosfato de solução tampão, pré-incubada a 30°C. Após exactamente 5 minutos, a reacção de fosforólise é parada com a adição de 1 ml de HCl. Uma alíquota da mistura de reacção é analisada com uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) equipada com uma coluna Nucleosil 100-5 (Macherey-Nagel) de tamanho 250 x 4.6 mm. A eluição é efectuada com uma solução de potássio monobásico de 10mM -6% de metanol.

A actividade enzimática do extracto de célula é expressa como unidades/grama de peso húmido (micromoles transformadas por minuto por 1 grama de extracto de célula húmido) e é calculado com respeito a uma curva standard

construída com quantidades uracil formadas nas mesmas condições de ensaio, usando as quantidades crescentes do mesmo extracto de célula.

b) Determinação das actividades enzimáticas devido à PNPase

Uma quantidade conhecida (100 ou 200 microlitros) de suspensão das células que expressam a enzima PNPase (EXP05/04), diluída em 1:100 ou 1:1000 como peso húmido/volume em solução tampão de fosfato de potássio com pH 7.0-7.2, é adicionada a 800 microlitros de uma solução de 60 mM Inosine em 100 mM, pH 7.0-7.2 fosfato de solução tampão, pré-incubada a 30°C. Após exactamente 10 minutos, a reacção de fosforólise é parada com a adição de 1 ml de HCl. Uma alíquota da mistura de reacção é analisada com uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) equipada com uma coluna Nucleosil 100-5 (Macherey-Nagel) de tamanho 250 x 4.6 mm. A eluição é efectuada com uma solução de fosfato de potássio monobásico de 10mM -6% de metanol. A actividade enzimática do extracto de célula é expressa como unidade/grama do peso húmido (micromoles transformadas por minuto por 1 grama do extracto de célula húmido) e é calculada com respeito à curva standard construída com as quantidades de hipoxantina formadas nas mesmas quantidades de ensaio, usando quantidades crescentes do mesmo extracto de célula.

6. Solubilidade de 2-Cloroadenina

0.42 g (igual a 2.5 mMoles) de 2-cloroadenina foram suspensas em 50ml de DMF e aquecidas enquanto são agitadas. Alíquotas de DMF foram adicionadas até ter sido obtida uma

completa solubilização quente. Foram necessários 100 ml de solvente para obter a solubilização de 2-cloroadenina.

O teste de solubilização foi também efectuado de 2-cloroadenina em 25% KOH a fim de aumentar a solubilização. 4.05 gramas de 2-cloroadenina foram ressuspensas em KOH sendo agitadas. Aliquotas de (25% w:v) KOH foram adicionadas até ter sido obtida uma completa solubilização. Até mesmo depois da adição de 100 mL de 25% KOH, a 2-cloroadenina manteve-se praticamente não dissolvida. Até mesmo num KOH muito concentrado, a molécula foi praticamente insolúvel.

7. Reacção em 20% DMF

Uma reacção de transglicosilação foi efectuada usando 2-cloroadenina solubilizada em DMF. 0.42 gramas (igual a 2.5 mMoles) de 2-cloroAdenina foram suspensas e solubilizadas a quente enquanto eram agitadas em 100 ml de DMF, até ferver, obtendo uma solução de 25 mMolar.

A 25 ml desta solução, mantida a 60°C, foram adicionados 80 ml de uma solução de 18.75 mM 2'-d-Uridina e 37.5 mM KH_2PO_4 a pH 7.3 para KOH, aquecida a 70°C. Durante esta adição desta solução, ocorreu a formação de precipitado que se manteve não dissolvida até mesmo ao aquecer uma vez mais para ferver.

O teste tem sido repetido ao adicionar a solução 2'-d-Uridina / KH_2PO_4 gota a gota. Após uma pequena adição, a formação do precipitado é notada, o que dissolve lentamente ao parar a adição. O restante da solução foi adicionado em

alíquotas muito pequenas, permitindo que a situação se equilibre.

Deste modo, uma solução limpa foi obtida à qual 5 gramas de resina foram adicionadas com células imobilizadas com uma actividade de 5 unidades/ grama húmido de resina (medida como no ponto 3).

A mistura final teve uma concentração de 15 mM d-uridina; 5 mM 2-cloroadenina; 30 mM KH_2PO_4 ; resina com células imobilizadas: 250 unidades/litro de reacção.

A reacção foi seguida por CLAE e depois de 3 horas, aconteceu a conversão de cerca de 80% de 2-cloroadenina em cladribina.

8. Reacção em DMF/KOH

Para aumentar a solubilidade de 2-cloroadenina em DMF, bases concentradas ou ácidos foram adicionados e em ambos os casos, foi obtida uma maior solubilização.

Contudo, o ambiente ácido pode degradar desoxinucleósidos, por conseguinte, testes foram só efectuados com a adição de KOH concentrado.

4.05 gramas (igual a 24 mMoles) de 2-cloroadenina foram pesadas e suspensas em 50 de DMF. Foram adicionados 30 ml de 25% KOH (w:v). Lá mantém-se uma leve opalescência que desaparece com a adição de 10 ml de H_2O , obtendo assim uma solução de 266 mMolar. A esta solução, mantida a 60°C , foram adicionados 600 ml a uma solução com pH 7.3 que contém 10.95 gramas (igual a 48 mMoles) de 2'-d-uridina e 4

gramas de KH_2PO_4 (igual a 30 mMoles). Foi obtida uma precipitação incipiente de 2-cloroadenina.

A preparação das duas soluções foi repetida. 30 gramas húmidos de resina com células imobilizadas foram adicionadas (5 U/ gramas húmidos calculados como no ponto 3) à solução 2'-d-Uridina, mantida a 60°C.

A solução de 2-cloroadenina em DMF/KOH foi adicionada muito lentamente a esta suspensão, para prevenir a precipitação de 2-cloroadenina. Desta forma, se a adição ocorreu a uma velocidade adequada, a maior parte de 2-cloroadenina adicionada foi transformada em Cladribina antes de atingir a concentração, para provocar precipitação.

Com a adição de 2-cloroadenina em DMF/KOH, o pH da reacção começou a aumentar, e visto que as actividades enzimáticas funcionaram numa forma óptima em valores fisiológicos pH, foi necessário para adicionar o ácido hidrolórico para manter o pH a valores desejados.

No final das adições, existiam as seguintes concentrações:

35 mMolar 2-cloroadenina; 70 mMolar 2-desoxiuridina; 37.5 mM KH_2PO_4 ; resina com células imobilizadas: 220 U/litro de reacção.

Nestas condições, foi obtida uma conversão de 80% de 2-cloroadenina em cladribina.

9. Reacção com adição controlada

Depois de terem sido efectuados diferentes testes de optimização preliminares, uma reacção foi efectuada para preparar a Cladribina, adicionando o substrato 2-cloroadenina e o corrector de pH numa forma controlada.

6.75 gramas (igual a 40 mMoles) foram pesadas de 2-cloroadenina e foram suspensas enquanto agitadas em 50 ml de DMF. A solubilização ocorreu com a adição de 70 ml de 25% KOH (w:v), obtendo uma solução perfeitamente limpa com uma concentração de 333 mMolar. 18.25 gramas (igual a 80 mMoles) de 2'-desoxiUridina e 4 gramas (igual a 30 mMoles) de fosfato de potássio monobásico anidro foram adicionados e solubilizados em 600 ml de água deionizada, obtendo uma concentração de 133 mM para 2-desoxiuridina e 50 mM para KH_2PO_4 . O pH foi corrigido para o valor de 7.5 com 25% (w:v) KOH como requerido.

A solução 2'-desoxiuridina em solução tampão de fosfato foi deitada num reactor de 1 litro mantido a 60°C com agitação mecânica.

30 gramas húmidos de resina acabada de ser filtrada com células imobilizadas, preparadas como no ponto 2, foram adicionadas ao reactor.

A actividade específica da resina com células imobilizadas (medidas como indicado no ponto 3), era de 5U/grama húmido.

A solução de 2-cloroadenina em KOH/DMF foi lentamente adicionada à suspensão de 2'-desoxiUridina em solução tampão de fosfato e resina com células imobilizadas. A adição foi efectuada através de uma bomba peristáltica com tubo de silicone com 1.5 mm de diâmetro interior, a uma

taxa de fluxo de cerca de 1ml/min (igual a 0.33 mMoles (minuto)).

Para manter o pH a volumes óptimos, uma solução de ácido hidrolórico 2N foi adicionada em simultâneo à solução de 2-cloroadenina em DMF/KOH, para manter o valor pH no intervalo de 6.5-8.5, de preferência no intervalo de 7.3-7.8.

A adição de 2N HCl, foi efectuada com uma bomba peristáltica equipada com um tubo de silicone com 1.5 mm de diâmetro interior e uma taxa de fluxo de cerca de 1ml/min.

Com respeito ao volume final, existiram as seguintes concentrações:

50 mMolar 2-cloroadenina; 100 mMolar 2-desoxiuridina; 37.5 mM KH_2PO_4 ; resina com células imobilizadas: 187.5 U/litro de reacção.

No final da adição, a reacção foi filtrada em papel. A resina foi recuperada e armazenada em 100 mM de solução tampão de fosfato a pH 7.4, a uma temperatura de 4°C, enquanto o filtrado foi processado para o isolamento da cladribina. Nestas condições, cerca de 80% da 2-chloroadenin foi convertida em cladribina.

10. Reacção com adição controlada em DMSO

A mesma reacção de acordo com o ponto 8 foi efectuada usando a dimetilsulfóxido como solvente para a solubilização de 2-cloroadenina em vez de dimetilformamida.

5.4 gramas (igual a 32 mMoles) de 2-cloroadenina foram pesadas e suspensas enquanto agitadas em 50 ml de DMSO. A solubilização ocorreu com a adição de 70 ml de 25% KOH (w:v), obtendo uma solução perfeitamente limpa com uma concentração de 266 mMolar de 2-cloroadenina. 14.6 gramas (igual a 64 mMoles) de 2'-desoxiuridina e 4 gramas (igual a 30 mMoles) de fosfato de potássio monobásico anidro, foram dissolvidos em cerca de 600 ml de água deionizada, obtendo uma concentração de 106 mM para 2-desoxiUridina e 50 mM para KH_2PO_4 . O pH foi corrigido para um valor de 7.5 com 25% (w:v) KOH como requerido.

A solução 2'-desoxiUridina em solução de tampão de fosfato, foi deitada num reactor de 1 litro mantido a 60°C com agitação mecânica.

30 gramas húmidos de resina acabada de ser filtrada com células imobilizadas, preparadas como no ponto 2, foram adicionadas ao reactor.

A actividade específica da resina com células imobilizadas (medidas como indicada no ponto 3), era de 5/grama húmido.

A solução de 2-cloroadenina em KOH/DMF foi então lentamente adicionada à suspensão de 2'-desoxiuridina em solução de tampão de fosfato e resina com células imobilizadas. A adição foi efectuada através de uma bomba peristáltica com um tubo de silicone com 1.5 mm de diâmetro interior, a uma taxa de fluxo de cerca de 1ml/min (igual a 0.26 mMoles(minuto)).

Para manter o pH a volumes óptimos, uma solução de ácido hidrolórico 2N foi adicionada em simultâneo à solução de

2-cloroadenina em DMF/KOH, para manter o valor pH no intervalo de 6.5-8.5, de preferência no intervalo de 7.3-7.8.

A adição de 2N HCl, foi efectuada com uma bomba peristáltica equipada com um tubo de silicone com 1.5 mm de diâmetro interior e uma taxa de fluxo de cerca de 1ml/min.

Com respeito ao volume final, teria existido as seguintes concentrações:

40 mMolar 2-cloroadenina; 80 mMolar 2-desoxiuridina; 37.5 mM KH_2PO_4 ; resina: 187.5 U/litro de reacção.

No final da adição, a mistura de reacção foi filtrada em papel. A resina foi recuperada e armazenada em 100 mM solução de tampão fosfato a pH 7.4, a uma temperatura de 4°C, enquanto o filtrado foi processado para o isolamento da cladribina. Nestas condições, cerca de 80% da 2-cloroadenina foi convertida em cladribina.

11. Adição de ácidos diferentes

O pH pode ser controlado e mantido constante à volta dos valores óptimos por também usar ácido fosfórico, em adição ao ácido clorídrico, permitindo o acabamento da reacção sem encontrar problemas de precipitação de 2-cloroadenina. Resultados equivalentes foram obtidos ao usar uma solução de 5% de ácido fosfórico em vez de ácido clorídrico 2N.

12. Reciclagem da resina

A resina com células imobilizadas usada para uma reacção, depois de ter sido filtrada e separada da mistura de reacção, foi armazenada a 4°C em solução de tampão de fosfato ou usada imediatamente para uma reacção subsequente.

A resina com células imobilizadas (preparadas como no ponto 2) como usada, com rendimentos finais equivalentes, para pelo menos 4 reacções subsequente.

A presença de DMF na solução de 2-cloroadenina, a temperatura relativamente alta e a adição de ácido concentrado e solução base não provocou drásticas diminuições da actividade biocatalisador.

13. Testes de purificação

A mistura de reacção filtrada foi processada para ser capaz de isolar e purificar a cladribina dos outros componentes da reacção.

A mistura de reacção filtrada estava concentrada numa Rotavapor até o volume inicial estar reduzido até cerca de 3 vezes, e foi transferida primeiro à temperatura ambiente e depois a 4°C. O precipitado foi formado, o qual foi separado por filtração e o qual foi composto essencialmente por 2-cloroadenina não reagida e por uracil formado durante a reacção.

Os testes de precipitação foram efectuados nos licores-mãe resultantes ao variar o valor pH.

Os testes foram conduzidos a pH 4.0 - 7.0 - 10.0 - 12.0.

Num pH ácido, há a formação do precipitado, o qual foi formado unicamente por sais inorgânicos.

Em valores pH 7.0 e 10.0, o precipitado foi obtido composto essencialmente por cladribina e uracil, o mais recente em quantidades consideráveis.

Só com o teste pH 12.0 foi obtido um precipitado, o qual foi descoberto ser cladribina com alta pureza. Para aumentar o rendimento, a alteração de pH foi repetida numa solução a qual era 5 vezes mais concentrada, sendo sempre obtido um produto de alta pureza.

Ao concentrar 10 vezes, foi obtida uma co-precipitação, essencialmente de cladribina e uracil residual.

A cladribina deste modo obtida foi recristalizada sob condições de refluxo a 90° C em 20 volumes de uma mistura de EtOH:H₂O, obtendo um produto anidro com alta pureza (maior que 99.0%). O rendimento quantitativo da cladribina após a purificação e recristalização está no intervalo de 4-5 gramas para cada litro da mistura de reacção, ambas para as reacções com DMF e para aquelas com DMSO.

A fim de melhorar o processo a partir de um ponto de vista industrial, é efectuado um teste no qual a mistura de bioconversão foi levada ao pH 12.0 uma vez a reacção tiver terminado e o biocatalisador ter sido separado. Subsequentemente, a concentração da solução foi efectuada ao reduzir o volume 5-6 vezes, obtendo precipitação. O precipitado foi transferido frio e separado por filtração, resultando em cladribina com um alto nível de pureza.

Desta forma, o primeiro passo de concentração e subsequente filtração foram eliminados, simplificando o processo e foi obtida uma comparável qualidade do produto.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> EXPLORA LABORATORIES SA
<120> METHOD FOR THE PRODUCTION OF CLADRIBINE
<130> EXP002BEP
<160> 2
<170> PATENTIN VERSION 3.3
<210> 1
<211> 4454
<212> DNA
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PLASMID

<220>
<221> GENE
<222> (49)..(843)
<223> KANAMICINE RESISTANCE
<220>
<221> GENE
<222> (1285)..(2046)
<223> UDP

<400> 1

TGTAAAACGA CGGCCAGTGC CAAGCTTGGG CGAACCCAG AGTCCCGCTC AGAAGAAGTC 60

GTCAAAGAAGG CGATAGAAGG CGATGCGCTG CGAATCGGGA GCGGCGATAC CGTAAAGCAC 120

GAGGAAGCGG TCAGCCATT CGCCGCCAAG CTCTTCAGCA ATATCACGGG TAGCCAACGC 180

TATGTCCTGA TAACGGTCCG CCACACCCAG CCGGCCACAG TCGATGAATC CAGAAAAGCG 240

GCCATTTTCC ACCATGATAT TCGGCAAGCA GGCATCGCCA TGGGTCACGA CGAGATCCTC 300

GCCGTCGGGC ATCCGCGCCT TGAGCCTGGC GAACAGTTCG GCTGGCGCGA GCCCCTGATG 360

CTCTTCGTCC AGATCATCCT GATCGACAAG ACCGGCTTCC ATCCGAGTAC GTGCTCGCTC 420

GATGCGATGT TTCGCTTGGT GGTCCAATGG GCAGGTAGCC GGATCAAGCG TATGCAGCCG 480

CCGCATTGCA TCAGCCATGA TGGATACTTT CTCGGCAGGA GCAAGGTGAG ATGACAGGAG 540

ATCCTGCCCC GGCACCTCGC CCAATAGCAG CCAATCCCTT CCCGCTTCAG TGACAACGTC 600

GAGCACAGCT GCOCAAGGAA CGCCCGTCGT GGCCAGCCAC GATAGCCGCG CTGCCTCGTC 660

TTGGAGTTCA TTCAGGGCAC CGGACAGGTC GGTCTTGACA AAAAGAACCG GGCGCCCCTG 720

CGCTGACAGC CGGAACACGG CGGCATCAGA GCAGCCGATT GTCTGTTGTG CCCAGTCATA 780

GCCGAATAGC CTCTCCACCC AAGCGGCCGG AGAACCTGCG TGCAATCCAT CTGTTC AAT 840

CATGCGAAAC GATCCTCATC CTGTCTCTTG ATCAGATCTT GATCCCCTGC GCCATCAGAT 900

CCTTGGCGGC AAGAAAGCCA TCCAGTTTAC TTTGCAGGGC TTCCCAACCT TACCAGAGGG 960

CGCCCCAGCT GGCAATTCCG GTTCGCTTGC TGCCATAAA ACCGCCAGT CTAGCTATCG 1020

CCATGTAAGC CCACTGCAAG CTACCTGCTT TCTCTTTGCG CTTGCGTTTT CCCTTGTTCA 1080

GATAGCCCAG TAGCTGACAT TCATCCGGGG TCAGCACCGT TTCTGCGGAC TGGCTTTCTA 1140

CGTGTTCCGC TTCTTTAGC AGCCCTTGCQ CCCTGAGTGC TTGCGGCAGC GTGAAGCTAG 1200

CGGAATCGA GCTCGGTACC CGGGATCCT CTAGAGTGA CCTGCAGGCA TGCAAGCTTG 1260

CATGCCTGCA GGTGACAAG AGAATTACAG CAGACGACGC GCCGCTTCCA CCACGATTTT 1320

CACCGCATGG CTTTCGGTTT GTTTCATCGT CTCAGCATTG GGGATCTCTT GCTGGGTGCG 1380

GTAAACGATA ACACCCGCTA CCATACCGGC ACGCAGGCC TGACTTGAC ACATGCTCAG 1440

CAGGGTTGCA GATTCCATTT CATAGTTCAT TACGCCATC GCCTGCCACT CTTCCATAGA 1500

ACCTTTAAAG TGACGAACTA CGCGACCAGA GTAAGTATCG TAACGTTCTT GACCTGGGTA 1560

GAAGGTATCA GAAGAAGCTG TCACGCCAAC GTGAGTTGTC GCGCCAATGG ATTTCCGAGC 1620

TTCAACCAGC GCAGTCGTAC ATTGGAATC AGCGACAGCC GGAATTTCA GCGGTCCGAA 1680

GTGCAGGCTC GCGCCATCCA GACGGACAGA CGCCGTGGTA ACCAGGACAT CACCCACATT 1740

AATATGCGGC TGAATAGCGC CCGTTGTACC GATACGCAGG AAGGTGCGAA TGCCAGCTG 1800

TGCCAGCTCT TCAACAGCAA TAGAGGTAGA CGGCCCCCGG ATACCGGTAG AGCAGACGAT 1860

AACAGGTTTA CCATCCAGCT CTGCACGCCA GGTAGTGAAT TCGCGGTGAG ATGCCAGCTT 1920

AACCGGCTTA TCCATCAGCG CGGCGATCTT TTCCACACGA TCCGGGTGCG CAGGGACGAT 1980

GGCAAGCGTA GCCCCTTGTA AATCGTTTTT AGTGAGGCCG AGATGAAAAA CATCAGACTT 2040

GGACATGGAT GGTACCGAGC TCGAATTCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA 2100

ATTGTTATCC GCTCACAATT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAGCCT 2160

GGGGTGCCTA ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTCC 2220

AGTCGGGAAA CCTGTCGTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG 2280

GTTTGCATAT TGGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCGTTT 2340

GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG 2400

GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA 2460

AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCG TGACGAGCAT CACAAAAATC 2520

GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC 2580

CTGGAAGCTC CCTCGTGC GC TCTCCTGTTT CGACCCGCGC GCTTACCGGA TACCTGTCCG 2640

CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT 2700

CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCCGACC 2760

GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC 2820

CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG 2880

AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG AACAGTATTT GGTATCTGCG 2940

CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA 3000

CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG 3060

GATCTCAAGA AGATCCTTG ATCTTTTCTA CGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT 3120

CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA 3180

ATTAAAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT 3240

ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTTCT TCATCCATAG 3300

TTGCCTGACT CCCCGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA 3360

GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC 3420

AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG 3480

CCGCAGTGT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTTACT GTCATGCCAT 3540

CCGTAAGATG CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA 3600

TGCGOCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA 3660

GAACTTTAAA AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAAC TC AAGGATCT 3720

TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT 3780

CTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAT GCCGCAAAAA 3840

AGGAATAAG GCGGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT CTCCTTTTT CAATATTATT 3900

GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAAATG ATTTAGAAAA 3960

ATAACAAAT AGGGTTCCG CGCACATTTC CCCGAAAAGT GCCACCTGAC GTCTAAGAAA 4020

CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTCTCTCG 4080

CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG 4140

CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG 4200

GCGGGTGTG GGGCTGGCTT AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG AGAGTGCACC 4260

ATATGCGGTG TGAATACCG CACAGATGCG TAAGGAGAAA ATACCGCATC AGGCGCCATT 4320

CGCCATTCAG GCTGCGCAAC TGTGGGAAG GGCGATCGGT GCGGGCCTCT TCGCTATTAC 4380

GCCAGCTGGC GAAAGGGGGA TGTGCTGCAA GGCGATTAAG TTGGGTAACG CCAGGGTTTT 4440

.CCCAGTCACG ACGT

4454

<210> 2

<211> 4393

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> PLASMID

<220>

<221> GENE

<222> (438)..(1232)

<223> KANAMICINE RESISTANCE

<220>

<221> GENE

<222> (1277)..(1977)

<223> DEOD

<400> 2

TGTAAAGCGA CCGCCAGTCC CAAGCTTCCA TGCCTGCAGG TCCACTCTAG AGGATCCCCG 60

GCTACCGAGC TCGAATTCGG CTAGCTTCAC GCTCCGCGAA CCACTCAGGG CCCAAGGGCT 120

GCTAAAGCGA CCGCAGCAGG TACAAGCCA GTCGCGAGAA ACGGTCTGTA CCCCAGATGA 180

ATGTCAGCTA CTGGGCTATC TGGACAAGGG AAAACGCAAG CGCAAAGAGA AAGCAAGTAG 240

CTTGCAGTGG GCTTACATGG CGATAGCTAG ACTGGGCGGT TTTATGGACA GCAAGCGAAC 300

CGGAATTGCC AGCTGGGCGG CCCTCTGGTA AGGTTGGGAA GCCCTGCAA GTAAACTGGA 360

TGGCTTCTT GCCGCCAAGG ATCTGATGGC GCAGGGATC AAGATCTGAT CAAGAGACAG 420

GATGAGGATC GTTTCGCATG ATTGAACAAG ATGOATTGCA CGCAGTTCT CCGGCCGCTT 480

GGTGGAGAG GCTATTCGGC TATGACTGGG CACAACAGAC AATCGGCTGC TCTGATGCCG 540

CCGTGTTCCG GCTGTCAGCG CAGGGCGCC CGGTTCTTTT TGTCAAGACC GACCTGTCCG 600

GTGCCCTGAA TGAACTCAA GACGAGGCAG CGCGGCTATC GTGGCTGGCC ACGACGGGCG 660

TTCTTGGCG AGCTGTGCTC GACGTTGTCA CTGAAGCGGG AAGGGACTGG CTGCTATTGG 720

GCGAAGTCC GGGGCAGGAT CTCCTGTCAT CTCACCTGC TCCTGCCGAG AAAGTATCCA 780

TCATGGCTGA TGCAATGCGG CGGCTGCATA CGCTTGATCC GGCTACCTGC CCATTGACC 840

ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GACTCGGAT GGAAGCCGGT CTTGTCCATC 900

AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGGC TCGCGCCAGC CGAACTGTTG GCCAGGCTCA 960

AGGCGCGGAT GCCCGACGGC GAGGATCTCG TCGTGACCCA TGGCGATGCC TGCTTGCCGA 1020

ATATCATGGT GAAAAATGGC CGCTTTTCTG GATTCATCGA CTGTGGCCGG CTGGGTGTGG 1080

CGGACCGCTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCCGTGATAT TGCTGAAGAG CTTGGCGGCG 1140

AATGGGCTGA CCGCTTCTC GTGCTTACG GTATCGCCGC TCCCGATTCCG CAGCGCATCG 1200

CCTTCTATCG CCTTCTTGAC GAGTTCTTCT GAGCGGGACT CTGGGGTTCCG CCCAAGCTTG 1260

CATGCCTGCA GGTGACTTA CTCTTTATCG CCCAGCAGAA CGGATTCCAG TGCGATTTTG 1320

ATCATGTCGT TGAAGGTAGT CTGACGCTCA GCGGCAGTGG TCTGCTCGTG AGTGCGGATG 1380

TGGTCAGATA CGGTGCAGAT GGTCAGGGCT TTCGCGCCAA ATTCTGCAGC GACGCCGTAG 1440

ATACCAGCCG CTCCATTTC CACGCCGAGA ATGCCGTATT TTTCCATCAC GTCGAACATT 1500

TCGCCGTCCG GAGAGTAGAA CAGGTCAGCG GAGAACAGGT TACCCACCGC AGCATCAATA 1560

CCCAGTGCTT TAGCTGCATC TACTGCGTTA CGCACCATGT CGAAGTCAGC GATAGCGGCA 1620

AAGTCATGGT CTTTAAAACG GATGCGGTTA ACTTTGGAAT CGGTGCAGGC ACCCATACCG 1680

ATAACGACGT CGCGCAGTTT TACGTGCGGC AGAACTGCGC CACAGGAACC CACGCGGATA 1740

ATTTTCTTCA CGCCGAAATC GGTGATCAGT TCTTTGGTGT AGATGGAGCA GGACGGGATA 1800

CCCATACCGT GACCCATTAC GGAAATTTTG CGGCCTTTGT AAGTACCGGT GAAGCCCAGC 1860

ATACCGCGAA CGTTGTTTAC TTCACGGGCA TCTTCAAGGA AAGTTTCAGC AATATACTTC 1920

GCACGCAGCG OGTGCCTGG CATCAAACCT ACGTCAGCGA AATCGCCCAT TTCTGCATTA 1980

ATGTGTGGGG TAGCCATGGA AGAATTCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA 2040

TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT GTAAAGCCTG 2100

GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG CGCTCACTGC CCGCTTTCCA 2160

GTCGGGAAAC CTGTCGTGCC AGCTGCATTA ATGAATCGGC CAACGCQCGG GGAGAGGCGG 2220

TTGCGTATT GGGCGCTCTT CCGCTTCTC GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CGGTCGTTCG 2280

GCTGCGGCGA GCGGTATCAG CTCACTCAA GCGCGTAATA CGGTTATCCA CAGAATCAGG 2340

GGATAACGCA GGAAAGAAC TGTGAGCAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA 2400

GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCT GACGAGCATC AAAAAATCG 2460

ACGETCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCCC 2520

TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT CTCCTGTTCC GACCCTGCCG ETTACCGGAT ACCTGTCCGC 2580

CTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCATAGCTCA CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC 2640

GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG TGTGCAGGAA CCCCCGTTT AGCCCGACCG 2700

CTGCGCCTTA TCCGGTAACT ATCGTCTTGA GTCCAACCCG GTAAGACACG ACTTATCGCC 2760

ACTGGCAGCA OCCACTGOTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA 2820

GTCTTGAAG TGGTGCCTA ACTACGGCTA CACTAGAAGA ACAGTATTG GTATCTGCGC 2880

TCTGCTGAAG CCAGTTACCT TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC TCTTGATCCG GCAAACAAAC 2940

CACCGCTGGT AGCGGTGGTT TTTTGTGTTG CAAGCAGCAG ATTACGCGCA GAAAAAAGG 3000

ATCTCAAGAA GATCCTTTGA TCTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGA ACGAAAACTC 3060

ACGTTAAGGG ATTTTGGTCA TGAGATTATC AAAAAGGATC TTCACCTAGA TCCTTTTAAA 3120

TTAAAAATGA AGTTTTAAAT CAATCTAAAG TATATATGAG TAAACTTGGT CTGACAGTTA 3180

CCAATGCTTA ATCAGTGAGG CACCTATCTC AGCGATCTGT CTATTCGTT CATCCATAGT 3240

TGCCTGACTC CCCGTCGTGT AGATAACTAC GATACGGGAG GGCTTACCAT CTGGCCCCAG 3300

TGCTGCAATG ATACCGCGAG ACCCAGCTC ACCGGCTCCA GATTTATCAG CAATAAACCA 3360

GCCAGCCGGA AGGGCCGAGC GCAGAAGTGG TCCTCCGATC GTTGTACAGAA GTAAGTTGGC 3420

CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC 3480

CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT 3540

GCGGCGACCG AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AATACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG 3600

AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACTCT CAAGGATCTT 3660

ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTCAGCATC 3720

TTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA 3780

GGGAATAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTC AATATTATTG 3840

AAGCATTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA 3900

TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCTAAGAAAC 3960

CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTCGTCTCGC 4020

GCCTTTCGGT GATGACGGTG AAAACCTCTG ACACATGCAG CTCCCGGAGA CGGTACACAG 4080

TTGTCTGTAA GCGGATGCCG GGAGCAGACA AGCCCGTCAG GGCGCGTCAG CGGGTGTGG 4140

CGGGTGTCCG GGCTGGCTTA ACTATGCGGC ATCAGAGCAG ATTGTACTGA GAGTGCACCA 4200

TATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA TACCGCATCA GGCGCCATTC 4260

GCCATTCAGG CTGCGCAACT GTTGGGAAGG GCGATCGGTG CGGOCCTCTT CGCTATTACG 4320

CCAGCTGGCG AAAGGGGGAT GTGCTOCAAG GCGATTAAGT TGGGTAACGC CAGGGTTTTT 4380

CCAGTCACGA CGT

4393

Lisboa, 11 de Dezembro de 2009

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora muito cuidado tenha sido tomado na compilação das referências, erros e omissões não podem ser excluídos e o EPO nega qualquer responsabilidade neste sentido.

Documentos de patente citados na descrição

US 5208327 A, Chen, R.H.K.	US 20020052491 A
US 6252061 B	US 20040039190 A
WO 2004028462 A	US 20060094869 A
EP 173059 A	EP 06005241 A

Literatura não-patente citada na descrição

Michailopulo, I A et al. Nucleosides & Nucleotides, 1993,
vol. 12 (3, 4), 417-422

Reivindicações

1. Método para produzir cladribina (2-cloro-2'-desoxiadenosina) que compreende os passos de:

a) reacção de 2-desoxiuridina com 2-cloroadenina, na presença de uridina fosforilase(UPase) e purina nucleósido fosforilase(PNPase) num meio de reacção aquosa que contém opcionalmente até 40% v/v de um solvente aprótico dipolar, para obter cladribina dissolvida no dito meio de reacção;

b) isolamento da cladribina por precipitação através de concentração e alcalinização do meio de reacção até um pH de 11.5-12.5.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as ditas enzimas UPase e PNPase são produzidas in situ por células capazes de produzi-las.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que as ditas células produtoras de UPase e PNPase são imobilizadas num portador adequado.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o dito portador é composto por uma resina fraca de troca de anião, na qual as ditas células são absorvidas.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, em que a dita resina tem grupos amino funcionais e é preferivelmente escolhida do grupo que compreende resinas Dowex MWA14 (Dow Chemical), Diaion WA30 (Mitsubishi), Duolite A7®, Amberlite FPA54®, Amberlyst 21 e Duolite A568®(Rohm & Haas).

6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que a dita resina é Duolite A568[®] (Rohm & Haas).

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-6, em que as ditas células produtoras de Upase- e PNPase- são células das espécies *Escherichia coli*.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que as ditas células são células *Escherichia coli* da estirpe DH5alpha, transformada através de vectores plasmídios com sequências indicadas na Sequência Id. No. 1 e 2.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o dito solvente aprótico dipolar consiste de dimetilformamida e/ou dimetilsulfóxido.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o dito passo de alcalinização leva a um pH final de cerca de 12.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que 2-desoxiuridina e 2-cloroadenina são feitas reagir num rácio molar que varia de 1:1 a 3:1.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a reacção entre 2-desoxiuridina e 2-cloroadenina é efectuada num meio de solução tampão a um pH no intervalo de 6.5-8.5, de preferência no intervalo de 7.3-7.8.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a reacção entre 2-desoxiuridina e 2-

cloroadenina é conduzida a uma temperatura no intervalo de 50-70°C, de preferência cerca de 60°C.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a reacção entre 2-desoxiuridina e 2-cloroadenina, é efectuada por adicionar gradualmente uma solução de 2-cloroadenina numa mistura de água e solvente aprótico dipolar ao meio de reacção aquosa solução tampão a pH 6.5-8.5 e que contém as enzimas e 2-desoxiuridina.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, em que a dita solução 2-cloroadenina é preparada ao suspender 2-cloroadenina num solvente aprótico dipolar e adicionar uma solução concentrada de um hidróxido alcalino até a dissolução de 2-cloroadenina estar completa.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, em que o dito solvente aprótico dipolar é dimetilformamida ou dimetilsulfóxido e o hidróxido alcalino é KOH, usado a uma concentração no intervalo de 20-30% w/v.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 14-16, em que, ao mesmo tempo como a adição da solução de 2-cloroadenina, é efectuada adição de uma solução aquosa de um ácido forte, em tal intervalo como para manter o pH da mistura de reacção entre 6.5-8.5, de preferência entre 7.3-7.8.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, em que o dito ácido forte é escolhido de entre o ácido clorídrico e ácido fosfórico.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que ao dito passo de concentração segue o dito passo de alcalinização.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, que compreende outros passos de recuperação da cladribina precipitada através de filtração e recristalização subsequente do mesmo.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, em que a dita recristalização é efectuada por uma mistura hidroalcoólica, de preferência 95:10 etanol: água.

Lisboa, 11 de Dezembro de 2009