(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 325 000**

(51) Int. Cl.:
C07D 495/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06763428 .7**
(96) Fecha de presentación : **31.05.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1899354**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

(54) Título: **Síntesis de desoxibiotinil hexametilendiamina-DOTA.**

(30) Prioridad: **30.06.2005 IT MU05A0345**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.08.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.08.2009

(73) Titular/es: **SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.**
Viale Shakespeare, 47
00144 Rome, IT

(72) Inventor/es: **Marzi, Mauro y**
Di Marzo, Maria

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Síntesis de desoxibiotinil hexametilendiamina-DOTA.

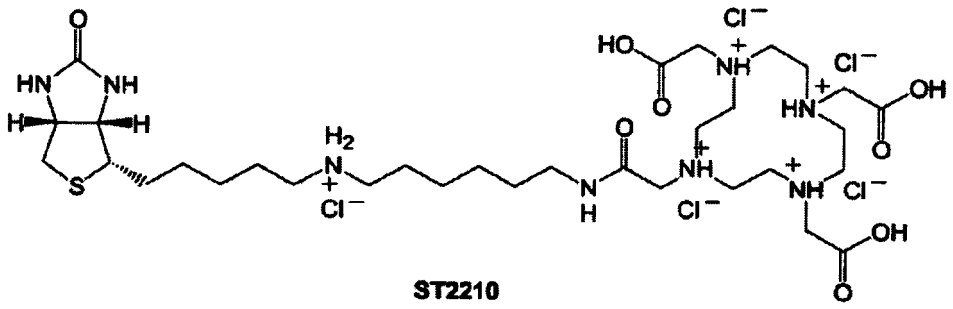
Campo de la invención

La invención aquí presentada se refiere a un procedimiento mejorado para la síntesis de desoxibiotinil hexametilendiamina-DOTA.

Antecedentes de la invención

El compuesto desoxibiotinil hexametilendiamina-DOTA ha sido descrito en la solicitud de patente internacional WO 02066075, bajo el nombre del solicitante. El DOTA es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecanotetraacético (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecanotetraacético).

La fórmula estructural del desoxibiotinil hexametilendiamina-DOTA se presenta aquí para su completitud.

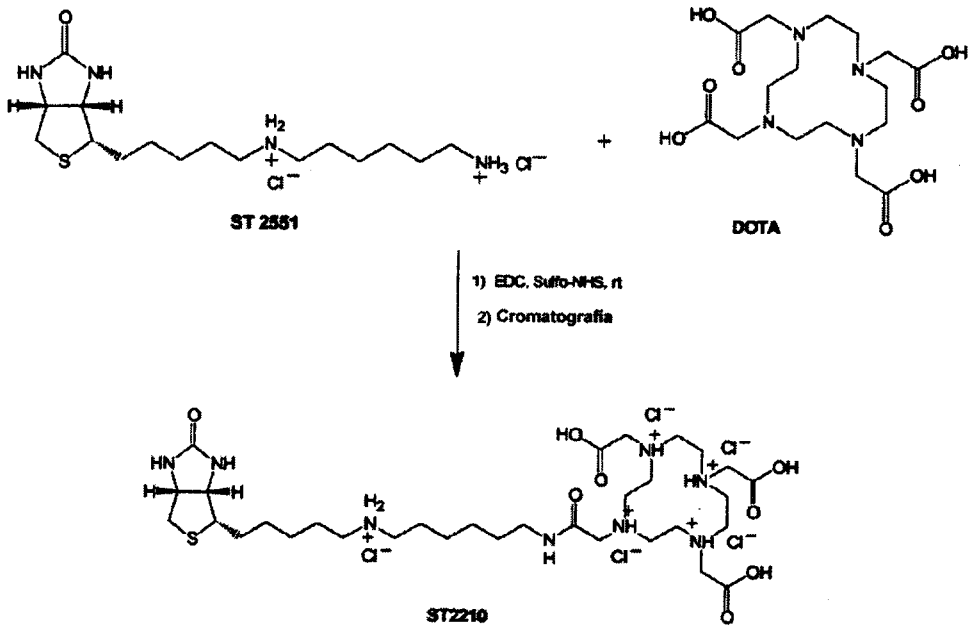


ST2210

El procedimiento para sintetizar este producto también se describe en la misma solicitud de patente WO 02066075 y también se presenta en el ejemplo de la página 15 de la solicitud anteriormente mencionada. El compuesto aquí presentado como ST2210 corresponde al compuesto 4 del Ejemplo del documento WO 02066075. En particular, el producto intermedio clorhidrato de biotinil hexametilendiamina (ST2551 o compuesto 3 del ejemplo del documento WO 02066075), se obtuvo con cromatografía preparativa con un rendimiento del 55% y una titulación indefinida.

El producto final desoxibiotinil hexametilendiamina-DOTA (ST2210 o compuesto 4 del Ejemplo del documento WO 02066075), se obtuvo condensando ST2551 con DOTA como se ilustra en el diagrama 1.

Diagrama 1



La reacción llevada a cabo de esta forma produjo bajos rendimientos sintéticos (la presencia en el DOTA de cuatro funciones equivalentes carboxilo sin proteger, supone la formación de diversos subproductos) y problemas con la purificación. De hecho, para obtener el producto final fue necesario usar HPLC a escala preparativa con un rendimiento del 20%.

Descripción de la invención

En el estudio de escalado, para mejorar el rendimiento del procedimiento y hacer más sencillo el procedimiento de purificación, se examinaron procedimientos de síntesis alternativos:

El procedimiento de síntesis mejorado tiene las siguientes ventajas sobre aquel descrito previamente:

1. En la etapa de acoplamiento o condensación (descrita en el documento WO 02066075 como "etapa d") el uso de tri-*terc*-butil-DOTA evita la formación de más productos de condensación, debido a la reactividad parcial de los carboxilos libres, que se produce incluso cuando se trabaja en condiciones controladas de pH;

2. Aún así en la misma etapa, se cambiaron el agente de condensación y la base; el rendimiento mejorado se obtuvo usando hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP-hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio), como agente de condensación y trietilamina (TEA) como base;

3. Se usa biotinil hexametilendiamina (ST2251) como base libre, habiendo demostrado que el uso del diclorhidrato provocó un incremento en la cantidad de productos no deseados; en particular hubo una formación notable de un subproducto correspondiente al dímero, en el que ST2551 reacciona con dos moléculas de tri-*terc*-butil-DOTA;

4. La etapa final consiste en la hidrólisis de los tres grupos *terc*-butilo en disolución ácida acuosa, por ejemplo, usando HC1 3N a 6N en diferentes proporciones con el producto para tiempos que abarcan entre 1 hora y 12 horas, con rendimientos que abarcan entre el 96% y el 98%;

5. Eliminación del procedimiento de síntesis de dos etapas bastante laboriosas de cromatografía preparativa;

6. Obtención de un producto con una titulación de entre el 94% y el 96%.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es un procedimiento para sintetizar desoxibiotinil hexametilendiamina-DOTA que comprende la reacción de biotinil hexametilendiamina con tri-*terc*-butil-DOTA en presencia de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio, como agente de condensación, y trietilamina, como base.

El procedimiento de la presente invención, por tanto, incluye una etapa después de la etapa de condensación que es la hidrólisis a pH ácido.

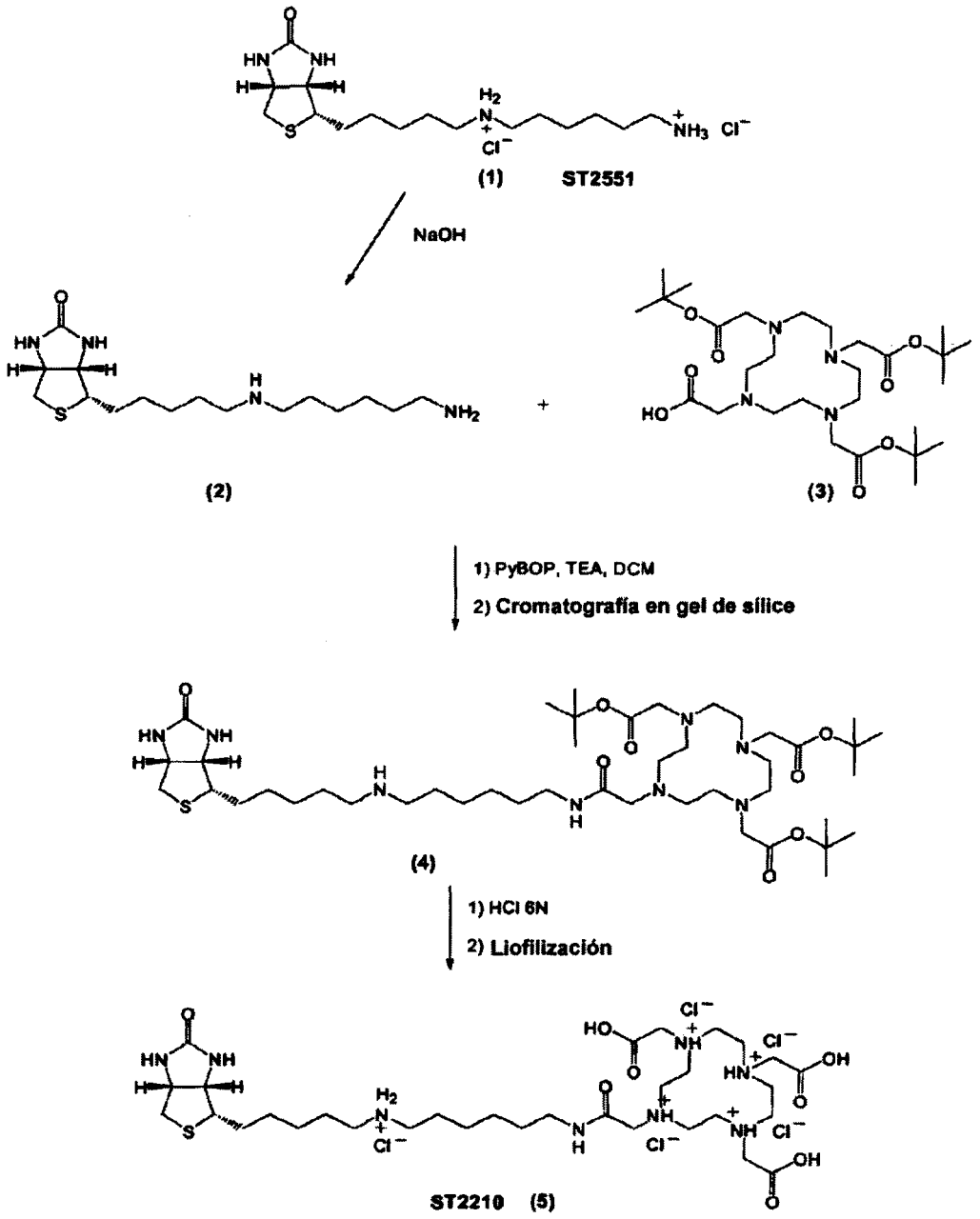
Preferentemente la condensación se lleva a cabo en un disolvente orgánico. Más preferentemente este disolvente es diclorometano.

De aquellos analizados, el mejor procedimiento de síntesis desarrollado es aquel que incluye las etapas ilustradas en el diagrama 2.

Además, la invención se ilustra con los Ejemplos que no son de ninguna forma una limitación de la propia invención.

(Esquema pasa a página siguiente)

Diagrama 2



Ejemplos

(Para la numeración de los compuestos consúltese el Diagrama 2)

Procedimientos

Las pruebas llevadas a cabo se controlaron usando un sistema de HPLC analítico conectado a un detector de red de diodos y a un espectrómetro de masas con un electropulverizador. El procedimiento analítico desarrollado incluye el uso de una columna analítica ACE C-18 (150 x 4,60 mm, 5 μ), una velocidad de flujo de 1,0 ml/min y un gradiente de elución lineal del 5-95% de B en 20 min (A = H_2O + 0,1% de TFA; B = AcCN + 0,1% de TFA), o del 10-90% de B en 20 min, o alternativamente una disolución isocrática al 10% de B durante 6 min, seguido por el gradiente del 10-90% de B en 20 min. Para el producto final ST2210, se usó un procedimiento que funciona en una disolución isocrática de B al 15% durante 40 min. El intervalo de longitudes de onda examinado por el detector es 205-400 nm.

El control rápido mediante TLC supone el uso de mezclas eluyentes del tipo ácido OEt:isopropanol:NH_3 al 30% o DMC:isopropanol:NH3 al 30% (4:5:1), que revela los productos clasificados (no visibles al UV) por medio de I_2 o reactivo fosfomolíbdico.

Preparación de biotinil hexametilendiamina (ST2551) como base libre (2)

El producto ST2551 [(1), pureza del 91%, 400 mg, 1,0 mmol) se disolvió en agua (20 ml) y la disolución se introdujo en un embudo de decantación; se añadió una disolución de NaOH 2M (20 ml) y el producto precipitado se extrajo tres veces con DCM (40 ml). Las fases orgánicas combinadas se deshidrataron con Na_2SO_4 anhidro y se evaporaron a presión reducida. El producto se obtuvo (2) en forma de sólido blanco (290 mg, rendimiento = 98%).

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

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

Síntesis de desoxibiotinil hexametilendiamina-terc-butil-DOTA (4)

Una disolución de tri-*terc*-butil-DOTA [(3), 524 mg, 0,915 mmol, 1 eq], PyBOP (714 mg, 1,37 mmol, 1,5 eq) y trietilamina (166 μl, 1,19 mmol, 1,3 eq) en DCM (5 ml) en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos, se añadió gota a gota a una disolución de la base libre de ST2551 [(2), 300 mg, 0,915 mmol, 1 eq) en DCM (5 ml), obtenida calentando la mezcla a 40ºC durante 5 min. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas, controlando la finalización de la reacción mediante TLC y LC-MS, según los procedimientos anteriores.

Al final de la reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo se disolvió en DCM y se lavó dos veces con NaOH 1M. La fase orgánica se deshidrató sobre Na_2SO_4 y se evaporó sobre vacío. El residuo así obtenido se sometió a cromatografía en una columna de gel de sílice (relación ponderal del producto en bruto:sílice 1:30), usando como sistema eluyente una mezcla de DCM:isopropanol 5:4 a la cual se le añadió una concentración creciente de NH3 acuoso al 30% (de 0,2 a 1). La columna se empaquetó con una mezcla inicial de DCM:isopropanol: NH_3 (5:4:0,2) y el procedimiento se prosiguió con el gradiente de NH_3. La mezcla eluyente normalmente se vuelve homogénea después de agitar; sólo en la fase final de la elución, con NH_3 = 1 puede ser necesario añadir isopropanol para mejorar la miscibilidad, en este caso usando la relación volumétrica (4:5:1) (DCM:isopropanol:NH_3). Se obtuvo un producto oleoso ligeramente amarillo que tendía a producir un sólido espumoso sobre vacío [(4), 600 mg, rendimiento = 74%].

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

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) (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 $[M+H]^+$.

Síntesis de desoxibiotinil hexametilendiamina-DOTA [ST2210, (5)]

Una disolución de (4) (210 mg, 0,238 mmol) en HCl 6N [1 ml, disolución al 20% en p/v de (4)] se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación la mezcla se evaporó a presión reducida, el residuo se disolvió en H_2O (1:50 en p/v aproximadamente) y la disolución se sometió a liofilización. Se obtuvo un sólido blanco (205 mg, 96%).

RMN ^{1}H (200 MHz, DMSO-d_6) (ppm): 1,30-1,77 [m, 16H, $CH(CH_2)_4$ y $NHCH_2(CH_2)_4$]; 2,59 (d, 1H, HCHS); 2,77-2,88 (m, 7H, HCHS y 3 x CH_2N); 2,98-3,70 (m, 25H, 8 x CH_2 y CHS del anillo DOTA y 4 x CH_2CO de DOTA); 4,15 (m, 1 H, CHCHNH); 4,31 (m, 1 H, CHCHNH); 7,58 (sa, 2H, 2 x NH de biotina); 8,86 (t, 1 H, NH de amida); 9,19 (sa, 2H, NH_2^+).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) (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 $[M+H]^+$.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para sintetizar desoxibiotinil hexametilendiamina-DOTA que supone hacer reaccionar biotinil hexametilendiamina con tri-*terc*-butil-DOTA en presencia de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-fosfonio, como el agente de condensación, y trietilamina, como la base.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la biotinil hexametilendiamina se hace reaccionar con tri-terc-butil-DOTA en un disolvente orgánico.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el disolvente orgánico es diclorometano.

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye una etapa de hidrólisis posterior en un entorno acuoso con un pH ácido.