



CONFEDERAZIONE SVIZZERA
UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

(51) Int. Cl.: C 07 D 473/34

Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein



(12) FASCICOLO DEL BREVETTO A5

(11)

618 169

(21) Numero della domanda: 5120/75

(73) Titolare/Titolari:
SNAMPROGETTI S.p.A., Milano (IT)

(22) Data di deposito: 22.04.1975

(30) Priorità: 30.04.1974 IT 22105/74

(72) Inventore/Inventori:
Luciano Re, Roma (IT)
Piergiorgio Zappelli, Monterotondo (IT)

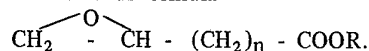
(24) Brevetto rilasciato il: 15.07.1980

(45) Fascicolo del
brevetto pubblicato il: 15.07.1980

(74) Mandatario:
Dr. A.R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

(54) Procedimento per la preparazione di derivati adeninici funzionalizzati e prodotti così ottenuti.

(57) Il gruppo amminico in posizione 6 del nucleo adeninico, o di composti che lo contengono, è funzionalizzato per reazione di tali composti con epossidi di acidi od esteri carbossilici di formula



R è definita nella rivendicazione 1.

La reazione provoca un alchilazione dell'azoto in posizione 1 del nucleo adeninico. Il prodotto così ottenuto si trasforma nel derivato corrispondente, funzionalizzato in posizione 6.

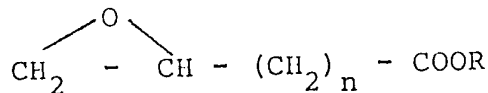
La reazione fra il composto contenente il nucleo adeninico e l'eossi-acido o -estere è condotta preferibilmente a temperature fra 0 e 50°C e in presenza di acqua, un solvente miscibile con acqua o un solvente di questi.

Nel caso che i composti di partenza contengono un nucleo nicotinamidico, il riarrangiamento è preceduto da un riduzione chimica di questo e seguito da una ossidazione enzimatica dello stesso.

Derivati adeninici così funzionalizzati possono essere impiegati, in cromatografie di affinità o come coenzimi non diffusibili.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la preparazione di derivati adeninici funzionalizzati consistente nel funzionalizzare il gruppo amminico in posizione 6 del nucleo adeninico, in composti che lo contengono, per reazione di tali composti con epossidi di acidi od esteri carbossilici di formula



dove R è idrogeno, alchile, cicloalchile, arile, arilalchile ed n è un numero intero compreso fra 1 e 4 e successivo riarrangiamento del derivato sostituito nell'azoto in posizione 1 del nucleo adeninico.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la reazione fra il composto contenente il nucleo adeninico e l'eossido-acido o -estere è condotta a temperature fra 0 e 50°C, preferibilmente a temperatura ambiente.

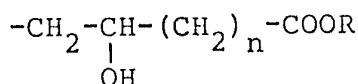
3. Procedimento secondo le rivendicazioni 1 e 2, caratterizzato dal fatto che la reazione con l'eossido viene effettuata in presenza di acqua, un solvente miscibile con acqua o un solvente di questi.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la reazione con l'eossido viene effettuata mantenendo il pH a circa 6 per aggiunta di acido perclorico.

5. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il riarrangiamento viene effettuato a temperature variabili da +5 a +80°C e a pH variabile da 7 a 11,5, preferibilmente a pH 11,2 e 75°C.

6. Procedimento secondo le rivendicazioni 1 e 5, caratterizzato dal fatto che, per i composti di partenza contenenti un nucleo nicotinamidico, il riarrangiamento è preceduto da una riduzione chimica di questo e seguito da una ossidazione enzimatica dello stesso.

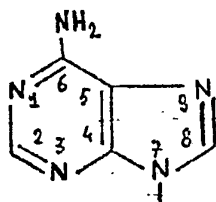
7. Derivati adeninici, funzionalizzati secondo il processo della rivendicazione 1, nei quali uno degli idrogeni del gruppo amminico in posizione 6 del nucleo adeninico è sostituito da un radicale alchilico funzionalizzato di formula



dove n ed R hanno i significati sopra riportati.

La presente invenzione si riferisce ad un procedimento per la preparazione di derivati adeninici funzionalizzati ed ai prodotti così ottenuti.

Più particolarmente la presente invenzione riguarda un processo di funzionalizzazione del gruppo amminico in posizione 6 del nucleo adeninico, come indicato nella seguente formula



a partire da composti contenenti tale nucleo quali, ad esempio, nicotinamide-adenina-dinucleotide, nicotinamide-adenina-dinucleotide fosfato, adenosina-monofosfato, adenosina-

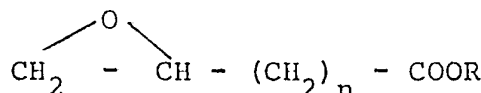
monofosfato ciclica, adenosina-difosfato, adenosina-trifosfato, adenosina, adenina. La maggior parte di questi composti ha grande importanza in biochimica e la funzionalizzazione del gruppo amminico ne allarga il campo di applicazione.

Ad esempio nel caso della nicotinamide-adenina-dinucleotide (NAD), ma il discorso vale anche per altri, i suoi derivati funzionalizzati possono essere impiegati, previo attacco covalente a macromolecole insolubili o solubili in acqua, in cromatografie di affinità o come coenzimi non diffusibili.

Così, nel caso di attacco a macromolecole idrosolubili, possono essere utilizzati come coenzimi macromolecolarizzati idrosolubili non diffusibili. Questi permettono l'allargamento del campo di applicazione dei sistemi enzimatici noti in cui l'enzima è inglobato fisicamente in strutture insolubili, quali fibre, gel di poliacrilammide, microcapsule, ecc., impermeabili alle macromolecole. Infatti, inglobando fisicamente insieme all'enzima o sistema polienzimatico anche il coenzima macromolecolarizzato idrosolubile, enzima e coenzima rimangono in stretto contatto e si evita la dispersione di questo ultimo all'esterno della struttura inglobante mentre, sino ad ora, ciò non era possibile per il basso peso molecolare del coenzima.

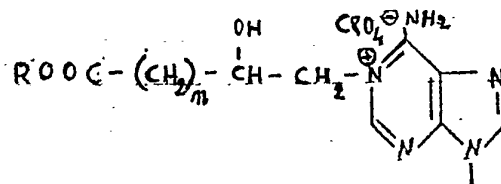
Nel caso di attacco a macromolecole insolubili in acqua, possono essere utilizzati per cromatografia di affinità o per reazioni enzimatiche in fase eterogenea con possibilità di recupero del coenzima.

Secondo la presente invenzione i nuovi derivati funzionalizzati vengono ottenuti facendo reagire il composto di partenza contenente il nucleo adeninico con epossidi di acidi od esteri carbossilici

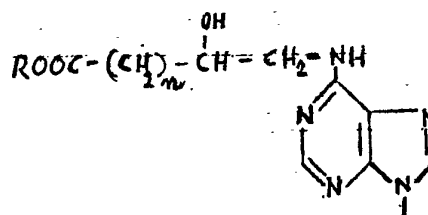


dove R è idrogeno, alchile, cicloalchile, arile, arilalchile ed n è un numero intero compreso fra 1 e 4.

La reazione viene effettuata a temperature variabili da 0 a 50°C, preferibilmente a temperatura ambiente, e in presenza di un solvente scelto generalmente fra acqua, solventi organici miscibili con acqua o miscele di questi, mantenendo il pH a circa 6 per aggiunta di acido perclorico. La reazione provoca un'alchilazione dell'azoto in posizione 1 del nucleo adeninico come illustrato nella formula



Il prodotto così ottenuto si trasforma nel derivato funzionalizzato di formula



per riarrangiamento effettuato a pH variabile da 7 a 11,5 e a temperatura variabile da +5 a +80°C, preferibilmente a pH 11,2 e a 75°C.

Nelle suddette formule n ed R hanno i significati noti. Nel caso della presenza contemporanea di un nucleo nicotinami-

dico, è preferibile effettuare una riduzione dello stesso prima del riarrangiamento.

Come detto, il processo è assolutamente generale, tuttavia ci riferiremo, nel seguito della descrizione, alla funzionalizzazione del NAD con intenti illustrativi dei singoli passi necessari alla realizzazione del processo stesso. Sarà comunque evidente, dalla lettura di quanto segue, che ogni esperto della arte potrà ottenere derivati adeninici funzionalizzati a partire da qualunque substrato adeninico semplicemente adattando le condizioni operative alla natura del composto di partenza, senza uscire dall'ambito della presente invenzione.

Più precisamente la preparazione dei derivati funzionalizzati del NAD (Tav. 1) viene effettuata facendo reagire il NAD con l'epossiacido o -estere, in acqua o miscela di acqua con comuni solventi organici miscibili con acqua e mantenendo il pH intorno a 6 con acido perclorico: in questo modo si ottiene il prodotto di alchilazione dell'azoto in posizione 1 del nucleo adeninico. Il prodotto ottenuto viene quindi sottoposto ad una riduzione chimica dell'anello nicotinamidico, seguita da riarrangiamento, a dare il prodotto di alchilazione del gruppo amminico in posizione 6 del nucleo adeninico.

Infine per riossidazione enzimatica dell'anello nicotinamidico con una deidrogenasi si ottiene il derivato funzionalizzato del NAD. E' da osservare che, una volta alchilata la posizione 1 del nucleo adeninico del NAD, tutte le reazioni successive possono essere condotte nello stesso recipiente di reazione senza isolare i prodotti intermedi.

Tutte le condizioni e le particolarità operative saranno resi evidenti dall'esame degli esempi che, ripetiamo, sono riportati al solo scopo di meglio illustrare l'invenzione senza tuttavia limitarne gli scopi.

Esempio 1

Acido 3,4-epossibutanoico

A 9,46 g (110 m.moli) di acido 3-butenico disciolti in 30 ml di CH_2Cl_2 raffreddati a 0°C si aggiungono lentamente sotto agitazione 110 m.moli di acido peracetico in soluzione all'80% [preparato secondo: H. KRIMM U.S. Patent 2 813 896 (1957)]. La miscela di reazione è lasciata rinvenire in bagno ad acqua a temperatura ambiente.

Dopo quattro giorni di agitazione a temperatura ambiente si aggiungono ulteriori 25 m.moli di acido peracetico. Il controllo gas cromatografico effettuato dopo 24 ore dalla seconda aggiunta del peracido mostra la scomparsa dell'acido 3-butenico. La miscela di reazione è sottoposta a concentrazione a 50°C e 20 mm Hg ed il residuo quindi a 5 tiraggi successivi con cicloesano e 3 con toluene nelle condizioni di vuoto e temperatura precedenti in modo da allontanare completamente l'acido acetico. Si ottengono g 10,27 di acido 3,4-epossibutanoico con purezza gas cromatografica dopo esterificazione con diazometano del 90%. Analisi NMR e Gas Massa effettuate sul metil estere confermano la struttura del prodotto ottenuto.

Esempio 2

3,4-epossibutanoato di metile

A 25,5 g (255 m.moli) di 3-butenato di metile in 100 ml di Et_2O raffreddati a 0°C si aggiungono lentamente, sotto agitazione, 406 m.moli di acido peracetico in soluzione all'80%. La reazione è condotta a temperatura ambiente per 10 giorni. Si aggiungono quindi 100 ml di CH_2Cl_2 e si lava la miscela organica con piccole porzioni di soluzione satura di NaHCO_3 fino a neutralità.

La fase organica è seccata su Na_2SO_4 anidro e concentrata a 45°C nel pieno.

Il residuo è distillato su colonna Spinning Band con vuoto di 0,02 mm Hg raccogliendo il prodotto che distilla a 30°C . Si ottengono 11,38 g di 3,4-epossibutanoato di metile che risulta puro alle analisi gas cromatografica ed NMR ed identico a quello preparato per esterificazione con diazometano dell'acido 3,4-epossibutanoico.

Esempio 3

Preparazione della Nicotinamide 6-(2-idrossi-3-carbossipropilammino) purina dinucleotide V ($n=1$, $R=H$). Ad 1 g (1,51 m.moli) di NAD sciolto in 6 ml di acqua bidistillata sono addizionate 42,1 m.moli di acido 3,4-epossibutanoico portati a pH 6 a 0°C con NaOH 6N. Il pH della miscela è ulteriormente aggiustato a 6, ed il pallone di reazione protetto dalla luce e provvisto di agitazione magnetica è collegato ad un pH-metro e buretta automatica caricata con HClO_4 1 N per mantenere il pH della miscela di reazione a 6 durante tutto il decorso della reazione. Dopo 8 giorni di agitazione a temperatura ambiente la reazione è interrotta (controllo TLC) e dopo acidificazione a pH 4 con HClO_4 1 N il prodotto è precipitato per addizione di dieci volumi di acetone e riposo della sospensione per una notte a $\sim -20^\circ\text{C}$, raccolto dopo centrifugazione ed infine seccato all'evaporatore rotante.

Lo spettro ultravioletto in Na_2CO_3 0,1 N di tale prodotto (II, $n=1$, $R=H$) mostra un assorbimento con un massimo a 259 m μ e due spalle a 267 e ~ 290 m μ caratteristico di un nucleo adeninico alchilato in N_1 . Il prodotto così isolato è ridisciolti in 60 ml di NaHCO_3 1%, addizionato di 400 mg di $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ e riscaldato in un bagno di acqua bollente per 5 minuti a dare III ($n=1$, $R=H$).

Dopo rapido raffreddamento si gorgoglia nella soluzione aria per 15 minuti per distruggere l'eccesso di $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

Lo spettro ultravioletto della soluzione ottenuta mostra, oltre al massimo a 259 ed alle due spalle a 267 e ~ 290 m μ , la comparsa di un nuovo massimo di assorbimento a 340 m μ che indica la avvenuta riduzione dell'anello nicotinamidico. La soluzione è portata a pH 11,2 con NaOH 1 N e riscaldata a 75°C per un'ora, poi raffreddata a temperatura ambiente a dare IV ($n=1$, $R=H$).

Lo spettro ultravioletto della soluzione ottenuta mostra oltre alla presenza del massimo a 340 m μ , la scomparsa del massimo a 259 m μ e della spalla a ~ 290 m μ con la formazione di un nuovo massimo a 267 m μ caratteristico per le adenine alchilate al gruppo amminico in posizione 6.

La soluzione è addizionata di 3 ml di tampone TRIS 3 M, portata a pH 7,5 con HCl 6 N ed infine addizionata di 0,5 ml di acetaldeide e di 100 μl di una sospensione di alcoldeidrogenasi da lievito in soluzione di solfato ammonico 4,8 N (contenente 29,4 mg di enzima per ml).

La miscela è lasciata a temperatura ambiente al buio per 40 minuti a dare V ($n=1$, $R=H$).

Lo spettro ultravioletto della soluzione ottenuta oltre alla presenza del massimo a 267 m μ , mostra la scomparsa del massimo di assorbimento a 340 m μ confermando l'avvenuta riossidazione dell'anello nicotinamidico.

Dopo acidificazione a pH 3 con HCl 6 N, precipitazione con 10 volumi di acetone e riposo a $\sim -20^\circ\text{C}$ per una notte, si raccoglie il precipitato di aspetto oleoso che è ripreso con 100 ml di acqua bidistillata, aggiustato a pH 8 con NaOH 1 N ed applicato ad una colonna cromatografica contenente 40 ml di resina anionica DOWEX 21 K nella forma HCOO^- . Si eluisce con ulteriori 100 ml di acqua bidistillata quindi con HCOOH 0,075 M finché l'eluato non mostra di contenere più prodotti che assorbono all'UV intorno a 260 m μ . L'eluizione successiva con HCCOH 0,2 M (1,5 l) permette di raccogliere il NAD derivato V ($n=1$, $R=H$). La concentrazione per liofilizzazione a circa $1/10$ del volume, la precipitazione con 10

volumi di acetone, il riposo a $\sim -20^{\circ}\text{C}$ per una notte e la centrifugazione consentono di raccogliere 190 mg di NAD derivato V ($n=1$, $R=H$) allo stato puro. Analisi NMR, IR nonché titolazioni con NaOH confermano le strutture del prodotto ottenuto (vedi tavola 1).

Esempio 4

Preparazione della Nicotinamide 6-(2-idrossi-3-carbometossi-propilammino) purina dinucleotide (V, $n=1$, $R=CH_3$). 1 g di NAD sciolto in 5 ml di H_2O bidistillata è portato a pH 6 con NaOH 1 N ed addizionato di 5,25 g di 3,4-epossi-butanoato di metile.

Il pallone di reazione protetto dalla luce e provvisto di agitazione magnetica è collegato ad un pH-metro e buretta automatica caricata con $HClO_4$ 1 N per mantenere il pH della miscela a 6 durante tutto il decorso della reazione.

Dopo 4 giorni di agitazione a temperatura ambiente la reazione è terminata (controllo TLC) e dopo acidificazione della soluzione a pH 4 con $HClO_4$ 1 N, precipitazione con 10 volumi di acetone e riposo per una notte a $\sim -20^{\circ}\text{C}$, si raccoglie il prodotto II ($n=1$, $R=CH_3$) da cui si allontana l'acetone residuo all'evaporatore rotante. UV in accordo con la struttura.

Il precipitato è disciolto in 60 ml di $NaHCO_3$ 1%, addizionato di 400 mg di $Na_2S_2O_4$, riscaldato in bagno di acqua bollente per 5 minuti, rapidamente raffreddato ed insufflato con aria per 15 minuti a dare III ($n=1$, $R=CH_3$). UV in accordo con la struttura. La soluzione è portata a pH 11,2 con NaOH 1 N, riscaldata a 75°C per 1 ora, poi raffreddata a temperatura ambiente a dare IV ($n=1$, $R=CH_3$). UV in accordo con la struttura.

La soluzione è quindi addizionata di 3 ml di tampone TRIS 3M, portata a pH 7,5 con HCl 6 N ed infine addizionata di 0,5 ml di acetaldeide e di 100 μl di una sospensione di

alcol deidrogenasi da lievito in soluzione di solfato ammonico 4,8 N (contenente 29,4 mg di enzima per ml).

La miscela è lasciata a temperatura ambiente al buio per 40 minuti a dare V ($n=1$, $R=CH_3$).

5 UV in accordo con la struttura.

La soluzione ottenuta è quindi acidificata a pH 3 con HCl 6 N, addizionata di 10 volumi di acetone ed il precipitato oleoso ottenuto dopo riposo a $\sim -20^{\circ}\text{C}$ per una notte è disciolto in 100 ml di acqua bidistillata, portato a pH 8 con NaOH 1 N ed applicato ad una colonna cromatografica contenente 40 ml di resina DOWEX 21 K nella forma $HCOO^-$.

Si eluisce prima con ulteriori 100 ml di acqua bidistillata, poi con $HCOOH$ 0,075 M fino a che non sono più eluiti prodotti che assorbono all'UV intorno a 260 m μ .

15 L'eluizione successiva con $HCOOH$ 0,2 M permette di raccogliere il NAD derivato V ($n=1$, $R=CH_3$) che viene isolato allo stato puro dopo concentrazione per liofilizzazione, precipitazione con 10 volumi di acetone, riposo a $\sim -20^{\circ}\text{C}$ per una notte e centrifugazione.

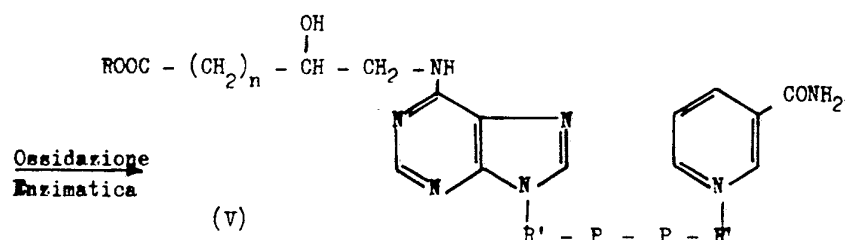
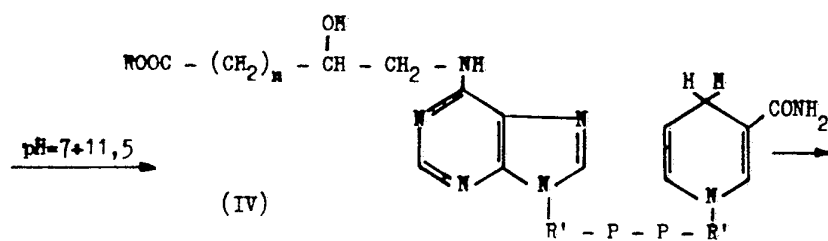
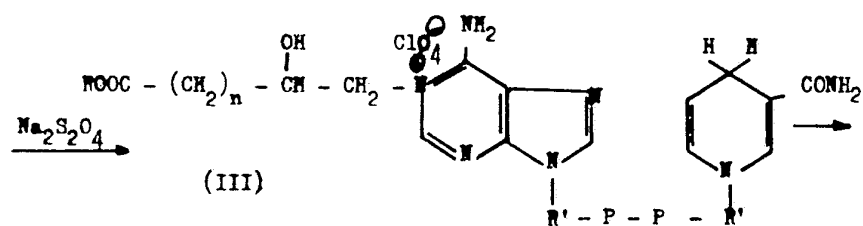
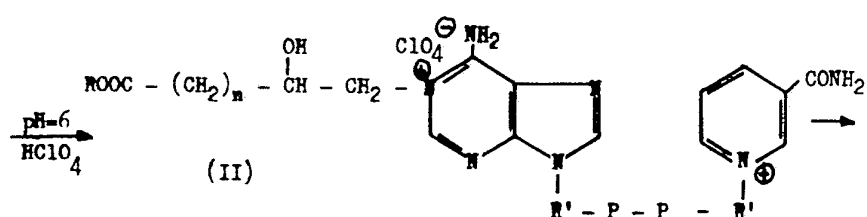
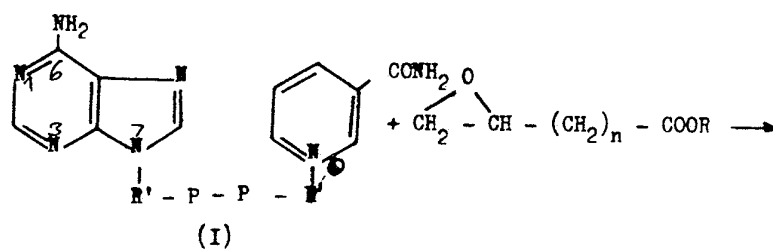
20 Analisi NMR ed IR confermano la struttura del prodotto ottenuto.

Esempio 5

Preparazione della Nicotinamide 6-(2-idrossi-3-carbossi-propilammino) purina dinucleotide V ($n=1$, $R=H$) da Di-idronicotinamide 6-(2-idrossi-3-carbometossi-propilammino) purina dinucleotide IV ($n=1$, $R=CH_3$).

1 g di Diidronicotinamide 6-(2-idrossi-3-carbometossi-propilammino) purina dinucleotide IV ($n=1$, $R=CH_3$) è addizionato di 15 ml di acqua bidistillata, di 15 ml di KOH alcolica 0,5 N e riscaldato a 75°C per 30 minuti. Si raffredda immediatamente e si effettua l'ossidazione enzimatica e la elaborazione descritta nell'esempio n. 3. Il prodotto così ottenuto è identico (TLC, NMR, IR, UV) al prodotto ottenuto nell'esempio n. 3.

TAV. 1



-R' = Ribosio; P = Fosfato; n = 1, 2, 3, 4; R = H, alchile, etc.