

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 998 864**

51 Int. Cl.:

C07H 1/00 (2006.01)

C07H 23/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2020 PCT/JP2020/032609**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2021 WO21070507**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2020 E 20874517 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2024 EP 4043476**

54 Título: **Método de producción de un compuesto glucósido**

30 Prioridad:

08.10.2019 JP 2019185109

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

21.02.2025

73 Titular/es:

**SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED
(100.00%)
2-7-1, NihonbashiChuo-ku
Tokyo 103-6020, JP**

72 Inventor/es:

**SAITO, TATSUYA y
IHARA, HIDEKI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 998 864 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de producción de un compuesto glucósido

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de producción de un compuesto glucósido.

10 El ARN, que es un oligómero de ácido nucleico que comprende ribosa, se puede aplicar como una sonda de ARN, un ARN antisentido, una ribozima, un ARNip o un aptámero, etc., que es un material útil.

Antecedentes de la técnica

15 En un método para producir un oligómero de ácido nucleico, se usa un compuesto fosforamidita de un nucleósido en el que un grupo hidroxilo en posición 3' está fosforamidado. También como precursor del compuesto fosforamidita del nucleósido, es conocido un compuesto glucósido en el que un grupo hidroxilo en posición 3' y un grupo hidroxilo en posición 5' del nucleósido están sustituidos con un grupo protector, y un grupo hidroxilo en posición 2' está sustituido con un grupo protector que es capaz de salir en condiciones suaves.

20 Como método para producir el compuesto glucósido, es conocido un método de producción de un compuesto glucósido en donde un grupo derivado de éter se introduce en un grupo hidroxilo en posición 2', que comprende una etapa de hacer reaccionar un compuesto glucósido en donde un grupo hidroxilo en posición 3' y un grupo hidroxilo en posición 5' están protegidos con un grupo protector de sililo, con un compuesto de tioéter en tetrahidrofurano como disolvente (véanse las bibliografías de patente 1 y 2). La bibliografía de patente 3 se refiere a un compuesto glucósido y a un método de producción del mismo. La bibliografía de patente 4 se refiere a un método para introducir un grupo protector de ácido nucleico y producir un derivado de ácido ribonucleico. La bibliografía de patente 5 se refiere a un compuesto de amidita y a un método de producción de un polinucleótido usando el mismo. La bibliografía no de patente 1 se refiere a la síntesis de un oligómero de ARN largo utilizando un grupo protector CEM.

30 **Listado de citas****Bibliografía de patente**

35 Bibliografía de patente 1: JP 5168145 B2
Bibliografía de patente 2: WO 2016/159374
Bibliografía de patente 3: WO 2013/027843 A1
Bibliografía de patente 4: WO 2008/016079 A1
Bibliografía de patente 5: WO 2019/208571 A1

40 **Bibliografía no de patentes**

Bibliografía no de patente 1: Shiba *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, 3287-3296.

Sumario de la invención

45

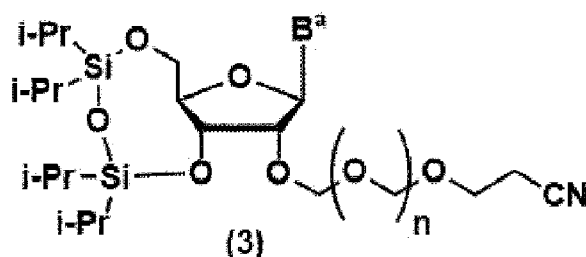
[Problemas que ha de resolver la invención]

50 La pureza del compuesto glucósido con la fórmula (3) que se menciona a continuación, el cual se prepara mediante el método descrito en las bibliografías de patente 1 y 2 mencionadas anteriormente, no es necesariamente satisfactoria. Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de producción de un compuesto glucósido que tiene una alta pureza.

(Medios para resolver los problemas)

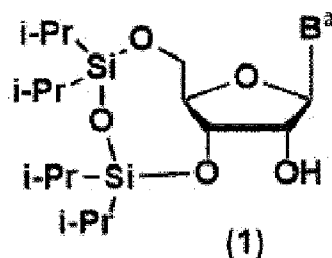
55 La presente invención proporciona un método de producción de los compuestos glucósidos que se mencionan a continuación. La presente invención incluye los aspectos descritos en los puntos mencionados a continuación, pero sin limitarse a los mismos.

60 Punto [1] Un método de producción de un compuesto glucósido representado por la fórmula (3):



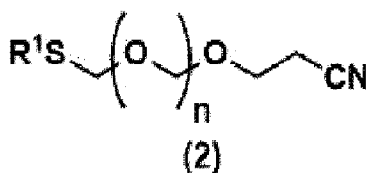
en donde B^a, i-Pr y n son los mismos que se definen a continuación, que comprende hacer reaccionar un compuesto glucósido representado por la fórmula (1):

5



en donde B^a representa un grupo adenina que puede estar opcionalmente sustituido con un grupo acilo, y el grupo i-Pr representa un grupo isopropilo, con un compuesto de éter representado por la fórmula [2]:

10



en donde R¹ representa un grupo alquilo C1-C6 o un grupo fenilo, y n es 0 o 1, en 4-metiltetrahidropirano en presencia de uno o más agentes de halogenación seleccionados entre halógenos, succinimida N-halogenada e hidantoína N-halogenada. (En lo sucesivo en el presente documento denominado "Método de producción de la presente invención" o "Método de producción actual").

15

- 20 Punto [2] El método de producción de acuerdo con [1] en donde n es 1.
- Punto [3] El método de producción de acuerdo con [1] en donde n es 0.
- Punto [4] El método de producción de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3] en donde el agente de halogenación es halógeno.
- 25 Punto [5] El método de producción de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4] en donde el agente de halogenación es yodo.
- Punto [6] El método de producción de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5] en donde R¹ representa un grupo metilo.
- Punto [7] El método de producción de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6] en donde B^a representa un grupo adenina que está sustituido con un grupo acetilo o un grupo benzoílo.
- 30 Punto [8] El método de producción de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6] en donde B^a representa un grupo adenina que está sustituido con un grupo acetilo.

Efecto de la invención

35 De acuerdo con el método de producción de la presente invención, se puede suprimir la formación de impurezas de un compuesto glucósido que es un material de partida para la síntesis de un ácido oligonucleico. El compuesto glucósido es adecuado para la síntesis de un ácido oligonucleico.

Modo para llevar a cabo la invención

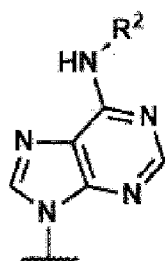
40

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describe con detalle.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "comprende" puede incluir también los significados de "consiste esencialmente en" y "consiste en".

En el presente documento se describe un método de producción de un compuesto glucósido representado por la fórmula (3) (en lo sucesivo en el presente documento denominado "Proceso de la presente invención" o "Presente proceso"), dicho método comprende hacer reaccionar un compuesto glucósido representado por la fórmula (1) con un compuesto de éter representado por la fórmula (2) en 4-metiltetrahidropirano en presencia de uno o más agentes de halogenación seleccionados entre halógeno, succinimida N-halogenada e hidantoína N-halogenada.

Para los compuestos glucósidos de fórmula (1) y de fórmula (3), el grupo adenina que puede estar opcionalmente sustituido con un grupo acilo indicado como B^a tiene la siguiente estructura



en donde R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo acilo.

Un grupo acilo representa un grupo acilo alifático de cadena lineal o ramificada, o un grupo acilo aromático, en el que el número total de átomos de carbono, incluido el átomo de carbono contenido en el grupo carbonilo, es de 2 a 12, y preferentemente es de 2 a 7. Ejemplos del grupo acilo incluyen grupos acilo alifáticos (tales como un grupo acetilo, un grupo propionilo, un grupo butanoilo (un grupo butirilo), un grupo isobutanoilo (un grupo isobutirilo), un grupo pentanoilo, un grupo hexanoilo, un grupo heptanoilo, un grupo octanoilo, un grupo nonanoilo, un grupo decanoilo y un grupo undecanoilo, etc.); y grupos acilo aromáticos (tales como un grupo benzoilo, un grupo 1-naftoilo y un grupo 2-naftoilo), y preferentemente incluye un grupo acetilo o un grupo benzoilo.

Ejemplos del agente halogenado incluyen halógenos (tales como yodo y bromo); succinimidias N-halogenadas (tales como N-cloro succinimida, N-bromo succinimida (NBS), y N-yodo succinimida (NIS), etc.); hidantoínas N-halogenadas (tales como 1,3-diyodo-5,5-dimetilhidantoína, 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoína, y 1-bromo-3-cloro-5,5-dimetilhidantoína, etc.). En la presente invención, se usan preferentemente halógenos, y además se usa preferentemente yodo.

La reacción de la presente invención se puede llevar a cabo añadiendo un ácido además de los agentes halogenados. Ejemplos del ácido incluyen los ácidos perfluoroalquilcarboxílicos y sales de los mismos, ácidos alquilsulfónicos y sales de los mismos, ácidos arilsulfónicos y sales de los mismos, ácido perfluoroalquilsulfónico y su sal, y ácidos alquilsulfónicos y sales de los mismos, así como cualquiera de las combinaciones de dos o más de estos ácidos. Ejemplos de la sal incluyen sales metálicas (tales como sal de cobre y sal de plata). Ejemplos específicos del ácido incluyen ácido metanosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, y trifluorometanosulfonato de plata, así como cualquiera de las combinaciones de dos o más de estos ácidos. El grupo alquilo del ácido alquilsulfónico puede ser una cadena lineal o ramificada del mismo, y preferentemente es un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 de átomos de carbono. Como ejemplo del grupo alquilo se ilustran metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo y hexilo. Ejemplos del grupo arilo del ácido arilsulfónico incluyen el grupo fenilo y el grupo toliilo.

Para el compuesto de éter de fórmula (2), el grupo alquilo indicado como R¹ puede ser una cadena lineal o ramificada del mismo, y preferentemente es un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 de átomos de carbono. Ejemplos del grupo alquilo incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo y hexilo. Ejemplos del grupo alquilo incluyen preferentemente un grupo metilo.

El disolvente para la reacción de la presente invención incluye 4-metiltetrahidropirano (MTHP). La cantidad de disolvente está dentro de un intervalo que normalmente varía del 0,5 % v/p al 20 % v/p, y preferentemente del 1 % v/p al 10 % v/p, a diferencia del compuesto glucósido representado por la fórmula (1).

La cantidad del compuesto de éter representado por la fórmula (2) está dentro de un intervalo que normalmente varía de 0,8 a 5 moles, preferentemente de 1 a 3 moles, y más preferentemente de 1 a 1,5 moles, frente a 1 mol del compuesto glucósido representado por la fórmula (1). La cantidad de los agentes halogenados está dentro de un intervalo que normalmente varía de 0,8 a 10 moles, preferentemente de 3 a 10 moles, y más preferentemente de 3 a 6 moles, frente a 1 mol del compuesto glucósido representado por la fórmula (1). La cantidad del ácido está dentro de un intervalo que normalmente varía de 0 a 5 moles, preferentemente de 0 a 1,5 moles, y más preferentemente de 0 a 0,1 moles, frente a 1 mol de los compuestos glucósidos representados por la fórmula (1).

La temperatura de reacción de la presente invención está normalmente dentro de un intervalo de -30 a 30 °C, preferentemente de -20 a 25 °C, y más preferentemente de -15 a 5 °C. El periodo de reacción de la presente reacción está dentro de un intervalo que normalmente varía de 0,5 a 10 horas, y preferentemente de 0,5 a 6 horas.

- 5 El compuesto glucósido representado por la fórmula (1) se puede preparar mediante un método conocido públicamente, o se puede obtener como un producto disponible en el mercado. El compuesto de éter representado por la fórmula (2) se puede preparar según un método conocido públicamente (véanse las bibliografías de patente 1 y 2 y el documento JP 2016-50203 Amencionados anteriormente).
- 10 El compuesto glucósido obtenido mediante la presente invención se puede usar como producto bruto en una reacción posterior, y según sea necesario, se puede purificar mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

Ejemplos

- 15 En lo sucesivo en el presente documento, se describen ejemplos de trabajo para explicar la presente invención con más detalle. La presente invención, sin embargo, no se limita a estos ejemplos, etc.

- La pureza del compuesto glucósido sintetizado se midió mediante HPLC. El compuesto glucósido se separó para cada ingrediente mediante HPLC y, para la cantidad de subproductos, se calcularon el total de los porcentajes del área de los subproductos en los cromatogramas obtenidos. El aparato de HPLC utilizado se ajustó de tal manera que se pudiera detectar cualquier pico que tuviera un área de pico de 1000 o más, y el pico que tenía un área de pico mínima detectable en estas condiciones era del 0,03 % como porcentaje del área.
- 20

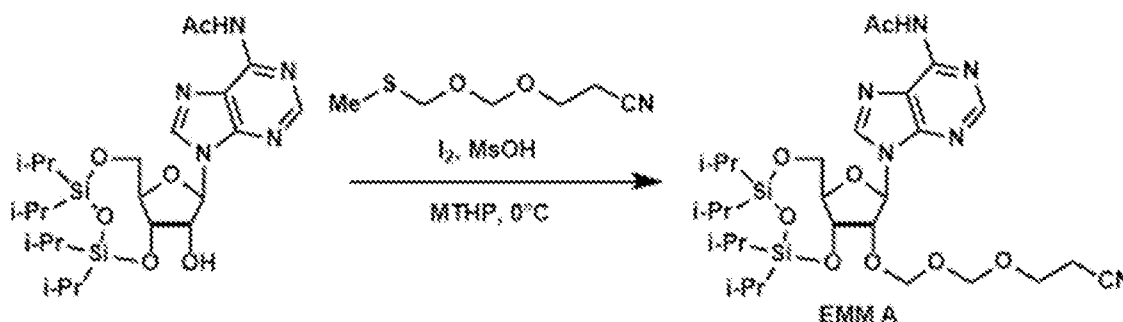
[Tabla 1]

Columna	Columna XBridge BEH C18 XP. 130 Å, 2,5 µm, 3 mm x 50 mm (Waters)
Caudal	1,0 ml/min
Longitud de onda de detección	260 nm
Fase móvil A	10 mM TEAA (tampón de acetato de trietilamina), pH 7,0
Fase móvil B	Acetonitrilo
Gradiente	B conc. 5 % - 75 %
Temperatura de la columna	35 °C

- 25 En lo sucesivo en el presente documento, tal como se utiliza en el presente documento, CEM representa 2-cianoetoximetilo, y EMM representa 2-cianoetoximetoximetilo.

Ejemplo 1

- 30 N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetoximetil)adenosina (EMM A)



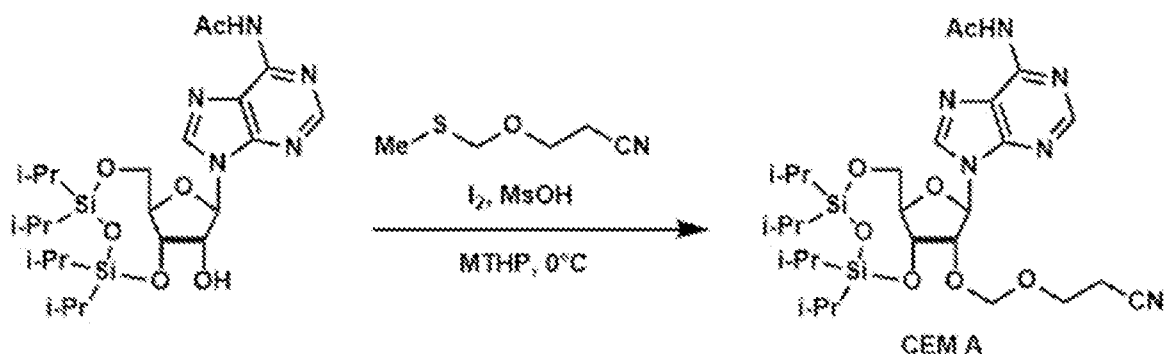
- 35 Se disolvió N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)adenosina (1,0 g, 1,8 mmol) en 4-metiltetrahidropirano (10 ml), y la mezcla se enfrió a 0 °C. A la misma se añadieron ácido metanosulfónico (17 mg, 0,18 mmol), yodo (2,7 g, 10,8 mmol), y 2-cianoetoximetil metiltiometil éter (0,44 g, 2,7 mmol), y la mezcla se agitó a 0 °C en atmósfera de nitrógeno durante 3 horas. Las soluciones de reacción se añadieron a una solución mixta de solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio y solución acuosa saturada de hidrocbonato de sodio, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. Los disolventes se evaporaron para obtener un producto bruto que contenía el producto deseado.
- 40

Como resultado del análisis de HPLC, el total del área del pico de LC de los subproductos fue del 5,9 %.

Ejemplo 2

- 45

N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina (CEM A)



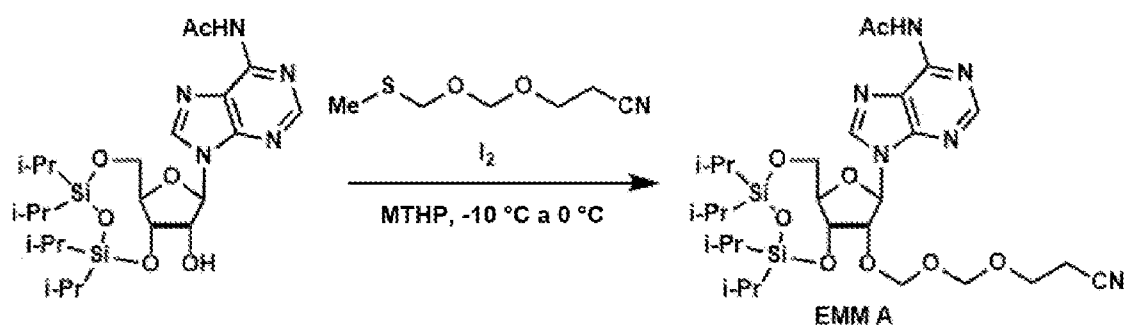
- 5 Se disolvió N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)adenosina (1,0 g, 1,8 mmol) en 4-metiltetrahidropirano (5 ml), y la mezcla se enfrió a 0 °C. A la misma se añadieron ácido metanosulfónico (17 mg, 0,18 mmol), yodo (2,7 g, 10,8 mmol), y metiltiometil 2-cianoetil éter (0,35 g, 2,7 mmol), y la mezcla se agitó a 0 °C en atmósfera de nitrógeno durante 3 horas. Las soluciones de reacción se añadieron a una solución mixta de solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio y solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo.
- 10 Los disolventes se evaporaron para obtener un producto bruto que contenía el producto deseado.

Como resultado del análisis de HPLC, el total del área del pico de LC de los subproductos fue del 3,3 %.

Ejemplo 3

15

N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetoximetil)adenosina (EMM A)

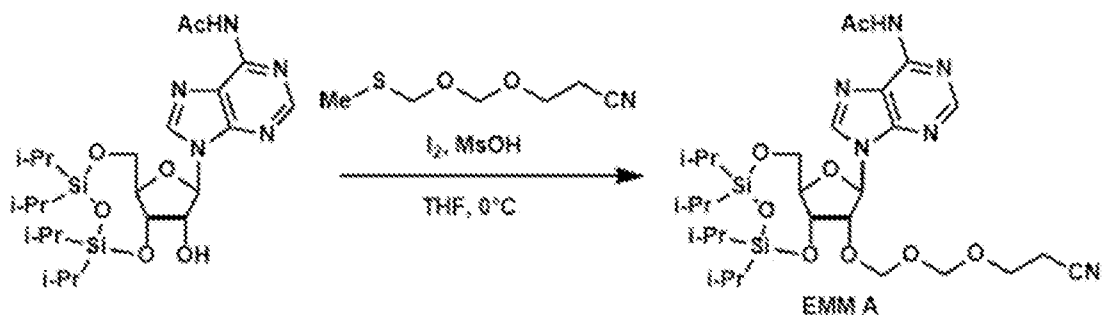


- 20 Se disolvió N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)adenosina (5,0 g, 9,0 mmol) en tolueno (25 ml), y la mezcla se concentró a 15 ml como volumen de solución. A esta solución se añadió 4-metiltetrahidropirano (10 ml), y la mezcla se enfrió a -10 °C. A la misma se añadieron yodo (13,8 g, 55,2 mmol), y 2-cianoetoximetil metiltiometil éter (2,18 g, 13,4 mmol), y la mezcla se agitó a 0 °C en atmósfera de nitrógeno durante 1 hora. La solución de reacción se añadió a una solución mixta de solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio y solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y la mezcla se extrajo con tolueno. Los disolventes se evaporaron para obtener un producto bruto que contenía el producto deseado.
- 25

Como resultado del análisis de HPLC, el total del área del pico de LC de los subproductos fue del 7,1 %.

30 Ejemplo comparativo 1

N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetoximetil)adenosina (EMM A)



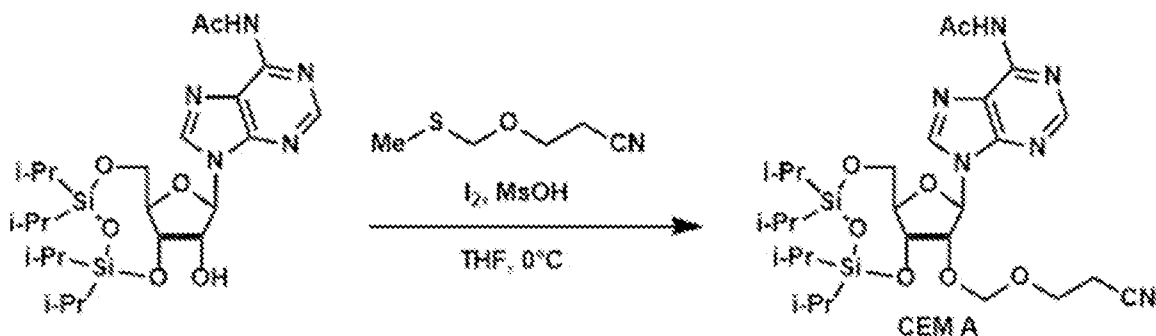
Se disolvió N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)adenosina (1,0 g, 1,8 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml), y la mezcla se enfrió a 0 °C. A la misma se añadieron ácido metanosulfónico (17 mg, 0,18 mmol), yodo (2,7 g, 10,8 mmol), y 2-cianoetoximetil metiltiometil éter (0,44 g, 2,7 mmol), y la mezcla se agitó a 0 °C en atmósfera de nitrógeno durante 3 horas. La solución de reacción se añadió a una solución mixta de solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio y solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. Los disolventes se evaporaron para obtener un producto bruto que contenía el producto deseado.

10 Como resultado del análisis de HPLC, el total del área del pico de LC de los subproductos fue del 10,2 %.

Ejemplo comparativo 2

N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetil)adenosina (CEM A)

15



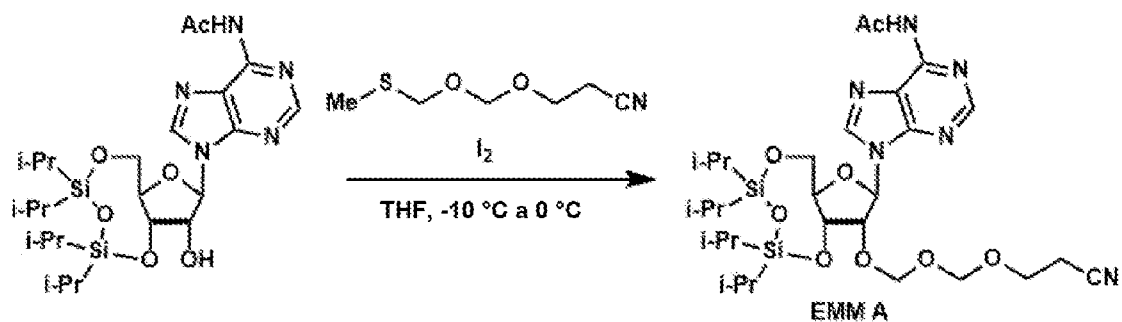
Se disolvió N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)adenosina (1,0 g, 1,8 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml), y la mezcla se enfrió a 0 °C. A la misma se añadieron ácido metanosulfónico (17 mg, 0,18 mmol), yodo (2,7 g, 10,8 mmol), y metiltiometil 2-cianoetil éter (0,35 g, 2,7 mmol), y la mezcla se agitó a 0 °C en atmósfera de nitrógeno durante 3 horas. Las soluciones de reacción se añadieron a una solución mixta de solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio y solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. Los disolventes se evaporaron para obtener un producto bruto que contenía el producto deseado.

25 Como resultado del análisis de HPLC, el total del área del pico de LC de los subproductos fue del 8,6 %.

Ejemplo comparativo 3

N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2'-O-(2-cianoetoximetoximetil)adenosina (EMM A)

30



Se disolvió N⁶-acetil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)adenosina (5,0 g, 9,0 mmol) en tolueno (25 ml), y la mezcla se concentró a 15 ml como volumen de solución. A esta solución se le añadió tetrahidrofurano (10 ml), y la mezcla se enfrió a -10 °C. A la misma se añadieron yodo (13,8 g, 55,2 mmol) y 2-cianoetoximetil metiltiometil éter (2,18 g, 13,4 mmol), y la mezcla se agitó a 0 °C en atmósfera de nitrógeno durante 1 hora. La solución de reacción se añadió a una solución mixta de solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio y solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y la mezcla se extrajo con tolueno. Los disolventes se evaporaron para obtener un producto bruto que contenía el producto deseado.

Como resultado del análisis de HPLC, el total del área del pico de LC de los subproductos fue del 10,7 %.

Los resultados de los ensayos de los ejemplos y ejemplos comparativos mencionados se muestran en la tabla 2.

[Tabla 2]

Producto deseado	Disolvente	Ácido	Cantidad de subproducto (HPLC)	Número total de picos de subproductos (HPLC)
EMM A	MTHP	Añadido	5,9 % (Ejemplo 1)	27
	THF	Añadido	10,2 % (Ejemplo comparativo 1)	39
	MTHP	No añadido	7,1 % (Ejemplo 3)	19
	THF	No añadido	10,7 % (Ejemplo comparativo 3)	33
CEM A	MTHP	Añadido	3,3 % (Ejemplo 2)	15
	THF	Añadido	8,6 % (Ejemplo comparativo 2)	27

Tal como se muestra en la tabla 2 anterior, el uso de 4-metiltetrahidropirano (MTHP) como disolvente puede suprimir la formación de subproductos, el cual puede obtener el producto deseado con mayor pureza.

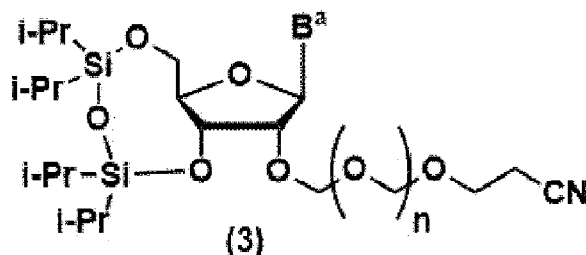
20 Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de producción de un compuesto glucósido. El compuesto glucósido que se obtiene de acuerdo con el proceso tiene una gran pureza, y es adecuado para la síntesis de oligonucleótidos de gran pureza.

25

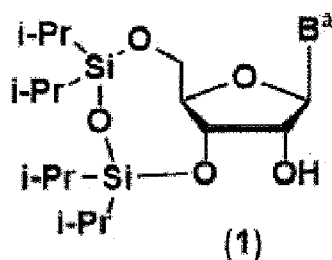
REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un compuesto glucósido representado por la fórmula (3):



5

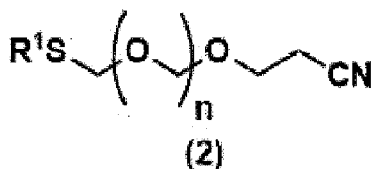
en donde B^a, i-Pr y n son los mismos que se definen a continuación, que comprende hacer reaccionar un compuesto glucósido representado por la fórmula (1):



10

en donde B^a representa un grupo adenina que puede estar opcionalmente sustituido con un grupo acilo, y el grupo i-Pr representa un grupo isopropilo, con un compuesto de éter representado por la fórmula [2]:

15



20

en donde R¹ representa un grupo alquilo C1-C6 o un grupo fenilo, y n es 0 o 1, en 4-metiltetrahidropirano en presencia de uno o más agentes de halogenación seleccionados entre halógenos, succinimida N-halogenada e hidantoína N-halogenada.

2. El método de producción de acuerdo con la reivindicación 1, en donde n es 1.

25

3. El método de producción de acuerdo con la reivindicación 1 en donde n es 0.

4. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente de halogenación es halógeno.

30

5. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el agente de halogenación es yodo.

6. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde R¹ representa un grupo metilo.

35

7. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde B^a representa un grupo adenina que está sustituido con un grupo acetilo o un grupo benzoilo.

8. El método de producción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde B^a representa un grupo adenina que está sustituido con un grupo acetilo.