



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 613**

51 Int. Cl.:
C07D 405/04 (2006.01)
C07D 473/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01903534 .4**
86 Fecha de presentación : **02.02.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1265890**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.12.2002**

54 Título: **Síntesis estereoselectiva de análogos de nucleósido.**

30 Prioridad: **11.02.2000 US 181977 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **Shire BioChem Inc.**
2250 Alfred-Nobel Boulevard, Suite 500
Ville St-Laurent, Quebec H4S 2C9, CA

72 Inventor/es: **Cimpoia, Alex y**
Wang, Yi-Fong

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Síntesis estereoselectiva de análogos de nucleósido.

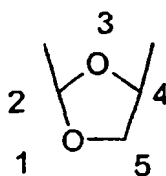
5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a un nuevo procedimiento para la preparación de análogos de nucleósido y sus precursores y más particularmente a un procedimiento de preparación de un análogo de nucleósido mediante la utilización de enzimas específicas para producir de manera estereoselectiva análogos de nucleósido de dioxolano o sus precursores.

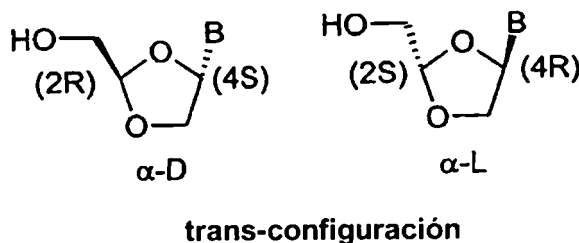
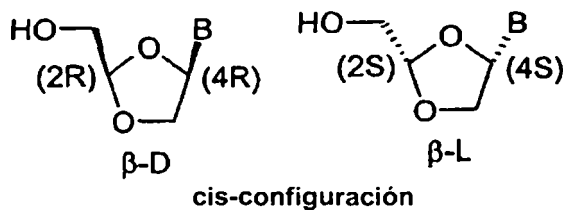
Antecedentes de la invención

Una clase importante de agentes farmacológicos se refiere a análogos de 2',3'-didesoxinucleósido 3'-oxa-sustituídos ("análogos de nucleósido de dioxolano"). Estos compuestos incluyen 9-(β -D-2-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-2-aminopurina (β -D-DAPD); 9-(β -D-2-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-guanina (β -D-DXG); 1-(β -L-2-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-timina (dioxolano T); y 1-(β -L-2-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-citidina (β -L-OddC) que presentan actividad antitumoral y antiviral conocida.

Tal como se muestra en la estructura de dioxolano siguiente, los dioxolanos presentan dos centros quirales que corresponden a los carbonos 2 y 4 sustituidos del anillo de dioxolano (C2 y C4, respectivamente). Por tanto, cada compuesto puede existir como cuatro estereoisómeros diferentes dependiendo de la posición de ambos sustituyentes con respecto al anillo de dioxolano.



Los estereoisómeros de un análogo de nucleósido de dioxolano están representados por los siguientes diagramas en los que la letra B representa una base de purina o pirimidina o un análogo o derivado de una base de purina o pirimidina tal como se define con la presente memoria.



Para su sistematicidad, se usará la misma designación estereoquímica incluso cuando el resto hidroximetilo o el resto de base (B) se sustituye por otro grupo sustituyente.

Los procedimientos sintéticos quirales han mejorado durante los últimos años pasados con respecto a las técnicas sintéticas que dan como resultado compuestos de un solo estereoisómero. Sin embargo, existe una necesidad actual de encontrar procedimientos sintéticos nuevos que puedan usarse ampliamente para formar un estereoisómero particular con pureza y eficacia mayor.

Por ejemplo, durante muchos años un experto en la materia podía usar enzimas para separar enantiómeros de compuestos de dioxolano. La utilización de proteasas disponibles comercialmente para la separación de isómeros cis

y trans se da a conocer en Journal of Organic Chemistry (US), volumen 64, 19 de noviembre de 1999, páginas 9019-9029.

Tanto la α -quimotripsina como la proteasa pancreática bovina dan alta diastereoselectividad cuando se usan para separar diastereoisómeros de nucleósidos de dioxolano.

Se notifica un exceso diastereomérico superior al 98% y un rendimiento global del 55% del éster metílico de cis-dioxolano a partir de una hidrólisis catalizada por α -quimotripsina a pequeña escala de una mezcla 2:1 de ésteres metílicos cis y trans.

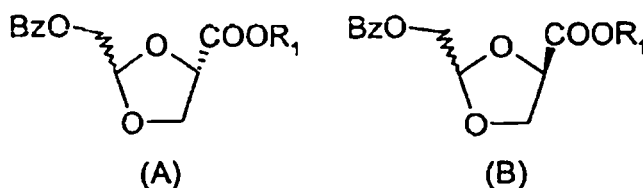
Sin embargo, existe todavía una necesidad en la técnica de producir un análogo de nucleósido de dioxolano usando una etapa que consiste en separar una mezcla anomérica de ciertos precursores de dioxolano para producir un producto final con pureza y eficacia mayor.

Ya que los nucleósidos de dioxolano estereoquímicamente puros son una importante clase de compuestos debido a su actividad anticancerígena y actividad antiviral conocidas, existe una necesidad de otros procedimientos estereoselectivos no costosos y eficaces para su preparación. La presente invención satisface ésta y otras necesidades.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un nuevo procedimiento para producir análogos de nucleósido de dioxolano con un alto grado de pureza estérica, eficacia mayor y rendimientos superiores.

De manera específica, la presente invención proporciona un procedimiento para producir análogos de nucleósido de dioxolano con un alto grado de pureza estérica que incluye la utilización de ciertas enzimas hidrolíticas para separar los anómeros β y α de una mezcla anomérica representada por la siguiente fórmula A o fórmula B:



en las que R_1 se selecciona de entre el grupo constituido por alquilo C_{1-6} y arilo C_{6-15} ; Bz es benzofilo.

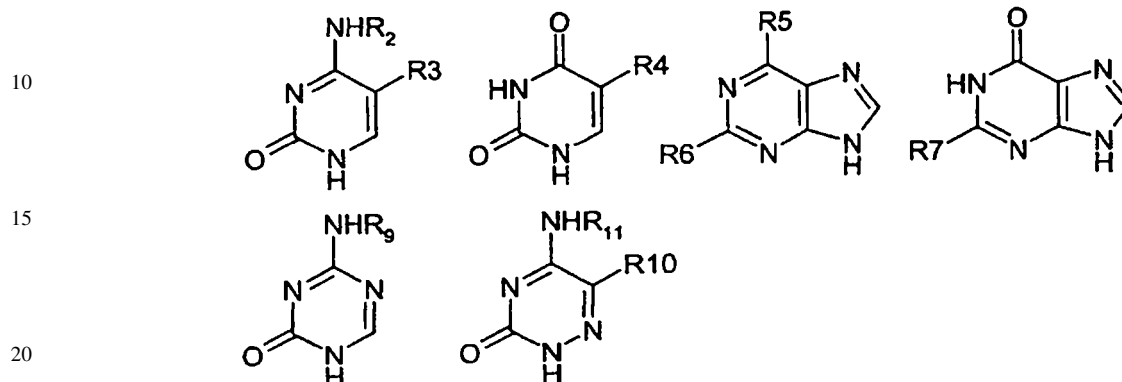
El procedimiento implica la etapa de hidrolizar la mezcla de compuestos representada por la fórmula A y/o fórmula B con una enzima seleccionada de entre el grupo constituido por Protease N, Alcalase®, Savinase®, ChiroCLEC™-BL, PS-30 y ChiroCLEC™-PC. El procedimiento hidroliza de manera estereoselectiva predominantemente un anómero para formar un producto en el que R_1 , de fórmula A y fórmula B se sustituye por H. El otro anómero permanece no hidrolizado sustancialmente. El procedimiento también comprende separar el producto hidrolizado del material de partida no hidrolizado.

Según una forma de realización de la invención, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un material de partida aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 97% de anómero β . En una forma de realización adicional, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un material de partida aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98% de anómero β . En una forma de realización adicional, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un material de partida aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98,5% de anómero β . En una forma de realización adicional, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un material de partida aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98,8% de anómero β .

Según una forma de realización de la invención, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un producto aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 97% de anómero α . En una realización adicional, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un producto aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98% de anómero α . En una forma de realización adicional, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un producto aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98,5% de anómero α . En una forma de realización adicional, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un producto aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98,8% de anómero α .

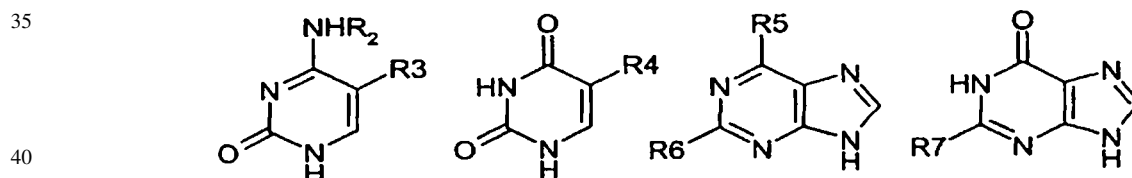
En una forma de realización, el anómero β es el producto predominante. En otra forma de realización, el anómero α es el producto predominante. Aún en otra forma de realización, el enantiómero β -L es el producto predominante. En una forma de realización adicional, el enantiómero β -D es el producto predominante. Aún en otra forma de realización, el enantiómero α -L es el producto predominante. En una forma de realización adicional, el enantiómero α -D es el producto predominante.

En una forma de realización, la invención consiste en un procedimiento para preparar de manera estereoselectiva un análogo de nucleósido de dioxolano separando los anómeros β y α de una mezcla anomérica representada por la fórmula A o la fórmula B según una de las formas de realización anteriores. El procedimiento incluye además la etapa que consiste en sustituir de manera estereoselectiva el grupo funcional en la posición C4 (COOR₁) por un purinilo o pirimidinilo o análogo o derivado seleccionado de entre el grupo constituido por:



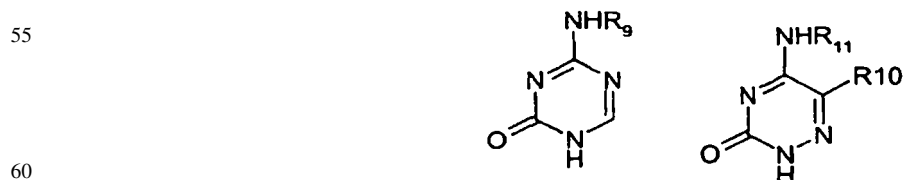
En esta realización, R₂, R₉ y R₁₁ se seleccionan independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C₁₋₆, acilo C₁₋₆ y R₈C(O), en el que R₈ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆. Adicionalmente, R₃, R₄ y R₁₀ se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C₁₋₆, bromo, cloro, flúor, yodo y CF₃; y R₅, R₆ y R₇ se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, bromo, cloro, flúor, yodo, amino, hidroxilo y cicloalquilamino C₃₋₆. El procedimiento da como resultado la producción de un isómero estereoquímico del análogo de nucleósido de dioxolano.

Según una forma de realización, el procedimiento incluye además la etapa que consiste en sustituir de manera estereoselectiva el grupo funcional en la posición C4 (COOR₁) por un purinilo o pirimidinilo o derivado seleccionado de entre el grupo constituido por:



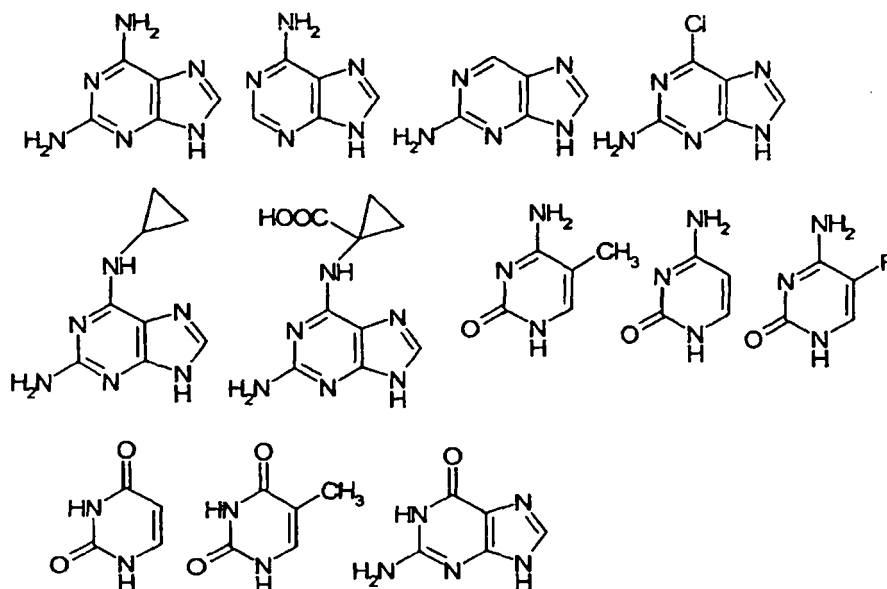
En esta realización, R₂ se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C₁₋₆, acilo C₁₋₆ y R₈C(O), en el que R₈ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆. Adicionalmente, R₃ y R₄ se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C₁₋₆, bromo, cloro, flúor, yodo y CF₃; y R₅, R₆ y R₇ se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, bromo, cloro, flúor, yodo, amino, hidroxilo y cicloalquilamino C₃₋₆. El procedimiento da como resultado la producción de un isómero estereoquímico de un análogo de nucleósido de dioxolano.

En otra forma de realización, el procedimiento incluye además la etapa que consiste en sustituir de manera estereoselectiva el grupo funcional en la posición C4 (COOR₁) por un pirimidinilo o análogo o derivado seleccionado de entre el grupo constituido por:



En esta forma de realización, R₉ y R₁₁ se seleccionan independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C₁₋₆, acilo C₁₋₆ y R₈C(O). Adicionalmente, R₁₀ se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C₁₋₆, bromo, cloro, flúor, yodo y CF₃. El procedimiento da como resultado la producción de un isómero estereoquímico de un análogo de nucleósido de dioxolano.

En otra forma de realización, el procedimiento comprende preparar de manera estereoselectiva un análogo de nucleósido de dioxolano separando los anómeros β y α de una mezcla anomérica representada por la fórmula A o la fórmula B según una de las realizaciones anteriores y comprende además sustituir de manera estereoselectiva el grupo funcional en la posición C4 (COOR₁) por un resto seleccionado de entre el grupo constituido por:



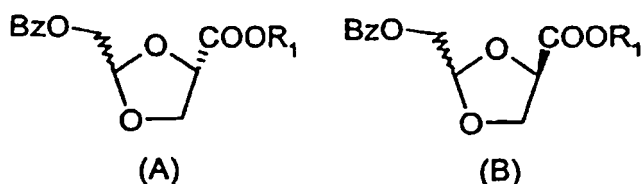
En otra forma de realización de la presente invención, el procedimiento comprende producir un análogo de nucleósido de dioxolano separando un compuesto según la fórmula A o la fórmula B. Según esta realización, el procedimiento incluye sustituir de manera estereoselectiva el grupo R por un resto de 9-purinilo o 1-pirimidinilo o análogo o derivado del mismo mediante la acilación de la segunda mezcla para producir una segunda mezcla acilada. Esta forma de realización incluye también la etapa que consiste en glicosilar la segunda mezcla acetilada con una base de purina o pirimidina o análogo o derivado de la misma y un ácido de Lewis para producir un análogo de nucleósido de dioxolano.

Descripción detallada de la invención

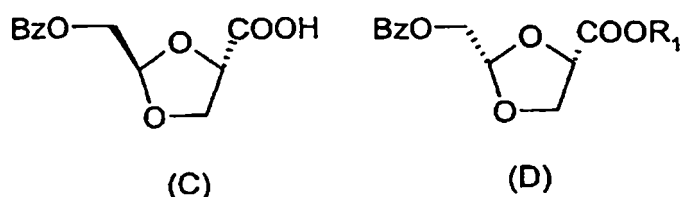
La presente invención implica un procedimiento con alto rendimiento de separación anómeros β y α de una mezcla anomérica de precursores de análogos de nucleósido de dioxolano que proporcionan un rendimiento superior y una eficacia mayor. En una forma de realización, este procedimiento se utiliza en la producción de análogos de nucleósido de dioxolano que presentan un alto grado de pureza anomérica a menor coste. Adicionalmente, otro aspecto de la presente invención implica sintetizar material de partida que presenta un grado superior de pureza anomérica.

La presente invención proporciona un procedimiento de preparación de análogos de nucleósido de dioxolano que presentan una configuración β -L predominante utilizando enzimas, concretamente hidrolasas. El procedimiento mejora el rendimiento global y presenta relativamente pocas etapas, mejorando así la eficacia global. El procedimiento implica las etapas siguientes.

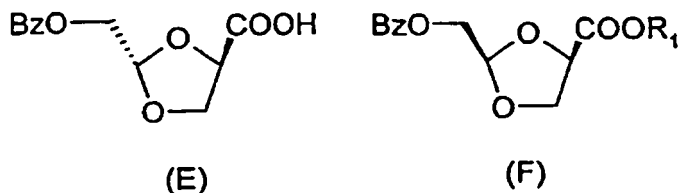
Se obtiene una mezcla de anómeros representados por la fórmula A o la fórmula B tal como se describe en la presente memoria en el esquema 1.



En la fórmula anterior, R₁ se selecciona de entre el grupo constituido por H, alquilo C₁₋₆ y arilo C₆₋₁₅ y Bz es benzoílo. La mezcla se hidroliza con una enzima seleccionada de entre el grupo constituido por Alcalase[®] (Novo Nordisk), Savinase[®] (Novo Nordisk), ChiroCLEC[™]-BL (Altus Biologics, Inc.), PS-30 (Amano), Protease N (Amano) y ChiroCLEC[™]-PC (Altus Biologics, Inc.). La etapa que consiste en hidrolizar hidroliza de manera estereoselectiva el anómero α de la mezcla de o bien la fórmula A o bien la fórmula B. El resultado es un anómero β no hidrolizado. El anómero α puede separarse fácilmente del anómero β . Si se selecciona una mezcla anomérica del compuesto de fórmula A, el resultado es la producción del compuesto de fórmula C y fórmula D:



Si se selecciona una mezcla anomérica del compuesto de fórmula B, el resultado es la producción del compuesto de fórmula E y fórmula F:

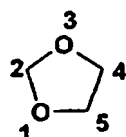


La mezcla (C)/(D) o (E)/(F) se somete entonces a la descarboxilación oxidativa que sustituye el grupo R_1 por un resto acilo. Entonces se glicosila con una base de purina o pirimidina o análogo o derivado de la misma en presencia de un ácido de Lewis. La etapa final produce un análogo de nucleósido de dioxolano en la configuración β -L para la mezcla (C)/(D) y un análogo de nucleósido de dioxolano en la configuración β -D para la mezcla (E)/(F).

De entrada, las definiciones siguientes se han proporcionado como referencia. Excepto que se indique específicamente lo contrario, las definiciones proporcionadas a continuación determinarán el significado a lo largo de la presente memoria.

“Nucleósido” se define como cualquier compuesto constituido por una base de purina o pirimidina, unida a un azúcar pentosa.

“Análogo de nucleósido de dioxolano” se define como cualquier compuesto que contiene un anillo de dioxolano tal como se define a continuación en la presente memoria unido a una base de purina o pirimidina o análogo o derivado de la misma. Un “anillo de dioxolano” es cualquier anillo monocíclico de cinco miembros sustituido o no sustituido que presenta un oxígeno en las posiciones 1 y 3 del anillo tal como se ilustra a continuación:



Anillo de dioxolano

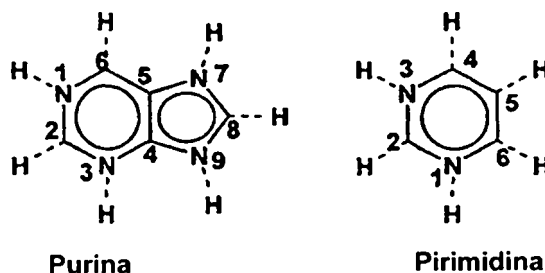
“Base de purina o pirimidina” se define como las bases de purina o pirimidina que se producen de forma natural adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. Una purina o pirimidina que es un resto es un purinilo o pirimidinilo, respectivamente.

“Alquilo” se define como un resto sustituido o no sustituido, saturado o insaturado, de cadena lineal, de cadena ramificada o carbocíclico, en el que el resto de cadena lineal, de cadena ramificada o carbocíclico puede estar interrumpido opcionalmente por uno o más heteroátomos (tales como oxígeno, nitrógeno o azufre). Un alquilo sustituido está sustituido con un halógeno (F, Cl, Br, I), hidroxilo, amino o arilo C_{6-20} .

“Arilo” se define como un resto carbocíclico que puede estar sustituido o interrumpido opcionalmente por heteroátomo (tal como oxígeno, nitrógeno o azufre) y que contiene por lo menos un anillo de tipo bencenoide (tal como fenilo y naftilo).

“Resto carbocíclico” se define como un cicloalquilo C_{3-6} sustituido o no sustituido, saturado o insaturado, en el que un cicloalquilo sustituido está sustituido con un alquilo C_{1-6} , halógeno (es decir, F, Cl, Br, I), amino, carbonilo o NO_2 .

Un “derivado” de una base de purina o pirimidina se refiere a una de las estructuras siguientes:



en las que uno o más de los H de pirimidina están sustituidos por sustituyentes que se conocen en la técnica. En la ilustración anterior, los enlaces representados por una línea discontinua son opcionales y están presentes sólo en casos que requieren que el enlace complete la valencia del átomo de anillo. Los sustituyentes unidos a los miembros de anillo mediante un enlace sencillo incluyen, pero no se limitan a, halógeno tal como F, Cl, Br, I; un alquilo tal como alquilos inferiores; arilo; ciano cabamoilo; amino incluyendo amino primario, secundario y terciario; y grupos hidroxilo. Los sustituyentes unidos a los átomos de anillo de carbono mediante un enlace doble incluyen, pero no se limitan a, un =O para formar un resto carbonilo en el anillo. Se entiende que cuando el anillo es aromático algunas de las sustituciones pueden formar tautómeros. La definición incluirá tales tautómeros.

“Análogo” de una base de purina o pirimidina se refiere a cualquier derivado de bases de purina o pirimidina que está modificado adicionalmente sustituyendo uno o más carbonos en la estructura de anillo por un nitrógeno.

“Enzimas estereoselectivas” se definen como enzimas que participan como catalizadores en reacciones que producen selectivamente un estereoisómero específico con respecto a otros estereoisómeros.

“Pureza anomérica” se define como la cantidad de un anómero particular de un compuesto dividida entre la cantidad total de todos los anómeros de ese compuesto presentes en la mezcla multiplicado por 100%.

“Alcoxilo” se define como un grupo alquilo, en el que el grupo alquilo está unido covalentemente a un elemento adyacente por medio de un átomo de oxígeno (tal como metoxilo y etoxilo).

“Alcoxycarbonilo”, se define como un grupo alcoxilo unido al grupo adyacente de un carbonilo.

“Acilo” se define como un radical derivado de un ácido carboxílico, sustituido (con un halógeno, arilo C_{6-20} o alquilo C_{1-6}) o no sustituido mediante sustitución del grupo OH. Como el ácido con el que está relacionado, un radical acilo puede ser alifático o aromático, estar sustituido (con halógeno, alcoxialquilo C_{1-6} , nitro u O_2) o no sustituido, y cualquiera que sea la estructura del resto de la molécula, las propiedades del grupo funcional siguen siendo esencialmente las mismas (tal como acetilo, propionilo, isobutanilo, pivalilo, hexanilo, trifluoroacetilo, cloroacetilo y ciclohexanilo).

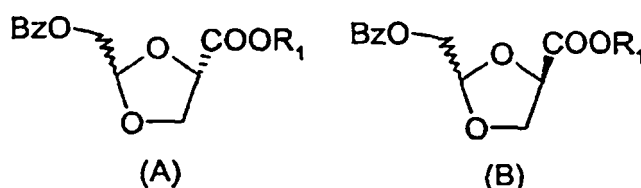
“Alcoxialquilo” se define como un grupo alcoxilo unido al grupo adyacente mediante un grupo alquilo (tal como metoximetilo).

“Aciloxilo” se define como un grupo acilo unido al grupo adyacente mediante un átomo de oxígeno.

“Oxo” se define como un sustituyente =O unido a un átomo de carbono.

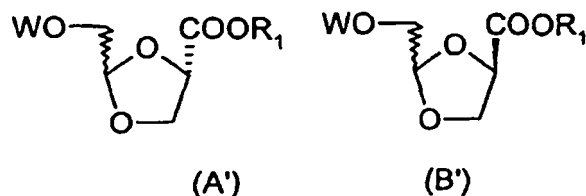
“Grupo protector de hidroxilo” se conoce bien en el campo de la química orgánica. Tales grupos protectores pueden encontrarse en T. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, (John Wiley & Sons, 1981). Ejemplos de grupos protectores de hidroxilo incluyen, pero no se limitan a, bencilo, benzoilo, benzoilo sustituido, acetilo y acetilo sustituido.

Tal como se indicó anteriormente, una realización de la presente invención es un procedimiento para separar anómeros β y α de una mezcla anomérica representada por la siguiente fórmula A o fórmula B:



en las que R_1 se selecciona de entre el grupo constituido por alquilo C_{1-6} y arilo C_{6-15} ; Bz es benzilo.

Otra realización de la presente invención es un procedimiento para separar anómeros β y α de una mezcla anomérica representada por las fórmula A' o fórmula B' siguientes:

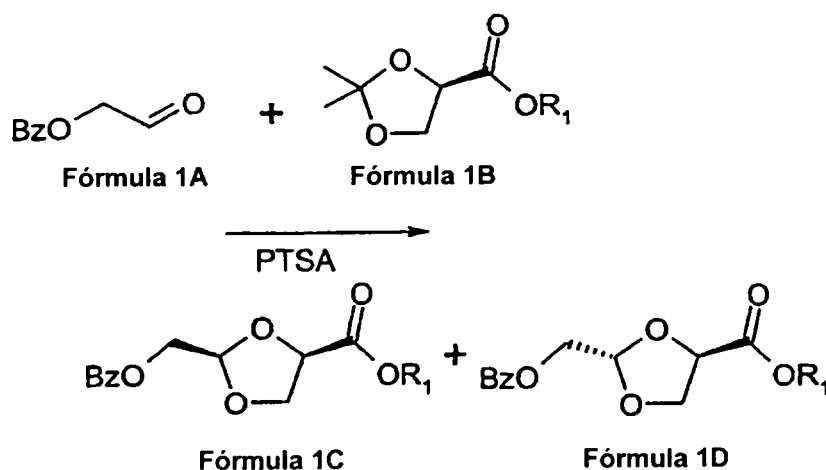


en las que R_1 se selecciona de entre el grupo constituido por alquilo C_{1-6} y arilo C_{6-15} ; W es un grupo protector de hidroxilo.

En una forma de realización, el procedimiento hidroliza de manera estereoselectiva predominantemente el anómero α para formar un producto en el que R_1 de fórmula A y fórmula B se sustituye por H. El anómero β permanece no hidrolizado sustancialmente. El procedimiento comprende además separar el producto hidrolizado del material de partida no hidrolizado.

El procedimiento para producir un análogo de nucleósido de dioxolano β -L comienza con la preparación de los materiales de partida. El esquema 1 representa la preparación de una mezcla que incluye la fórmula A o B.

Esquema 1



Se obtiene un benzoiloxiacetaldehído (fórmula 1A) con 2,2-dimetil-metil éster del ácido 1,3-dioxolano-4-carboxílico (fórmula 1B) en proporciones aproximadamente equimolares. El dioxolano de fórmula 1B presenta un centro quiral en el carbono C4. La reacción se produce en un disolvente de tolueno. Se calienta la mezcla hasta 58°C. Se añade el catalizador, PTSA. Se calienta la mezcla hasta una temperatura entre 64-67°C. Se aplica vacío a 70 kPa, y la reacción avanza durante 40 minutos. Entonces se eliminan las trazas del disolvente mediante alto vacío. Se elimina el catalizador mediante filtración utilizando un razón 1:1 de hexano:EtOAc como eluyente. En una forma de realización, el filtro preferido es una almohadilla de gel de sílice. El producto resultante es un aceite en bruto que contiene una mezcla de los compuestos de fórmula 1C y 1D en la que la razón es 2:1 de (1C:1D), respectivamente.

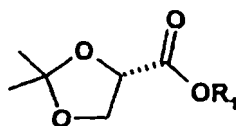
Puede apreciarse por un experto en la materia que pueden ajustarse las condiciones de reacción para optimizar la pureza de los estereoisómeros. En una forma de realización de la presente invención, la reacción del compuesto de fórmula 1A con el compuesto de fórmula 1B se realiza en presencia de catalizador en una cantidad de entre aproximadamente el 1,0% en peso y el 10,0% en peso del material de partida. En otra realización, la cantidad de catalizador está entre aproximadamente el 2,5% en peso y aproximadamente el 5,5% en peso de los materiales de partida. Aún en otra forma de realización, la cantidad de catalizador está entre aproximadamente el 3,0% en peso y aproximadamente el 5,0% en peso. Todavía en otra forma de realización, la cantidad de catalizador está entre aproximadamente el 3,5% y aproximadamente el 5,5%. En otra forma de realización, la cantidad de catalizador está entre aproximadamente el 2,5% en peso y aproximadamente el 7,5% en peso. En otra forma de realización, la cantidad de catalizador es de aproximadamente el 5,0% en peso.

En una forma de realización de la presente invención, la reacción del compuesto de fórmula 1A con el compuesto de fórmula 1B se realiza a una temperatura comprendida entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 80°C. En otra forma de realización de la presente invención, la temperatura está comprendida entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 75°C. Todavía en otra realización, la temperatura está comprendida entre aproximadamente 60°C y aproximadamente 70°C. En una forma de realización adicional, la temperatura está comprendida entre aproximadamente 65°C y aproximadamente 79°C.

En una forma de realización de la presente invención, el tiempo de reacción entre el compuesto de fórmula 1A y el compuesto de fórmula 1B corresponde a un periodo comprendido entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 horas. Aún en otra realización, el periodo está comprendido entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 1 hora. Todavía en otra forma de realización, el periodo está comprendido entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 50 minutos.

Se apreciará por un experto en la materia que el carbono C4 es quiral. Puesto que este carbono no está implicado en la reacción, la quiralidad se conserva en ese carbono. Puede seleccionarse un material de partida para que presente una estereoquímica (4S) o (4R).

Según una forma de realización, resulta preferido que el producto resultante sea una mezcla anomérica que favorezca la configuración β -L con respecto a la configuración α -L. Para conseguir un resultado de este tipo, se selecciona el material de partida representado por la fórmula 1B (4S) y que se muestra a continuación:



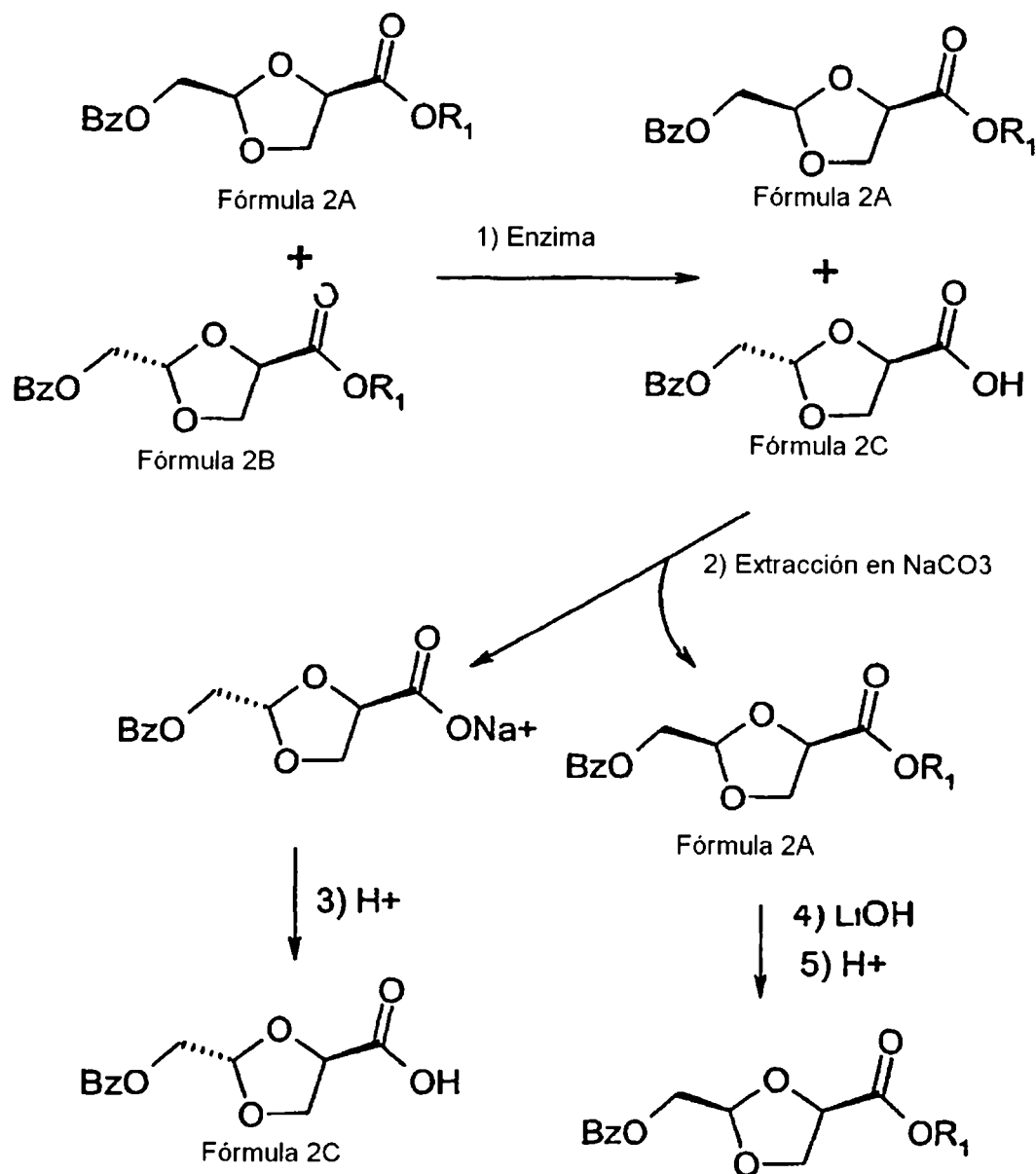
Fórmula 1B (4S)

La reacción avanza según los principios descritos anteriormente. El producto resultante, según una forma de realización, presentará una pureza anomérica del anómero β -L con respecto al anómero α -L superior al 55%, preferentemente del 60% y más preferentemente del 65%.

Según una forma de realización, la presente invención es un procedimiento de separación de anómeros β de anómeros α según el esquema 2 siguiente:

(Esquema pasa a página siguiente)

Esquema 2



Según una forma de realización, se obtiene una mezcla de anómeros tal como se representa por la fórmula 2A o la fórmula 2B. Puede obtenerse una mezcla representada por la fórmula 2A o la fórmula 2B según la reacción descrita anteriormente o según cualquier procedimiento conocido en la técnica.

La reacción se prepara tal como sigue: Una parte del material que contiene una mezcla de compuestos representados por la fórmula 2A y la fórmula 2B se pesa dentro de una recipiente de reacción. Según una forma de realización, se añade aproximadamente el 3,7% en mmoles de la mezcla a 10 ml de tampón acuoso/acetonitrilo al 20%. En otra forma de realización para una reacción a escala preparativa, se añaden aproximadamente 75,2 mmoles de la mezcla a aproximadamente 200 ml de tampón acuoso/acetonitrilo al 20%. El tampón es un tampón fosfato con un pH de entre 7,0 y 7,5 y preferentemente de 7,2. En otra forma de realización se utilizó un t-butil metil éter acuoso al 20%.

La enzima se selecciona de entre el grupo constituido por Alcalase®, Savinase®, ChiroCLEC™-BL, PS-30, Protease N y ChiroCLEC™-PC. Estas enzimas están disponibles comercialmente. Particularmente, algunos de los materiales pueden obtenerse de las siguientes fuentes: Savinase® y Alcalase® pueden obtenerse de Novo Nordisk. ChiroCLEC™-BL y ChiroCLEC™ pueden obtenerse de Altus Biologics, Inc. PS-30 y Protease N pueden obtenerse de Amano Pharmaceutical.

Entonces, se añade la enzima estereoespecífica seleccionada para comenzar la reacción de hidrólisis. La reacción enzimática hidroliza principalmente el anómero α a sustituyendo el grupo R_1 del anómero α del compuesto de fórmula 2B por H para formar el compuesto de fórmula 2C. La cantidad de la enzima añadida puede determinarse según los principios conocidos por cualquier experto en la materia. Según otra forma de realización, se añadieron aproximadamente 500 ml para comenzar la reacción. Se monitorizó la velocidad y el grado de hidrólisis mediante un pH-estado según los principios conocidos en la técnica. A medida que se hidroliza el compuesto de fórmula 2B, disminuye el pH de la mezcla. Por tanto, el cambio de pH tal como se monitoriza por un pH-estado corresponde a la finalización de la reacción.

Si el tiempo de reacción se deja avanzar más que el tiempo de reacción óptimo, puede convertirse el anómero β dando como resultado un rendimiento químico inferior del producto final. Si el tiempo de reacción es demasiado corto, se convierte una cantidad inferior a la óptima del anómero α dando como resultado una pureza anomérica inferior del reactivo no hidrolizado que queda. Según una forma de realización, la reacción se deja avanzar hasta una finalización del 43%. Se apreciará por un experto en la materia que el grado exacto de finalización puede cambiar dependiendo del reactivo utilizado, la enzima utilizada y otros principios que conoce el experto en la materia.

Tal como se observa, el material de partida de éster y el producto hidrolizado se separan mediante un aumento del pH de la disolución hasta superior a pH 7,0 y, en una forma de realización, inferior a pH 7,5 con bicarbonato de sodio y extrayendo con acetato de etilo (por ejemplo, 3 x 80 ml). El material de partida no hidrolizado se extrae con acetato de etilo y el producto hidrolizado permanece en forma de sal en la disolución acuosa. El pH de la disolución se ajusta entonces hasta pH 2. El producto hidrolizado se extrae adicionalmente con acetato de etilo (por ejemplo, 3 x 80 ml). Los reactivos y los productos se secan con $MgSO_4$, se filtran y se concentran a vacío.

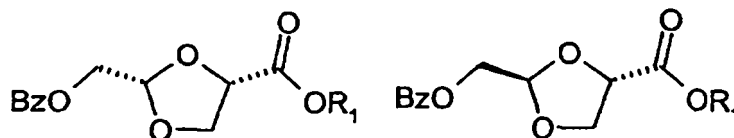
Adicionalmente, puede hidrolizarse el producto no hidrolizado mediante procedimientos conocidos en la técnica tales como la reacción con LiOH seguida de acidificación.

Debido a la selectividad enzimática, la pureza anomérica del anómero α hidrolizado y separado es considerablemente alta.

Según una forma de realización de la invención, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un material de partida aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 97% de anómero β . En una forma de realización adicional, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un material de partida aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98% de anómero β . En una forma de realización adicional, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un material de partida aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98,5% de anómero β . En una forma de realización adicional, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un material de partida aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98,8% de anómero β .

Según una forma de realización de la invención, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un producto aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 97% de anómero α . En una forma de realización adicional, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un producto aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98% de anómero α . En una forma de realización adicional, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un producto aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98,5% de anómero α . En una forma de realización adicional, las etapas mencionadas anteriormente que consisten en hidrolizar y separar dan como resultado un producto aislado que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98,8% de anómero α .

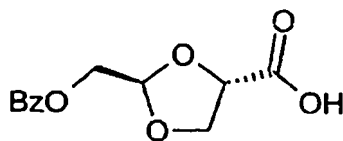
En otra forma de realización, se sigue el procedimiento del esquema 2 excepto en que la mezcla anomérica representada por la fórmula 2A y 2B se sustituye por una mezcla anomérica representada por la fórmula 2D y 2E, respectivamente.



Fórmula 2D

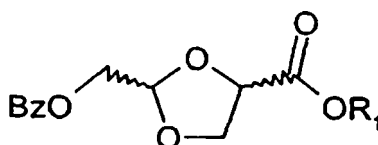
Fórmula 2E

Según esta forma de realización, se hidroliza el anómero α representado por la fórmula 2E. El resultado es la separación del anómero α hidrolizado representado por la fórmula 2F del anómero β no hidrolizado representado por la fórmula 2D.



Fórmula 2F

En otra forma de realización, se sigue el procedimiento del esquema 2 excepto en que una mezcla representada por la fórmula 2A y 2B se sustituye por una mezcla de cuatro estereoisómeros representada por la fórmula 2G.



Fórmula 2G

Según esta forma de realización, se hidroliza el anómero α que contiene enantiómeros tanto D como L. El resultado es la separación del anómero α hidrolizado que contiene enantiómeros tanto D como L del anómero β no hidrolizado que contiene enantiómeros tanto D como L.

Tras la hidrólisis, purificación y descarboxilación oxidativa, el anillo de dioxolano resultante puede unirse con una base de purina o pirimidina o análogo o derivado de la misma. Existen varios ejemplos conocidos por el experto en la materia de cómo unir una base de purina o pirimidina o análogo o derivado al anillo de dioxolano. Por ejemplo, la publicación PCT número WO/97/21706 por Mansour *et al.* describe un procedimiento de unión de manera estereoselectiva de la base de purina o pirimidina o análogo o derivado a un anillo de dioxolano. El documento WO/97/21706 se incorpora a la presente memoria en su totalidad como referencia.

Según el procedimiento dado a conocer en el documento WO/97/21706, el material de partida es un anillo de dioxolano acilado. El material de partida del procedimiento dado a conocer en el documento WO/97/21706 puede obtenerse mediante descarboxilación oxidativa de un producto del esquema 2 tratado anteriormente. La descarboxilación oxidativa destruye la estereoquímica del carbono C4 mientras conserva la estereoquímica del carbono C2.

Tal como se observa, la etapa de descarboxilación oxidativa se produce tras la etapa de hidrólisis del esquema 2. Se selecciona un compuesto que presenta la estereoquímica deseada en el carbono C2. Por cada mmol de compuesto que se procesa, se disuelve en entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 4,0 ml de acetonitrilo. En otra forma de realización, se añadieron entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 3,5 ml de acetonitrilo por cada mmol de compuesto. Aún en otra forma de realización, se añadieron entre aproximadamente 3,3 y aproximadamente 3,4 ml de acetonitrilo por cada mmol de compuesto.

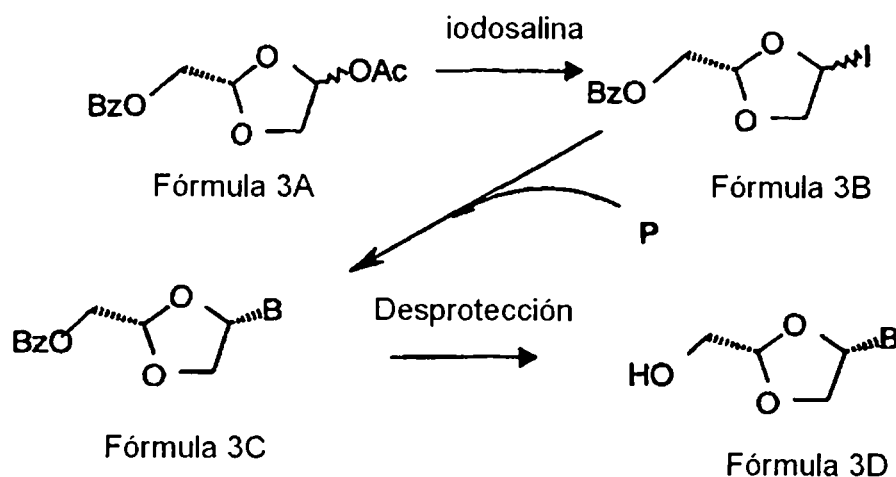
Por cada mmol de compuesto, se añadieron entre aproximadamente 0,08 y aproximadamente 0,12 ml de piridina. En otra forma de realización, se añadieron entre aproximadamente 0,09 y aproximadamente 0,11 ml de piridina por cada mmol de compuesto. Aún en otra forma de realización, se añadieron aproximadamente 0,1 ml de piridina por cada mmol de compuesto.

A esta mezcla, se añadieron entre 1,1 y 1,5 mmoles de $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ por cada mmol de compuesto. En otra forma de realización, se añaden entre aproximadamente 1,2 mmoles y aproximadamente 1,4 mmoles de $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ por cada mmol de compuesto. Aún en otra forma de realización, se añaden aproximadamente 1,3 mmoles de $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ por cada mmol de compuesto.

Después de eso, se agitó la mezcla durante 18 horas a temperatura ambiente. Entonces, se vertió la mezcla en una disolución saturada de NaHCO_3 . Se utilizaron entre aproximadamente 2,0 y 3,0 ml de NaHCO_3 por cada mmol de compuesto. En una forma de realización, se utilizaron entre aproximadamente 2,5 ml y aproximadamente 2,7 ml, y más preferentemente de manera aproximada 2,6 ml de NaHCO_3 por cada mmol de compuesto. Entonces se agitó la disolución durante unos 30 minutos adicionales. Se separó la fase orgánica de la fase acuosa mediante cuatro extracciones con acetato de etilo. Se combinaron los extractos, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporaron a vacío. Opcionalmente, el producto bruto puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía sobre gel de sílice utilizando un gradiente de acetato de etilo al 0-15% en hexano.

En una forma de realización de la presente invención, la etapa de descarboxilación oxidativa está seguida por glicosilación. La glicosilación está representada por el siguiente esquema 3.

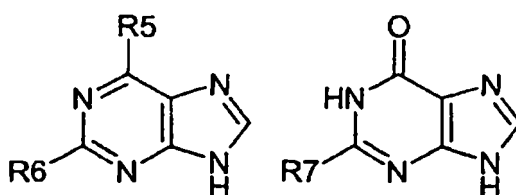
Esquema 3



La primera etapa en el procedimiento de glicosilación consiste en obtener un compuesto con la estereoespecificidad deseada en el carbono C2. Según una forma de realización, se prefiere un compuesto que presente una estereoquímica S en el carbono C2, tal como se representa por el compuesto de fórmula 3A. El resultado es que hay una razón superior del anómero β -L en el producto 3C. Según otra forma de realización, se prefiere un compuesto que presenta una estereoquímica R en el carbono C2. El resultado es un producto que presenta una razón superior del anómero β -D en el producto final.

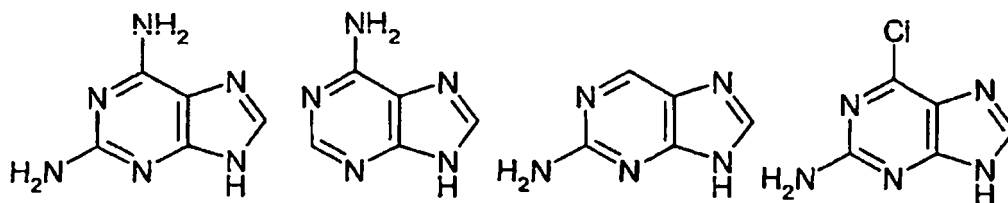
Se hace reaccionar el compuesto de fórmula 3A con un yodosilano para producir el compuesto de fórmula 3B. En una forma de realización, el yodosilano es yodotrimetilsilano.

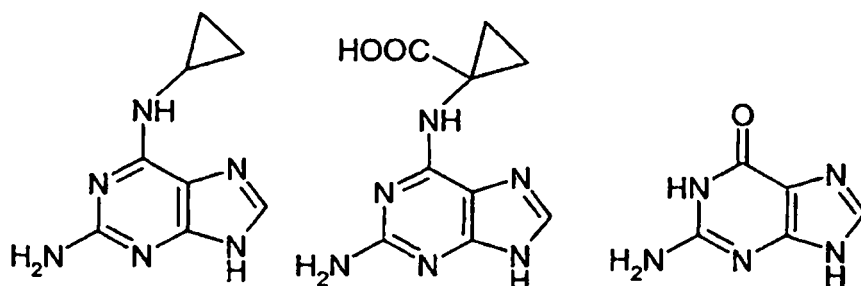
En otra forma de realización, el yodosilano es diyodosilano. Es importante para la reacción que se produzca a bajas temperaturas. Según una forma de realización, la temperatura está preferentemente entre 0°C y -78°C antes de la glicosilación con base de purina o pirimidina sililada o análogo o derivado de la misma. Según otra forma de realización, la temperatura está entre 0°C y -14.9°C antes de la glicosilación con base de purina o pirimidina sililada o análogo o derivado de la misma. Según todavía otra forma de realización, la temperatura está entre 0°C y -78°C antes de la glicosilación con base de purina sililada o análogo o derivado seleccionada de entre el grupo que comprende:



en el que R₅, R₆ y R₇ se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, bromo, cloro, flúor, yodo, amino, hidroxilo y cicloalquilamino C₃₋₆.

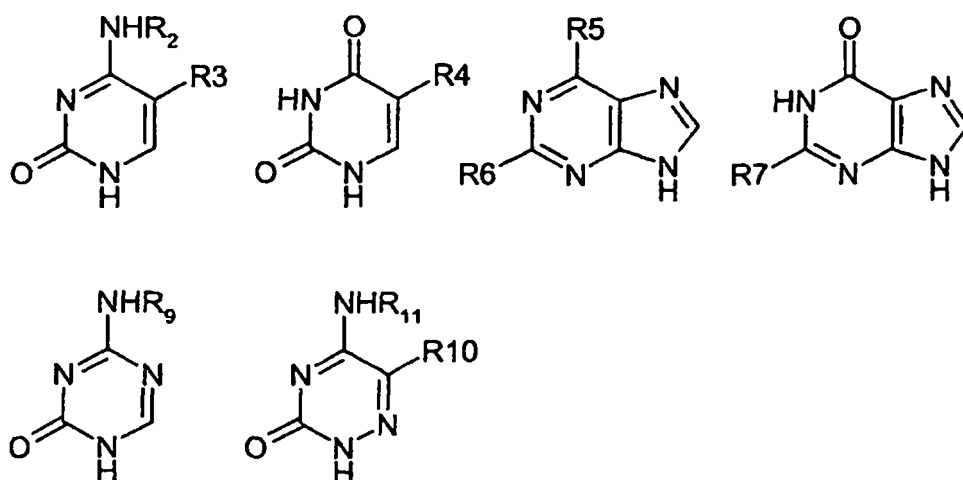
Según aún otra forma de realización, la temperatura está entre 0°C y -78°C antes de la glicosilación con base de purina sililada o análogo o derivado de la misma seleccionada de entre el grupo que comprende:





El producto intermedio de yodo representado por la fórmula 3B se disuelve entonces en diclorometano y se enfría hasta una temperatura comparable a la temperatura del recipiente de reacción.

Se selecciona entonces una base de purina o pirimidina o análogo o derivado de la misma. Según una forma de realización, la base de purina o pirimidina o análogo o derivado de la misma se selecciona de entre grupo siguiente:

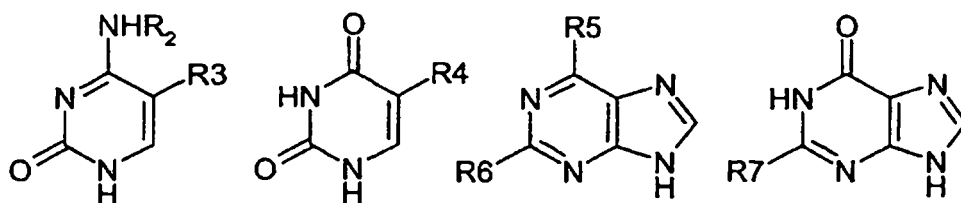


en el que R_2 , R_9 y R_{11} se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} , acilo C_{1-6} y $R_8C(O)$ en el que R_8 es hidrógeno o alquilo C_{1-6} ;

R_3 , R_4 y R_{10} se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} , bromo, cloro, flúor, yodo y CF_3 ; y

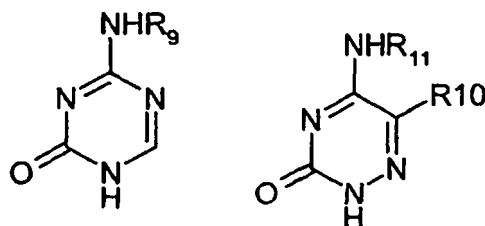
R_5 , R_6 y R_7 se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, bromo, cloro, flúor, yodo, amino, hidroxilo y cicloalquilamino C_{3-6} .

Según una forma de realización, la base de purina o pirimidina o derivado se selecciona de entre el grupo constituido por:



En esta forma de realización, R_2 se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} , acilo C_{1-6} y $R_8C(O)$ en el que R_8 es hidrógeno o alquilo C_{1-6} . Adicionalmente, R_3 y R_4 se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} , bromo, cloro, flúor, yodo y CF_3 ; y R_5 , R_6 y R_7 se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, bromo, cloro, flúor, yodo, amino, hidroxilo y cicloalquilamino C_{3-6} .

En otra forma de realización, la base de purina o pirimidina o análogo o derivado de la misma se selecciona de entre el grupo constituido por:



En esta forma de realización, R_9 y R_{11} se seleccionan independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} , acilo C_{1-6} y $R_8C(O)$. Adicionalmente, R_{10} se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} , bromo, cloro, flúor, yodo y CF_3 .

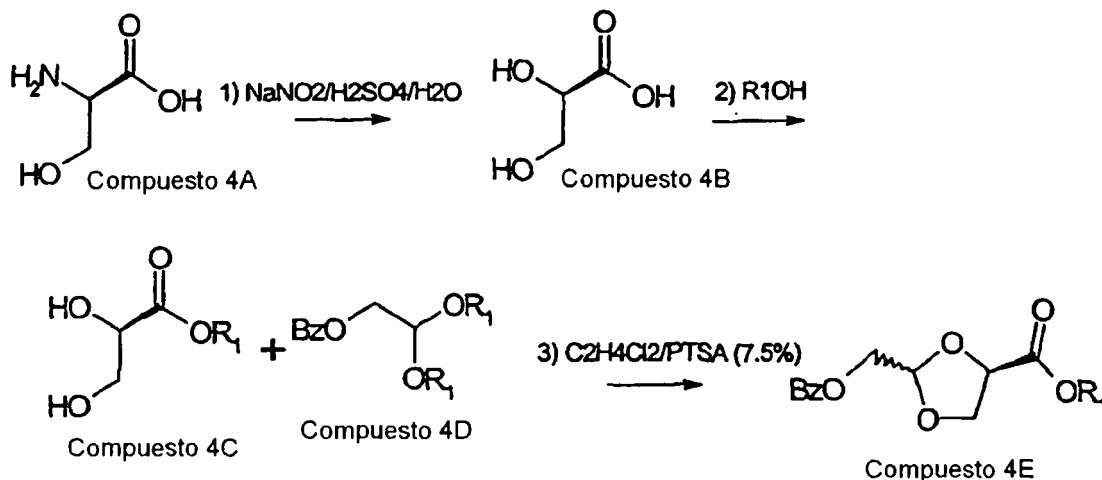
La purina o pirimidina o análogo o derivado de la misma se persila mediante un agente de silación y sulfato de amonio seguido de evaporación de HMDS para formar una base de purina o pirimidina persilada o análogo o derivado de la misma denominada a continuación en la presente memoria como base persilada y designada como P en el esquema 3. Según una forma de realización, el agente de silación se selecciona de entre el grupo constituido por 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano, triflato de trimetilsililo, triflato de t-butildimetilsililo o cloruro de trimetilsililo. En una forma de realización, el agente de silación es 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano.

Se disolvió la base P persilada en 30 ml de diclorometano y se añadió al producto intermedio de yodo representado por la fórmula 3B. Se mantuvo la mezcla de reacción a entre 0 y 78°C durante 1,5 horas, luego se vertió sobre bicarbonato de sodio acuoso y se extrajo con diclorometano (2 x 25 ml). Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio para obtener el compuesto de fórmula 3C. Tal como se utiliza en el esquema 3, B representa un resto de la base de purina o de pirimidina o análogo o derivado de la misma que se persiló en la etapa anterior para formar P. Se eliminó el compuesto de fórmula 3C mediante filtración y se evaporó el disolvente a vacío para producir una mezcla bruta. El producto representado por la fórmula 3C presenta de manera predominante una configuración 4S en el carbono C4 con una pureza anomérica del 80%. Cuando el material de partida es un compuesto representado por la fórmula 3A, el producto forma de manera predominante el enantiómero β -L que presenta una pureza anomérica del 80%.

A continuación, se desprotege el compuesto de fórmula 3C para producir el compuesto de fórmula 3D. Esto puede llevarse a cabo disolviendo un compuesto representado por la fórmula 3C en metanol y añadiendo después amoniaco o metóxido de sodio. También puede realizarse la etapa de desprotección mediante otros métodos que se conocen bien por el experto en la materia. Se purifica el producto representado por la fórmula 3D mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (MEOH al 5% en acetato de etilo). También puede realizarse la etapa de desprotección mediante otros métodos que se conocen bien por un experto en la materia.

En otra forma de realización, los compuestos del esquema 1 pueden prepararse mediante un procedimiento alternativo que se muestra a continuación en el esquema 4.

Esquema 4



ES 2 284 613 T3

Se añadieron entre aproximadamente 1,0-1,4 equivalentes de ácido sulfúrico en porciones a un gran exceso de agua mientras se agitaba a una temperatura entre 0-5°C. A título de ejemplo no limitativo, si 9,06 moles de D-serina representan 1 equivalente de reactivo, entonces se añaden entre aproximadamente 9,5-13,3 moles de ácido sulfúrico a 7,3 l de agua. En otra forma de realización, se añaden entre aproximadamente 1,1-1,3 equivalentes de ácido sulfúrico a un exceso de agua. En una forma de realización adicional, se añadieron 1,2 equivalentes de ácido sulfúrico a un exceso de agua.

Se añadieron aproximadamente 1 equivalente de D-serina a una porción con agitación vigorosa. Entonces, se añadieron gota a gota entre aproximadamente 1,0 y 1,4 equivalentes de nitrito de sodio acuoso. Se mantuvo la temperatura entre 0-5°C durante el tiempo de adición (aproximadamente siete horas). Se agitó el recipiente de reacción durante la noche a temperatura ambiente. Se eliminó el agua a vacío y se evaporó conjuntamente el residuo (ácido D-glicérico) con tolueno (3 X 1 l). Entonces, se agitó el residuo con aproximadamente 6 l de un disolvente de alcohol durante aproximadamente 30 minutos. Según una forma de realización, el alcohol es de fórmula R_1OH en la que R_1 es un alquilo C_{1-4} . Según otra forma de realización, el alcohol es metanol o etanol. Se eliminó el sólido resultante mediante filtración. Se agitó la disolución transparente a temperatura ambiente durante 30-40 horas, se eliminó el alcohol a vacío para promocionar un D-glicerato en forma de un jarabe viscoso amarillo. Entonces, se hace reaccionar el D-glicerato con entre aproximadamente 0,9-1,1 equivalentes de un alquilacetil a una temperatura de aproximadamente 85-95°C. Los ejemplos de diaquilacetales adecuados incluyen benzoiloxiacetaldehidodialquilo. Los ejemplos de alquilo adecuados para el dialquilacetil son el metilo y el etilo.

Entonces, se añade entre aproximadamente el 1% en peso y aproximadamente el 10% en peso de PTSA. Según otra forma de realización, se añade aproximadamente el 5% en peso de PTSA. En otra forma de realización, se añaden aproximadamente 0,02 equivalentes de PTSA sólido. Se mantiene la mezcla de reacción a vacío a una temperatura entre 85-95°C durante 2-3 horas. Entonces, se enfría la mezcla hasta temperatura ambiente, se diluye con acetato de etilo (250 ml) y se vierte sobre una disolución de bicarbonato de sodio saturada (250 ml) con agitación. Se separa la fase orgánica y se concentra la fase acuosa, se purifica sobre una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo al 5-10%/hexanos para proporcionar el dioxolano deseado como un aceite amarillo claro (aproximadamente el 59%) con una razón β/α de 2:1 o superior.

Alternativamente, pueden sustituirse los reactivos de la etapa 3 del esquema 4 por los reactivos correspondientes del esquema 1. Por ejemplo, el D-glicerato representado por la fórmula 4C se sustituye por un 2,2-dimetilalquil éster del ácido 1,3-dioxolano-4-(4R)carboxílico representado por la fórmula 1B según una forma de realización. Adicional o alternativamente, el dialquilacetil representado por la fórmula 4D se sustituye por un benzoiloxialdehído representado por la fórmula 1A. Estas sustituciones no requieren cambiar las condiciones de la reacción dadas a conocer de manera sustancial anteriormente para la tercera etapa del esquema 4.

En una forma de realización adicional de la presente invención, el material de partida del esquema 4 es la L-serina que produce un producto final que presenta una configuración S en el carbono C4 del anillo de dioxolano. Alternativamente, el L-glicerato de la etapa 3 puede sustituirse por un 2,2-dimetilalquil éster del ácido 1,3-dioxolano-4-(4S)carboxílico para producir un producto final que presenta de manera predominante una configuración en el carbono C4 del anillo de dioxolano resultante.

Ejemplo 1

Resolución hidrolítica catalizada con enzima de dioxolano metil éster utilizando Savinase®

Se pesó una mezcla anomérica (β/α) 2:1 del 1,3-dioxolano metil éster del ácido (2-(S)-benzoiloximetil)-4-carboxílico (20 g, 75,2 mmol) en un recipiente de reacción y se disolvió con 40 ml de acetonitrilo. Se añadieron 160 ml de tampón fosfato pH 7,2 para formar una suspensión. Se añadió Savinase® (5 ml) para comenzar la reacción y se monitorizaron la velocidad y el grado de hidrólisis mediante análisis por HPLC con una columna ChiraCel OD o con un pH-estado que mantenía el pH a 7 mediante una valoración automática con NaOH 1 M. Se terminó la reacción cuando la pureza anomérica del éster restante alcanzó el 98% (aproximadamente 8 horas). Después de que el pH de la mezcla de reacción se ajustase hasta pH 7,5 con NaOH 1 M, se extrajo el éster del material de partida restante con acetato de etilo (3 x 80 ml). Se ajustó la fase acuosa hasta pH 6,0 y se extrajo el ácido del producto.

Se secaron ambos extractos con $MgSO_4$, se filtraron y se concentraron al vacío. Mediante este procedimiento, se obtuvo el (1,3-dioxolanometil éster del ácido (2-(S)-benzoiloximetil)-4-(S)-carboxílico) con una pureza anomérica superior al 98%.

Ejemplo 2

Pureza del anómero β mediante RMN

Se realizaron los análisis en un espectrómetro Varian Gemini 200 MHz en $CDCl_3$. El éster α muestra un triplete a 5,33 ($^3J = 4,6$ Hz) y el éster β muestra un triplete a campo alto a 5,23 ($^3J = 4,6$ Hz). El ácido α muestra un triplete a 5,33 ($^3J = 3,6$ Hz), mientras que el ácido β muestra un singlete ancho a campo alto 5,19. No se observó ninguna epimerización del sustrato o del ácido del producto durante el tratamiento final. Mediante análisis por RMN, se determina que la pureza del anómero β presenta una pureza anomérica del 98%.

ES 2 284 613 T3

Ejemplo 3

Pureza del anómero α

- 5 Se obtiene el ácido del producto del ejemplo 1 tras secarse con MgSO_4 , filtrarse y concentrarse a vacío. Éste se analiza para determinar la pureza mediante RMN. Se aísla el anómero α con una pureza anomérica alta.

Ejemplo 4

- 10 *Resolución enzimática del anómero β con Alcalase®*

Se siguieron los procedimientos de los ejemplos 1-2 utilizando Alcalase® como la enzima para separar una mezcla anomérica ($\beta:\alpha$) 2:1 de 1,3-dioxolanometil éster del ácido (2-(S)-benzoiloximetil)-4-carboxílico. El resultado es un anómero β que presenta una pureza anomérica alta.

- 15 Ejemplo 5

Resolución enzimática de anómero α con Alcalase®

- 20 Se obtiene el ácido del producto del ejemplo 4 tras secarse con MgSO_4 , filtrarse y concentrarse a vacío. Se aísla el anómero α con pureza anomérica alta.

Ejemplo 6

- 25 *Resolución enzimática del anómero β con ChiroCLEC™-BL*

Se siguieron los procedimientos de los ejemplos 1-2 utilizando ChiroCLEC™-BL como la enzima para separar una mezcla anomérica ($\beta:\alpha$) 2:1 de (1,3-dioxolanometil éster del ácido (2-(S)-benzoiloximetil)-4-carboxílico). El resultado es un anómero β que presenta una pureza anomérica alta.

- 30 Ejemplo 7

Resolución enzimática del anómero α con ChiroCLEC™-BL

- 35 Se obtiene el ácido del producto del ejemplo 6 tras secarse con MgSO_4 , filtrarse y concentrarse a vacío. Se aísla el anómero α con pureza anomérica alta.

Ejemplo 8

- 40 *Resolución enzimática del anómero β con PS-30*

Se siguieron los procedimientos de los ejemplos 1-2 utilizando PS-30 como la enzima para separar una mezcla anomérica ($\beta:\alpha$) 2:1 del 1,3-dioxolanometil éster del ácido (2-(S)-benzoiloximetil)-4-carboxílico. El resultado es un anómero β que presenta una pureza anomérica alta.

- 45 Ejemplo 9

Resolución enzimática del anómero α con PS-30

- 50 Se obtuvo el ácido del producto del ejemplo 8 tras secarse con MgSO_4 , filtrarse y concentrarse a vacío. Se aísla el anómero α con pureza anomérica alta.

Ejemplo 10

- 55 *Resolución enzimática del anómero β con ChiroCLEC™-PC*

Se siguieron los procedimientos de los ejemplos 1-2 utilizando ChiroCLEC™-PC como la enzima para separar una mezcla anomérica ($\beta:\alpha$) 2:1 de (1,3-dioxolanometil éster del ácido (2-(S)-benzoiloximetil)-4-carboxílico). El resultado es un anómero β que presenta pureza anomérica alta.

- 60 Ejemplo 11

Resolución enzimática del anómero α con ChiroCLEC™-PC

- 65 Se obtiene el ácido del producto del ejemplo 10 tras secarse con MgSO_4 , filtrarse y concentrarse a vacío. Se aísla el anómero α con pureza anomérica alta.

Ejemplo 12

Resolución enzimática del anómero β con Protease N

Se siguieron los procedimientos de los ejemplos 1-2 utilizando Protease N como la enzima para separar una mezcla anomérica ($\beta:\alpha$) 2:1 de (1,3-dioxolanometil éster del ácido (2-(S)-benzoiloximetil)-4-carboxílico). El resultado es un anómero β que presenta pureza anomérica alta.

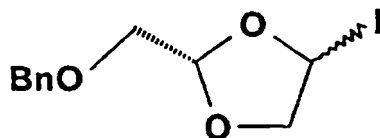
Ejemplo 13

Resolución enzimática del anómero α con Protease N

Se obtiene el ácido del producto del ejemplo 12 tras secarse con MgSO_4 , filtrarse y concentrarse a vacío. Se aísla el anómero α con pureza anomérica alta.

Ejemplo 14

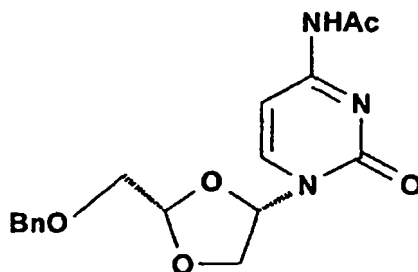
Preparación de 2-(S)-benzoiloximetil-4-(R)-yodo-1,3-dioxolano y 2-(S)-benzoiloximetil-4-(S)-yodo-1,3-dioxolano (compuesto 14)

**Compuesto 14**

Se secó una mezcla constituida por 2S-benzoiloximetil-4S-acetoxi-1,3-dioxolano y 2S-benzoiloximetil-4R-acetoxi-1,3-dioxolano en razón 1:2 (6 g; 23,8 mMol) mediante destilación azeotrópica con tolueno a vacío. Tras la eliminación del tolueno, se disolvió el aceite residual en diclorometano (60 ml) seco y se añadió yodotrimetilsilano (3,55 m; 1,05 equivalentes) a -78°C , con agitación vigorosa. Se eliminó el baño de hielo seco/acetona tras la adición y se dejó calentar la mezcla hasta temperatura ambiente (15 min.). El producto era 2S-benzoiloximetil-4R-yodo-1,3-dioxolano y 2S-benzoiloximetil-4S-yodo-1,3-dioxolano.

Resultará evidente para un experto en la materia que si se eligió la mezcla de partida entonces consistía en 2R-benzoiloximetil-4S-acetoxi-1,3-dioxolano y 2R-benzoiloximetil-4R-acetoxi-1,3-dioxolano. El producto resultante es 2R-benzoiloximetil-4R-yodo-1,3-dioxolano y 2R-benzoiloximetil-4S-yodo-1,3-dioxolano. Además, el material de partida que presenta un grupo sustituyente de benzoílo en lugar de un bencilo daría como resultado un producto que presenta un sustituyente de benzoílo y no un bencilo.

Ejemplo 15

Síntesis de 2-(S)-benzoiloximetil-1,3-dioxolan-4-(S-il)-2-oxo-4-aminoacetil-pirimidina (compuesto 15)**Compuesto 15**

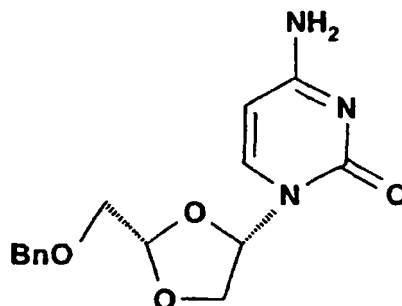
Se enfrió hasta -78°C el producto intermedio de yodo preparado previamente (compuesto 14) en diclorometano. Se disolvió N-acetil citosina persilada (1,1 equivalente) formada por reflujo en 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS) y sulfato de amonio seguido por evaporación de HMDS en 30 ml de diclorometano y se añadió al producto intermedio de yodo. Se mantuvo la mezcla de reacción a -78°C durante 1,5 horas y se vertió entonces sobre bicarbonato de sodio acuoso y se extrajo con diclorometano (2 x 25 ml). Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se eliminó el sólido por filtración y se evaporó el disolvente a vacío para producir 8,1 g de una mezcla bruta. Se formaron β -L-4'-bencil-2'-desoxi-3'-oxacitidina y su isómero α -L en una razón de 5:1 respectivamente. Se separó la mezcla bruta mediante

ES 2 284 613 T3

cromatografía sobre gel de sílice (metanol al 5% en acetato de etilo) para generar el isómero β -L (β) puro (4,48 g). Alternativamente, la recristalización de la mezcla con etanol produce 4,92 g de isómero β puro y 3,18 g de una mezcla de isómeros β y α en una razón de 1:1.

5 Ejemplo 16

2-(S)-benzoiloximetil-1,3-dioxolan-4-(S)-il)-2-oxo-4-amino-pirimidina (compuesto 16)

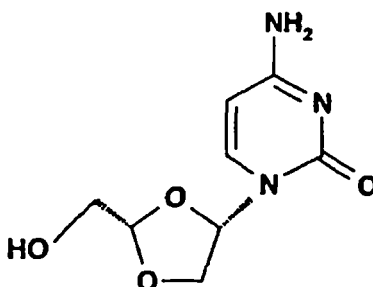


Compuesto 16

Se suspendió el isómero β -L (4,4 g) (compuesto 15) en amoníaco metanólico saturado (250 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas en un recipiente cerrado. Se eliminaron entonces los disolventes a vacío para proporcionar el nucleósido desacetilado en forma pura.

Ejemplo 17

2-(S)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-(S)-il)-2-oxo-4-amino-pirimidina (compuesto 17)



Compuesto 17

Se disolvió β -L-4'-bencil-2'-desoxi-3'-oxacitidina (compuesto 16) en EtOH (200 ml) seguido por la adición de ciclohexeno (6 ml) y óxido de paladio (0,8 g). Se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 7 horas y se enfrió y se filtró entonces para eliminar los sólidos. Se eliminaron los disolventes del filtrado mediante destilación a vacío. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía sobre gel de sílice (MeOH al 5% en EtOAc) para dar un sólido blanco (2,33 g; rendimiento global del 86%). $\alpha_D^{22} = -46,7^\circ$ ($c = 0,285$; MeOH) p.f. = 192 - 194°C.

Los ejemplos siguientes 18-20 ilustran un procedimiento de preparación del material de partida del ejemplo 1 (1,3-dioxolanometil éster del ácido (2-(S)-benzoiloximetil-4-carboxílico).

55 Ejemplo 18

Preparación de ácido D-glicérico (compuesto 18)



Compuesto 18

Se añadieron porciones de ácido sulfúrico (297 ml; 11,14 mol; 1,23 equivalentes) a un gran exceso de agua (7.300 ml) con agitación y refrigeración (0-5°C). Se añadió D-serina (952 g; 9,06 mol; 1 equivalente) en una porción con agitación vigorosa, seguido por la adición gota a gota de nitrito de sodio acuoso (769 g; 11,14 mol; 1,23 equivalentes en 3.060 ml de agua). Se mantuvo la temperatura entre 0-5°C durante el tiempo de adición (siete horas). Se agitó el recipiente de reacción durante la noche a temperatura ambiente y se monitorizó la reacción mediante TLC (ninhidrina). Con el fin de completar la reacción, se añadieron ácido sulfúrico (115 ml; 4,31 mol; 0,47 equivalentes) y nitrito de sodio acuoso (255 g; 3,69 mol; 0,4 equivalentes en 1.100 ml de agua) acuosos, manteniendo la temperatura del recipiente de reacción entre 0-5°C. Se mantuvo entonces el recipiente de reacción con agitación a temperatura ambiente durante otras 18 horas. Se burbujeó nitrógeno a través de la disolución durante una hora y se eliminó el agua mediante vacío, manteniendo la temperatura del recipiente de reacción entre 28-30°C. Se evaporó conjuntamente el residuo (ácido D-glicérico) con tolueno (2 x 1 l).

Ejemplo 19

Preparación de D-glicerato de metilo (compuesto 19)

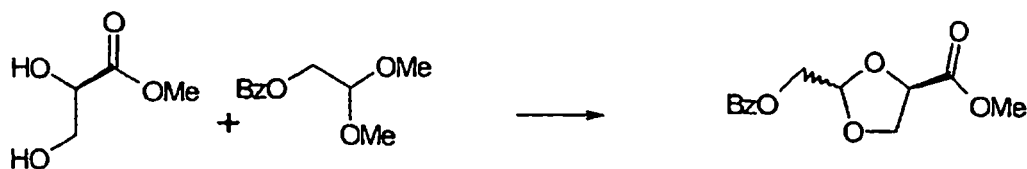


Compuesto 19

Se agitó ácido D-glicérico con metanol (6 l) durante 30 minutos y se eliminó el sólido mediante filtración. Se agitó la disolución transparente a temperatura ambiente durante 35-38 horas y se monitorizó la reacción mediante TLC (DCM/MeOH 8:2 Rf=0,63). Se eliminó el metanol mediante vacío para dar un jarabe viscoso amarillo (1.100 g).

Ejemplo 20

Preparación de 2-(R,S)-benzoiloximetil-4R-metilcarboxilato-1,3-dioxolano (compuesto 20)



Compuesto 20

Se calentó hasta 90°C una mezcla de dimetil acetal de benzoiloxiacetaldehído (146 g, 95%, 0,66 moles, 1 equivalente) y D-glicerato de metilo (99 g, 0,82 moles, 1,25 equivalentes), seguido por la adición de PTSA (2,75 g, 0,145 moles, 0,022 equivalentes). Se mantuvo la mezcla de reacción a vacío (aspirador de agua) a 90-95°C durante 2,5 horas (TLC, hexanos/acetato de etilo 1:1, Rf=0,47). Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (250 ml) y se vertió sobre disolución de NaHCO₃ saturada (250 ml) con agitación. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa una vez con acetato de etilo (150 ml). Se concentró la fase orgánica combinada y se purificó sobre una columna de gel de sílice eluyendo con hexanos/acetato de etilo al 5-10% para proporcionar 112,4 g del producto deseado como un aceite amarillo claro (59%) con una razón β/α de 2,1:1. El anómero β del compuesto 20 puede separarse entonces del anómero α del compuesto 20 según los ejemplos 1-3, 4-5, 6-7, 8-9, 10-11, ó 12-13.

Ejemplo 21

Preparación de ácido β -2-(R)-benzoiloximetil-1,3-dioxolano-4-(R)-carboxílico (compuesto 21)



Compuesto 21

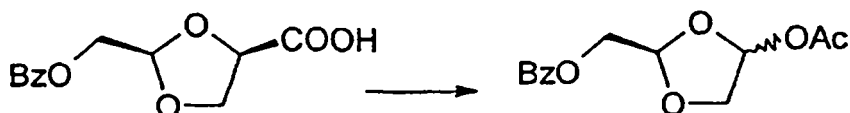
Se disuelve β -2-(R)-benzoiloximetil-1,3-dioxolano-4-(R)-metilcarboxilato-1,3-dioxolano (15,327 g; 57,57 mmol) en THF (60 ml), se añadió entonces agua (15 ml) con agitación. Se ajustó la temperatura interna hasta 20°C. Entonces,

ES 2 284 613 T3

se añadió gota a gota una disolución de LiOH (2,41 g; 57,57 mmol) en agua (15 ml) durante 7 minutos. Se agitó la mezcla de reacción a 22°C durante unos 40 minutos adicionales. Se eliminó el THF a vacío, y se diluyó el residuo con agua (70 ml). Se extrajo la disolución resultante con diclorometano (2 x 35 ml). Se acidificó la fase acuosa con H₂SO₄ al 30% (9,5 ml) con un control estrecho mediante pH-metro (pH inicial: de 8,36 a 3,02) y se extrajo entonces con DCM (4 X 60 ml). Se combinaron las fases orgánicas y se eliminó el disolvente a vacío para dar un jarabe verde claro (14,26 g) que se mantuvo con agitación durante la noche.

Ejemplo 22

Preparación de β-2-(R)-benzoiloximetil-4-(R,S)-metilcarboxilato-1,3-dioxolano (compuesto 22)



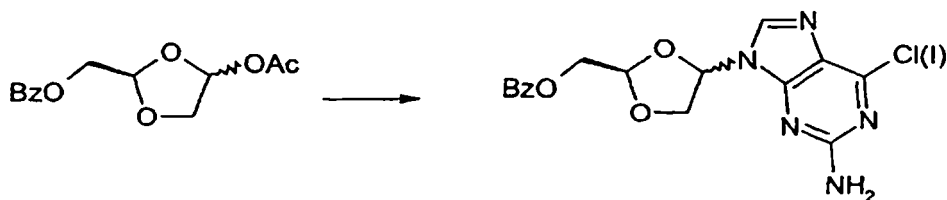
Compuesto 22

Se añadió tetraacetato de plomo (944, 8 g; 2,024 moles; 1,2 equivalentes) en porciones a una disolución de acetonitrilo (6,8 l) del ácido (425,5 g; -1,687 moles; 1,0 equivalentes) y piridina (193 ml) en un baño de hielo. Se dejó calentar el recipiente de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó. Se comprobó la reacción mediante TLC (hexanos:acetato de etilo 6:4). Se filtró a través de una almohadilla pequeña de celite (aproximadamente 1 pulgada). Entonces, se vertió el filtrado sobre 5 l de disolución de bicarbonato de sodio acuosa saturada (la mezcla de reacción se volvió marrón), y se ajustó el pH hasta 8 mediante la adición de bicarbonato de sodio sólido. Se filtró de nuevo el filtrado a través de una almohadilla pequeña de celite (aproximadamente 1 pulgada) para eliminar las sales de plomo negras para proporcionar una mezcla amarilla pálida. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (4 x 2 l). Se concentró la fase orgánica combinada, y se evaporó conjuntamente el aceite obtenido con tolueno (3 x 2 l) para dar un jarabe marrón.

Se purificó adicionalmente este jarabe (374 g) mediante filtración a través de una almohadilla pequeña de gel de sílice (1 g de producto bruto; 2 g de sílice), eluyendo con 3,5 l de la mezcla de disolventes (acetato de etilo:hexanos 8:2) para dar 332,3 g (74%) del producto puro. Esta última etapa de filtración es opcional.

Ejemplo 23

Preparación de 9-(2-(R)-benzoiloximetil-1,3-dioxolan-4-il)-6-cloro-2-aminopurina (Compuesto 23a) y 9-(2-(R)-benzoiloximetil-1,3-dioxolan-4-il)-6-yodo-2-aminopurina (Compuesto 23b)



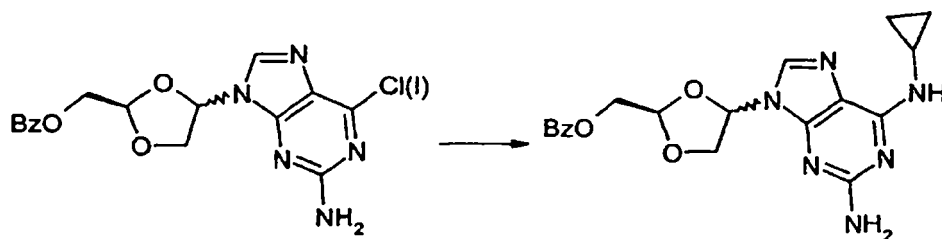
Compuesto 23a(b)

Se añadió TMSI (28,2 ml; 198,12 moles equivalentes) gota a gota a una disolución de diclorometano (750 ml) del azúcar (2-(R)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano) (52,75 g; 198,12 mmol; 1 equivalente) a -15°C. Tras 2,5 horas a -15°C, se añadió 2-amino-6-cloropurina sililada (62 g; 198 mmol; 1 equivalente) a la mezcla de reacción como un sólido. Se continuó la agitación a la misma temperatura durante otras 2,5 horas. Se dejó calentar la mezcla de reacción lentamente hasta temperatura ambiente seguido por agitación continuada durante 40 horas a temperatura ambiente. Entonces, se vertió la mezcla de reacción sobre una disolución de NaHCO₃ acuosa (1 l). Se agitó durante 20 min. con Na₂S₂O₃ y se filtró a través de una almohadilla pequeña de celite. Entonces, se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con diclorometano (1 X 200 ml). Se concentraron las fases orgánicas combinadas para conseguir 87 g del producto bruto. La purificación en columna del producto bruto sobre gel de sílice (450 g), eluyendo con acetato de etilo/hexano (6:4) dio 67,7 g (81%; mezcla de cloro/yodo 1:1) del producto acoplado con una razón β/α de 2,3:1.

Alternativamente, si el producto final deseado es el mismo compuesto pero con estereoquímica opuesta (es decir, una mezcla 2:1 de los estereoisómeros β:α en la configuración L), se sigue el procedimiento analizado anteriormente. Sin embargo, se sustituye el azúcar 2-(R)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano por 2-(S)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano.

Ejemplo 24

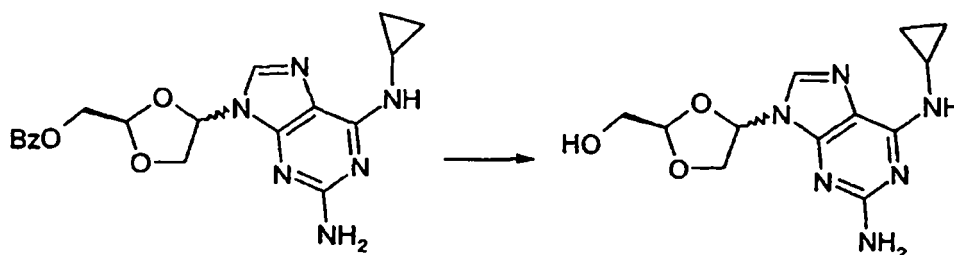
Preparación de 9-(2-(R)-benzoiloximetil-1,3-dioxolan-4-il)-6-(N-ciclopropil)amino-2-aminopurina (Compuesto 24)

**Compuesto 24**

Se sometió a reflujo una disolución del material de partida (compuesto 23; 6,3 g; 14,95 mmol; 1 equivalente; P.F. promedio = 421,52; Cl:I/1:1) en etanol (100 ml) a 75-80°C con ciclopropilamina (3,1 ml; 44,84 mmol; 3 equivalentes) durante 20 horas y se enfrió hasta temperatura ambiente. Se concentró la mezcla de reacción, se disolvió en diclorometano (25 ml) y se vertió sobre disolución de bicarbonato de sodio acuosa saturada. Tras 10 minutos de agitación, se separó la fase orgánica, y se extrajo la fase acuosa con diclorometano (2 X 15 ml). Entonces, se concentró la fase orgánica combinada para conseguir un rendimiento cuantitativo del producto bruto, que se purificó entonces mediante cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo:MeOH 98,5:2,5 y 95:5) para dar 5,3 g (89%) del producto como una mezcla de β/α .

Ejemplo 25

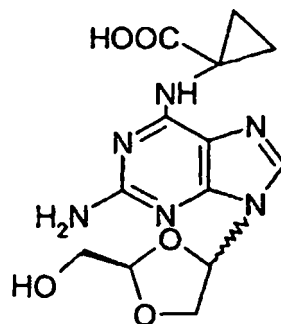
Preparación de 9-(2-(R)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-6-(N-ciclopropil)amino-2-aminopurina (compuesto 25)

**Compuesto 25**

Se agitó el material de partida (compuesto 24; 3,3 g) con amoníaco en MeOH (80 ml; 2 M) durante 20 horas. Se burbujó nitrógeno a través de la mezcla de reacción para eliminar el amoníaco en exceso. Entonces, se concentró la disolución para proporcionar el producto bruto como una mezcla de β/α ($\beta/\alpha = 2,3:1$). Se separaron los isómeros β/α mediante cromatografía sobre gel de sílice utilizando DCM/MeOH como eluyente para proporcionar 1,18 g (70% del isómero β).

Ejemplo 26

Preparación de 9-(2-(R)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-6-(N-2-ciclopropil-2-aminometoxil)-2-aminopurina (compuesto 26)

**Compuesto 26**

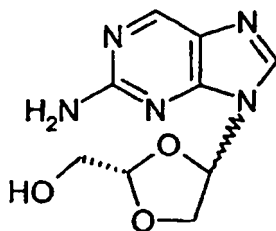
Se agitó a temperatura ambiente durante 18 h una disolución de (2R)-2-benzoiloximetil-4-(2'-amino-6'-ciclopropilamino-purina-9'-il)-1,3-dioxolano (480 mg) en 30 ml de amoníaco metanólico saturado. Se evaporó la mezcla hasta

sequedad a vacío. Se disolvió el residuo en 20 ml de agua, se lavó dos veces con 10 ml de cloruro de metileno y se liofilizó para proporcionar 283 mg de sólido blanco con un rendimiento del 80%. El producto resultante presentaba una mezcla de anómeros $\beta:\alpha$ que presentaba una razón de aproximadamente 2:1.

Alternativamente, si el producto final deseado es el mismo compuesto pero con estereoquímica opuesta (es decir, una mezcla 2:1 de los estereoisómeros $\beta:\alpha$ en la configuración L), se sigue el procedimiento analizado anteriormente. Sin embargo, cuando se siguen las etapas del ejemplo 23, se sustituye el azúcar 2-(R)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano por 2-(S)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano.

Ejemplo 27

Preparación de 9-(2-(S)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-2-aminopurina (compuesto 27)



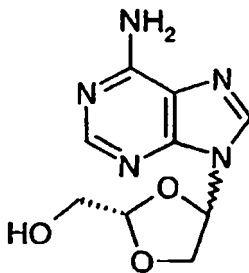
Compuesto 27

Se realizó el procedimiento del ejemplo 23. A continuación, se sometieron 6,3 g del compuesto 23 a condiciones de hidrogenación en 50 psi de hidrógeno sobre Pd/c al 10% en 300 ml de etanol que contenía 100 ml de trietilamina. Tras 3 horas de agitación, se eliminó el catalizador por filtración. Entonces, se evaporó el disolvente para proporcionar un sólido que se recrystalizó con etanol-éter para proporcionar aproximadamente 4 g del compuesto 27 que presentaba aproximadamente una mezcla 2:1 de estereoisómeros $\beta:\alpha$ en la configuración L.

Alternativamente, si el producto final deseado es el mismo compuesto pero con estereoquímica opuesta (es decir, aproximadamente una mezcla 2:1 de los estereoisómeros $\beta:\alpha$ en la configuración D), se sigue el procedimiento analizado anteriormente. Sin embargo, cuando se siguen las etapas del ejemplo 23, se sustituye el azúcar 2-(S)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano por 2-(R)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano.

Ejemplo 28

Preparación de 9-(2-(S)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-6-aminopurina (compuesto 28)



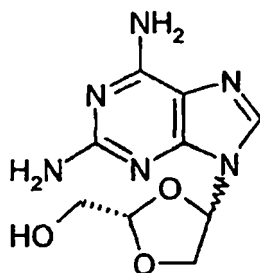
Compuesto 28

Se realizaron los procedimientos expuestos en los ejemplos 23 y 24. Sin embargo, cuando se siguen las etapas del ejemplo 23, se sustituye 1 equivalente de la 2-amino-6-cloropurina sililada por 1 equivalente de 6-aminopurina sililada. El resultado es un rendimiento de 9-(2-(S)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-6-aminopurina que presenta una razón $\beta:\alpha$ de aproximadamente 2:1.

Alternativamente, si el producto final deseado es el mismo compuesto pero con estereoquímica opuesta (es decir, una mezcla 2:1 de los estereoisómeros $\beta:\alpha$ en la configuración D), se sigue el procedimiento analizado anteriormente. Sin embargo, cuando se siguen las etapas del ejemplo 23, se sustituye el azúcar 2-(S)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano por 2-(R)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano.

Ejemplo 29

Preparación de 9-(2-(S)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-6,2-diaminopurina (compuesto 29)



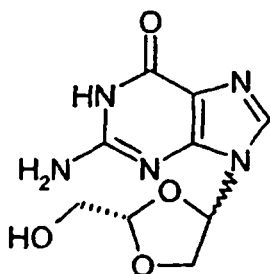
Compuesto 29

Se realizó el procedimiento del ejemplo 23. A continuación, se disolvieron 6 g del compuesto 23 en 0,9 l de metanol saturado a 0°C con amoníaco seco y se calienta la disolución en una bomba de acero hasta de 105°C a 110°C durante 16 horas. Se evaporó la disolución hasta sequedad y se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice utilizando cloroformo-metanol (4:1) como el eluyente para proporcionar aproximadamente 3 g del compuesto 29 bruto. El producto puede recrystalizarse con metanol-éter para proporcionar el compuesto 29 purificado que presenta una razón $\beta:\alpha$ de aproximadamente 2:1.

Alternativamente, si el producto final deseado es el mismo compuesto pero con estereoquímica opuesta (es decir, una mezcla 2:1 de los estereoisómeros $\beta:\alpha$ en la configuración D), se sigue el procedimiento analizado anteriormente. Sin embargo, cuando se siguen las etapas del ejemplo 23, se sustituye el azúcar 2-(S)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano por 2-(R)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano.

Ejemplo 30

Preparación de 9-(2-(S)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-6-oxo-2-aminopurina (compuesto 30)



Compuesto 30

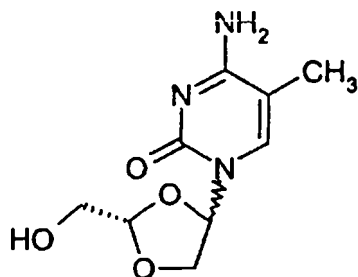
Se realizó el procedimiento del ejemplo 23. A continuación, se disolvieron aproximadamente 6 g del compuesto 23 en una mezcla de 200 ml de metanol, 50 ml de agua y 10 g de NaOH.

Se calentó la disolución a reflujo durante 5 horas, tiempo tras el que se diluyó con 300 ml de agua y resina de sulfonato de piridinio en exceso. Se filtró la suspensión, se lavó la resina con agua y se evaporaron los filtrados acuosos combinados hasta sequedad a vacío para dejar un residuo que se tomó en metanol acuoso al 50%. Se trató la disolución con carbón vegetal activado, se filtró y se evaporó el filtrado hasta sequedad a vacío para proporcionar un residuo sólido que se recrystalizó con etanol y agua para proporcionar el compuesto 30 puro que presentaba una razón $\beta:\alpha$ de aproximadamente 2:1.

Alternativamente, si el producto final deseado es el mismo compuesto pero con estereoquímica opuesta (es decir, una mezcla 2:1 de los estereoisómeros $\beta:\alpha$ en la configuración D), se sigue el procedimiento analizado anteriormente. Sin embargo, cuando se siguen las etapas del ejemplo 23, se sustituye el azúcar 2-(S)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano por 2-(R)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano.

Ejemplo 31

Preparación de 9-(2-(S)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-2-oxo-4-amino-5-metilpirimidina (compuesto 31)



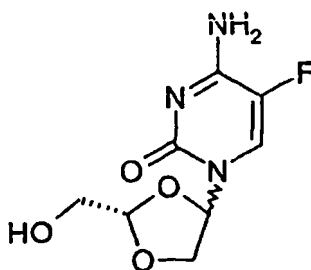
Compuesto 31

Se realizó el procedimiento del ejemplo 23 seguido por el procedimiento del ejemplo 25. Sin embargo, cuando se siguen las etapas del ejemplo 23, se sustituye 1 equivalente de 2-amino-6-cloropurina silada por 1 equivalente de 2-oxo-4-amino-5-metilpirimidina silada. El resultado es un rendimiento de 9-(2-(S)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-2-oxo-4-amino-5-metilpirimidina que presenta una razón $\beta:\alpha$ de aproximadamente 2:1.

Alternativamente, si el producto final deseado es el mismo compuesto pero con estereoquímica opuesta (es decir, una mezcla 2:1 de los estereoisómeros $\beta:\alpha$ en la configuración D), se sigue el procedimiento analizado anteriormente. Sin embargo, cuando se siguen las etapas del ejemplo 23, se sustituye el azúcar 2-(S)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano por 2-(R)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano.

Ejemplo 32

Preparación de 9-(2-(S)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-2-oxo-4-amino-5-fluoropirimidina (compuesto 32)



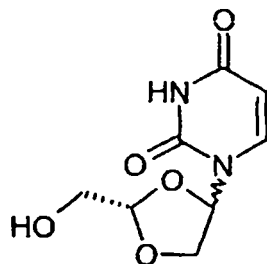
Compuesto 32

Se realizó el procedimiento del ejemplo 23 seguido por el procedimiento del ejemplo 25. Sin embargo, cuando se siguen las etapas del ejemplo 23, se sustituye 1 equivalente de 2-amino-6-cloropurina silada por 1 equivalente de 2-oxo-4-amino-5-fluoropirimidina silada. El resultado es un rendimiento de 9-(2-(S)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-2-oxo-4-amino-5-fluoropirimidina que presenta una razón $\beta:\alpha$ de aproximadamente 2:1.

Alternativamente, si el producto final deseado es el mismo compuesto pero con estereoquímica opuesta (es decir, una mezcla 2:1 de los estereoisómeros $\beta:\alpha$ en la configuración D), se sigue el procedimiento analizado anteriormente. Sin embargo, cuando se siguen las etapas del ejemplo 23, se sustituye el azúcar 2-(S)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano por 2-(R)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano.

Ejemplo 33

Preparación de 9-(2-(S)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-2,4-dioxo pirimidina (compuesto 33)



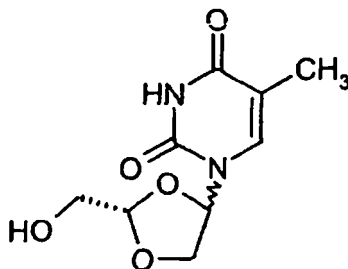
Compuesto 33

Se realizó el procedimiento del ejemplo 23 seguido por el procedimiento del ejemplo 25. Sin embargo, cuando se siguen las etapas del ejemplo 23, se sustituye 1 equivalente de 2-amino-6-cloropurina silada por 1 equivalente de 2,4-dioxopirimidina silada. El resultado es un rendimiento de 9-(2-(S)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-2,4-dioxopirimidina que presenta una razón $\beta:\alpha$ de aproximadamente 2:1.

Alternativamente, si el producto final deseado es el mismo compuesto pero con estereoquímica opuesta (es decir, una mezcla 2:1 de los estereoisómeros $\beta:\alpha$ en la configuración D), se sigue el procedimiento analizado anteriormente. Sin embargo, cuando se siguen las etapas del ejemplo 23, se sustituye el azúcar 2-(S)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano por 2-(R)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano.

Ejemplo 34

Preparación de 9-(2-(S)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-2,4-dioxo-5-metilpirimidina (compuesto 34)



Ejemplo 34

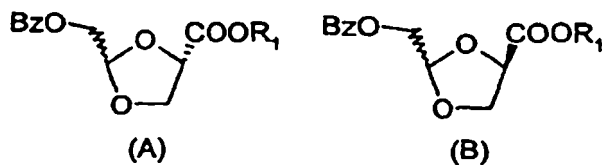
Se realizó el procedimiento del ejemplo 23 seguido por el procedimiento del ejemplo 25. Sin embargo, cuando se siguen las etapas del ejemplo 23, se sustituye 1 equivalente de 2-amino-6-cloropurina silada por 1 equivalente de 2,4-dioxo-5-metilpirimidina silada. El resultado es un rendimiento de 9-(2-(S)-hidroximetil-1,3-dioxolan-4-il)-2,4-dioxo-5-metilpirimidina que presenta una razón $\beta:\alpha$ de aproximadamente 2:1.

Alternativamente, si el producto final deseado es el mismo compuesto pero con estereoquímica opuesta (es decir, una mezcla 2:1 de los estereoisómeros $\beta:\alpha$ en la configuración D), se sigue el procedimiento analizado anteriormente. Sin embargo, cuando se siguen las etapas del ejemplo 23, se sustituye el azúcar 2-(S)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano por 2-(R)-benzoiloximetil-4-carboxil-1,3-dioxolano.

Algunas modificaciones y variaciones de la presente invención que se incluyen pero sin limitarse a la selección de enzimas con alto grado de homología de secuencia y a la optimización de las condiciones de reacción resultarán evidentes para un experto en la materia a partir de la descripción detallada anterior de la invención. Dichas modificaciones y variaciones pretenden estar dentro del alcance de una o más formas de realización de la presente invención tal como se define mediante las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir de manera estereoselectiva un análogo de nucleósido de dioxolano a partir de una mezcla anomérica de anómeros β y α representados por las fórmula A o fórmula B siguientes:



en las que R_1 se selecciona de entre el grupo constituido por alquilo C_{1-6} y arilo C_{6-15} , y Bz es benzoílo, comprendiendo el procedimiento:

hidrolizar de manera estereoselectiva dicha mezcla con una enzima seleccionada de entre el grupo constituido por Protease N, Alcalase, Savinase, ChiroCLEC-BL, PS-30 y ChiroCLEC-PC para hidrolizar de manera estereoselectiva predominantemente un anómero para formar un producto en el que R_1 se sustituye por H;

separar el producto del material de partida no hidrolizado;

sustituir de manera estereoselectiva el grupo funcional en la posición C4 con un purinilo o pirimidinilo o derivado de los mismos.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa que consiste en hidrolizar da como resultado el material de partida que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 97%.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa que consiste en hidrolizar da como resultado el material de partida que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98%.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa que consiste en hidrolizar da como resultado el material de partida que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98,5%.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa que consiste en hidrolizar da como resultado el material de partida que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98,8%.

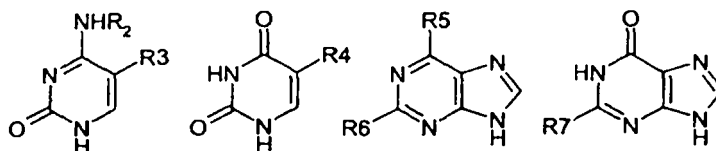
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa que consiste en hidrolizar da como resultado el producto que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 97%.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa que consiste en hidrolizar da como resultado el producto que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98%.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa que consiste en hidrolizar da como resultado el producto que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98,5%.

9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa que consiste en hidrolizar da como resultado el producto que presenta una pureza anomérica de por lo menos el 98,8%.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el purinilo o pirimidinilo o derivado de los mismos se selecciona de entre el grupo constituido por:

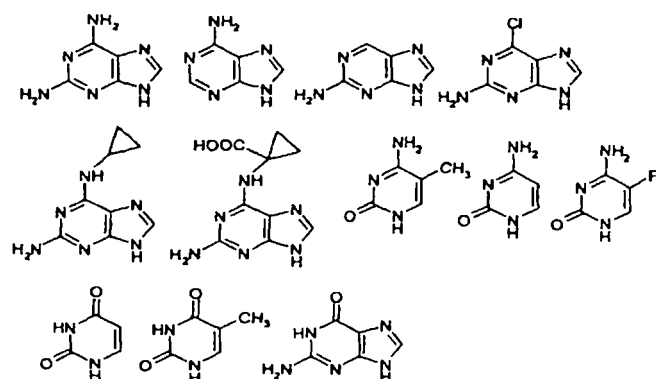


en las que R_2 se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} , acilo C_{1-6} y $R_8C(O)$, en el que R_8 es hidrógeno o alquilo C_{1-6} ;

R_3 y R_4 se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, alquilo C_{1-6} , bromo, cloro, flúor, yodo y CF_3 ; y

R_5 , R_6 y R_7 se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo constituido por hidrógeno, bromo, cloro, flúor, yodo, amino, hidroxilo y cicloalquilamino C_{3-6} .

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el la base de purina o pirimidina o derivado de la misma se selecciona de entre el grupo constituido por:



12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la etapa que consiste en sustituir comprende además:

acilar la segunda mezcla para producir una segunda mezcla acilada; y

glicosilar la segunda mezcla acetilada con una base de purina o pirimidina o derivado de la misma y un ácido de Lewis para producir el análogo de nucleósido de dioxolano.