



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º de publicación: ES 2 042 361

② Número de solicitud: 9101148

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>: C07H 19/073

//A61K 31/71

C07B 41/12

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **10.05.91**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.93**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.12.93**

⑦ Solicitante/es: **Universidad de Oviedo**  
**C/ San Francisco, N° 3**  
**Oviedo, ES**

⑦ Inventor/es: **Gotor Santamaría, Vicente y**  
**Moris Varas, Francisco**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento de obtención de 3' - O - acilderivados de timidina.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de obtención de derivados 3' - O - acilados de timidina.

En la presente invención se consigue la acilación completamente regioselectiva del grupo hidroxilo en posición 3' del 2' - desoxinucleósido timidina. En general es difícil conseguir de forma totalmente selectiva esta transformación puesto que otros métodos conllevan a la mezcla de acilación en 3' y 5'. Esta metodología se realiza simplemente a través de una reacción enzimática en piridina con lipasa Amano PS y ésteres de oxima como donadores de acilo (ver figura). Se consigue así disponer de un método muy versátil de modificación en 3' y además el enzima puede recuperarse por filtración y ser reutilizado, lo que reduce costes de producción. En este caso, la aplicación a la timidina se debe a la potencial actividad farmacológica de los derivados de este nucleósido. La metodología es tan versátil que se puede extender a otros 2' - desoxinucleósidos.

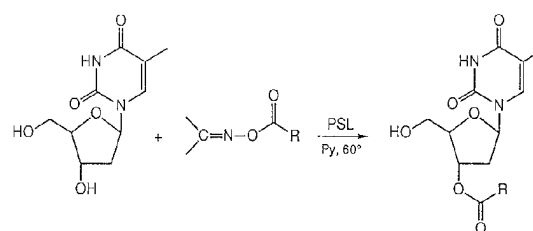


Figura 1

## DESCRIPCION

### Introducción

Los derivados de nucleósidos son compuestos que tienen actualmente una gran importancia en diferentes áreas de la medicina. Así, derivados de la timidina o nucleósidos acíclicos como el aciclovir son importantes agentes antiherpéticos. El grupo de inhibidores más potentes y más selectivos de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) responsables de la enfermedad del SIDA son los 2',3' - desoxinucleósidos, tales como 3' - azido - 3' - desoxitimidina (AZT), 2',3' - didesoxicitidina (ddCy) y 2',3' - didesoxitimidina (ddThd). También algunos derivados de nucleósidos han mostrado propiedades antitumorales.

Ante estos antecedentes, las transformaciones selectivas en la posición 3' de 2' - desoxinucleósidos son de gran importancia para el descubrimiento de nuevos agentes antivirales y anticancerosos. Hasta la fecha no se conocen métodos químicos adecuados para resolver este problema y son los métodos enzimáticos los que han abierto una vía para llevar a cabo este tipo de procesos de una manera selectiva en la posición 3' de los 2' - desoxinucleósidos.

### Sector de la técnica

Acilar la posición 3' del anillo de 2 - desoxirribosa en derivados de timidina.

### Estado de la técnica

La acilación regioselectiva de grupos hidroxilo en hidratos de carbono es un proceso que se puede realizar utilizando enzimas en disolventes orgánicos, según la descripción de Klibanov y col. (J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 584) y Björkling y col. (Synthesis 1990, 112).

Esta metodología ha sido aplicada recientemente a 2' - desoxinucleósidos por un grupo de investigadores japoneses de la Tahio Pharmaceutical Co. Nozaki y col. (Tetrahedron Letters 1989, 30, 3817; Jpn. Kokai Tokkyo JP 02 69,495 [90 69,495]; Tetrahedron Letters 1990, 31, 7327). Este proceso consiste en la utilización de anhídridos de ácido como agentes de acilación usando lipasas en disolventes orgánicos, sin embargo sólo en un caso consiguen acilar la posición 3' del nucleósido, obteniendo por lo general mezclas de productos de mono y diacilación.

### Descripción de la invención

Los ésteres de oxima como agentes de acilación para carbohidratos se haya descrita (Gotor y col. J.C.S. Perkin Trans. I, 1991, 491), siendo el objeto de esta invención la aplicación de esta alternativa a la acilación regioselectiva de nucleósidos.

Conseguir acilar regioselectivamente los grupos hidroxilo de nucleósidos con acil donores que presentan una amplia versatilidad y tiene gran importancia, ya que se pueden obtener acilnucleósidos con diferente lipofilia, que podrían ser ensayados para ver si alguno de ellos presentan propiedades antivirales o anticancerosas.

Los ésteres de oxima se preparan de acuerdo con la bibliografía ("Methoden der organischen Chemie", Ed. Thieme Stuttgart, 1968, vol. X/4

p. 184 y también V. Gotor y col. , Synlett 1990, 11, 699) y se purifican por destilación a vacío.

La preparación de nucleósidos de timidina acilados en posición 3' se realiza de la siguiente manera:

Se disuelve timidina en piridina (preferentemente a razón de 200 moles por litro) y se le añade a la disolución una lipasa, preferentemente la procedente de *Pseudomonas cepacia* (por ejemplo la Amano PS, suministrada por Amano Pharmaceutical Co.), en proporción de unas 3 veces el peso de timidina. A continuación se le añade el éster de oxima (aprox. 1,5 moles/mol de timida) y se mantiene la reacción entre 24 y 48 horas a 50 - 70 °C. Al cabo de este tiempo, y una vez que la mezcla de reacción está a temperatura ambiente, se filtra el enzima lavando con metanol. El enzima se seca a vacío y puede ser utilizado de nuevo. Se evapora la piridina a vacío y queda un sólido que se purifica en columna de gel de sílice (eluyente AcOEt:MeOH 100:1) y se cristaliza en un disolvente tal como el acetato de etilo.

### Descripción de las figuras

Figura 1. - Esquema de obtención de 3' - acil - 2' - desoxinucleósidos.

#### Ejemplo 1

*Obtención de - 3' - O - Acetiltimidina.* El éster de oxima empleado es el acetato de acetoxima; 1.73 g se disolvieron en 50 ml. de piridina y se le añadió a la disolución 7.5 g de lipasa Amano PS. A continuación se le añade el éster de oxima (15 mmoles) y se mantiene la reacción 48 horas a 60°C. Al cabo de este tiempo, y una vez que la mezcla de reacción está a temperatura ambiente, se filtra el enzima lavando con 20 ml. de metanol. El enzima se seca a vacío y puede ser utilizado de nuevo. Se evapora la piridina a vacío y queda un sólido que se purifica en columna de sílica gel (eluyente AcOEt:MeOH 100:1) y se cristaliza en acetato de etilo.

Se aísla un sólido blanco pulverulento.

#### Ejemplo 2

*Obtención de - 3' - O - Butiriltimidina.* El éster usado fue butirato de acetoxima (2.15 g) y, trabajando según el ejemplo 1, se aísla en forma de sólido blanco pulverulento.

#### Ejemplo 3

*Obtención de - 3' - O - Octanoiltimidina.* El éster utilizado en esta ocasión fue el del octanoato de acetoxima (2.99 g) y siguiendo la metodología se obtiene un sólido blanco pulverulento.

#### Ejemplo 4

*Obtención de - 3' - O - Decanoiltimidina.* Usando el decanoato de acetoxima (3 - 41 g) llego al correspondiente sólido blanco pulverulento.

#### Ejemplo 5.

*Obtención de - 3' - O - Crotonoiltimidina.* El crotonoato de oxima (2.12 g) fue el utilizado en este caso y tras seguir el método descrito se aísla un sólido blanco pulverulento.

#### Ejemplo 6.

*Obtención de - 3' - O - Benzoiltimidina.* Se usa el benzoato de oxima (2.66 g) y se obtiene al final del proceso un sólido blanco pulverulento.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de obtención de 3' - O - acilderivados de timidina utilizando ésteres de oxima como acildonores y enzimas en disolventes orgánicos, **caracterizado** por la utilización de ésteres de oxima como acildonores y de una lipasa como catalizador, preferentemente la pro-

ducida por la Pseudomona cepacia.

2. Procedimiento de obtención de 3' - O - acilderivados de timidina según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las condiciones de reacción son suaves (preferentemente calentamiento a 60 °C durante 48 h) y el empleo preferente como disolvente de la piridina por ser el que mejor selectividad proporciona.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

2 042 361

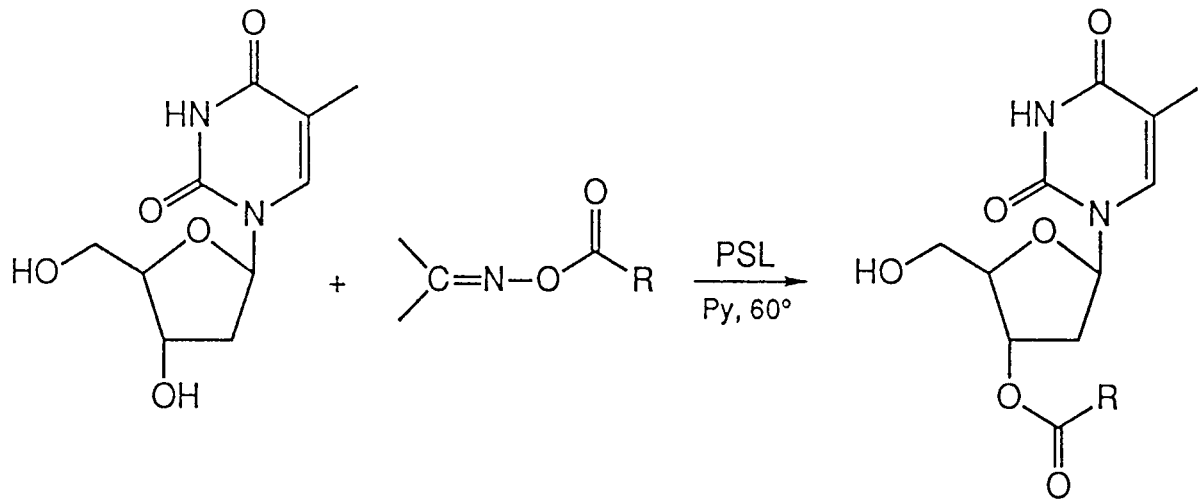


Figura 1



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>: C07H 19/073 // A61K 31/71, C07B 41/12

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS, Vol. 1, 1991, Royal Society of Chemistry, LONDON, GB. V. ROTOR & R. PULIDO "An improved Procedure of Regioselective Acylation of Carbohydrates: Novel Enzimatic Acylation of alfa-D-Glucopyranose and Methyl-alfa-D-Glucopyranoside". Pág. 491-492. * Página 491, columna 2, líneas 5-7; página 492, columna 1, líneas 1-5 *	1
Y	TETRAHEDRON LETTERS, Vol. 31, NO. 50, 1990, GB "Enzymatic Regioselective Acylation of the 3'-hydroxyl Groups of 2'-Deoxy-5-fluoridine (FUdR) and 2'-Deoxy-5-Trifluoromethyl-uridine (CF3UdR)" páginas 7327-7328. * Página 7327, líneas 11-14, figura 1; página 7328, línea 3 *	1
A	* Todo el documento *	1-2
A	TETRAHEDRON LETTERS, Vol. 30, NO. 29, GB "Lipasa Catalyzed Regioselective Acylation of Sugar Moieties of Nucleosides" Páginas 3817-3818. * Todo el documento *	1-2
A	J. AM. CHEM. SOC. Vol. 110, 1988, American Chemical Society "Protease-catalyzed Regioselective Esterification of Sugars and Related Components in Anhydrous Dimethyl Formamide" Páginas 584-589 * Todo el documento *	1-2

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

**Fecha de realización del informe**

01.04.92

**Examinador**

N. Urquía Fernández

**Página**

1/1