

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 508 515**

51 Int. Cl.:

C07H 19/167 (2006.01)

C07H 19/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2011 E 11173347 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2404926**

54 Título: **Preparación de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-adenina**

30 Prioridad:

09.07.2010 CN 201010224898

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

16.10.2014

73 Titular/es:

**SCINOPHARM TAIWAN LTD. (100.0%)
1, Nan-Ke 8th Road Tainan Science-Based
Industrial Park
Tainan County 741, TW**

72 Inventor/es:

**HENSCHKE, JULIAN P.;
ZHANG, XIAOHENG;
MEI, LIJUN y
CHEN, YUNG-FA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 508 515 T3

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

DESCRIPCIÓN

Preparación de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-adenina

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

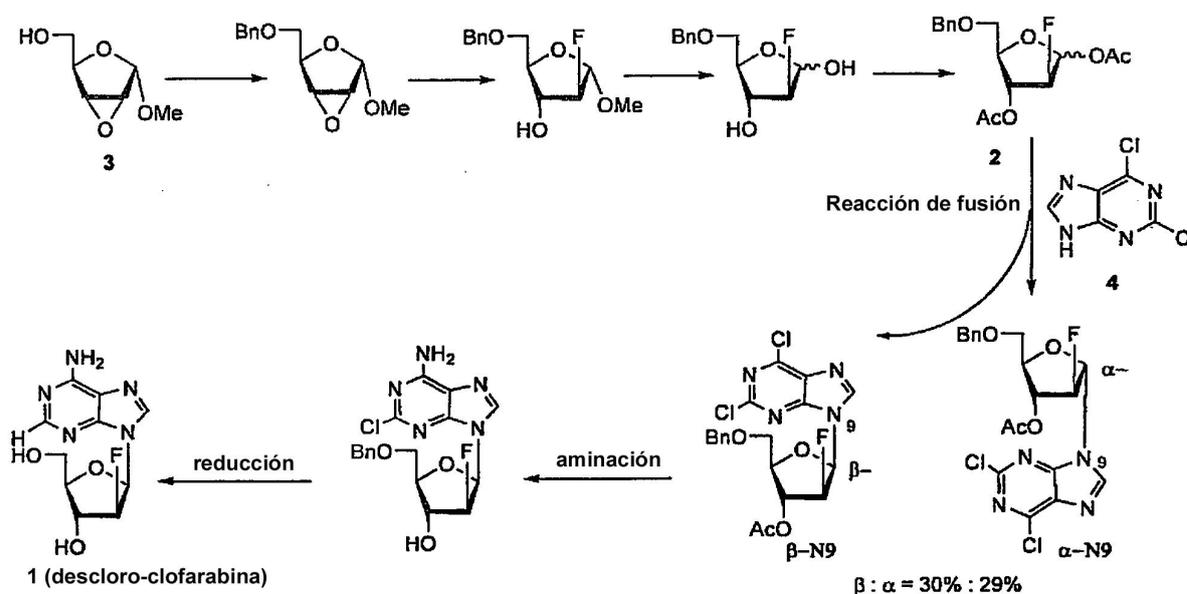
5 La presente solicitud se refiere a un procedimiento para fabricar clofarabina, que es un ingrediente farmacéutico activo.

2. Descripción de la técnica relacionada.

10 La clofarabina es el ingrediente farmacéutico activo (API, por sus siglas en inglés; sustancia farmacéutica) en el producto farmacéutico anticancerígeno Clolar®, que fue desarrollado originalmente por Ilex Oncology. Clolar® fue homologado para su venta por la FDA en 2.004 para tratar a niños con leucemia linfoblástica aguda resistente al tratamiento o recurrente. La clofarabina es un fluoro-desoxiarabinonucleósido, que es un análogo sintético de adenosina.

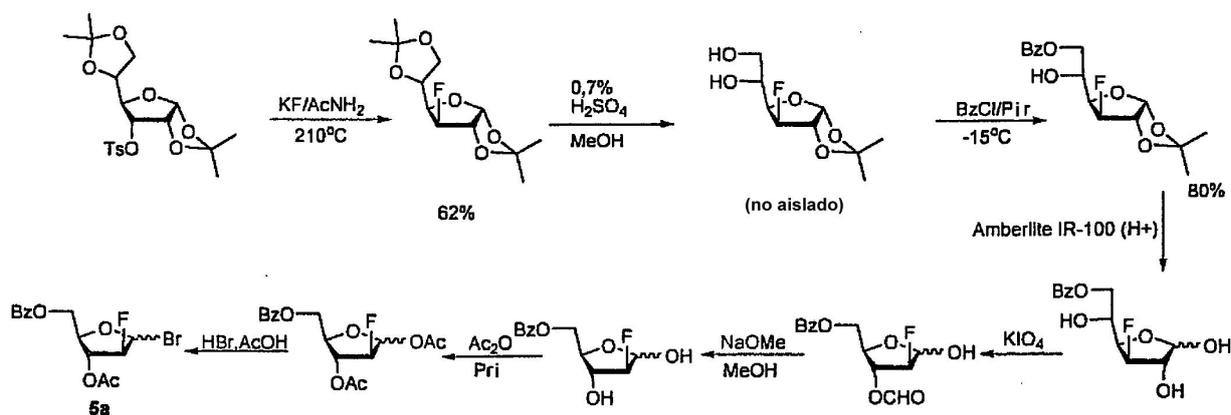
15 Wright *et al.*¹ indicaron la síntesis de 9-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-adenina (**1**), que es simplemente el 2-descloro-análogo de clofarabina, por fusión catalizada por ácido (*p*-TsOH) (acoplamiento) de 1,3-di-O-acetil-5-O-bencil-2-desoxi-2-fluoro-D-arabinofuranósido (**2**), que se preparó a partir de 2,3-anhidro-α-D-ribofuranósido de metilo (**3**),² con 2,6-dicloropurina (**4**) (obsérvese que ésta es la purina libre, es decir, no está sililada o desprotonada) para proporcionar un rendimiento aislado del 30% de β-N9 y 29% de α-N9 por cromatografía de columna corta, seguido por reacción de aminación y reducción (**Esquema 2**). Un importante aspecto y desventaja para este procedimiento es el hecho de que se forma una mezcla 1:1 de anómeros α y β (sólo se desea el anómero β) y el efecto continuado de esto es que se requiere cromatografía de columna para separar los isómeros. Esto hace dicho procedimiento no susceptible de aumento de escala debido al coste de la cromatografía a gran escala. Otro aspecto que hay que observar es que la elección de protección de bencilo del C5'-OH significa que el procedimiento no se podía usar para sintetizar clofarabina debido a que la hidrogenólisis de grupo bencilo conduce a eliminación simultánea del átomo de cloro en C2 requerido en el anillo de adenina. Esto es, los grupos bencilo y el átomo de cloro del anillo de adenina no son ortogonales. Así, el material **2** de partida no se podía usar para sintetizar clofarabina.

25 Watanabe *et al.*³ describen una propuesta de síntesis para nucleósidos de 2'-desoxi-2'-fluoro-arabinofuranosilpurina en las condiciones de disolución sin un catalizador utilizando **2** como un material de partida, pero la clofarabina no fue accesible usando esta ruta.



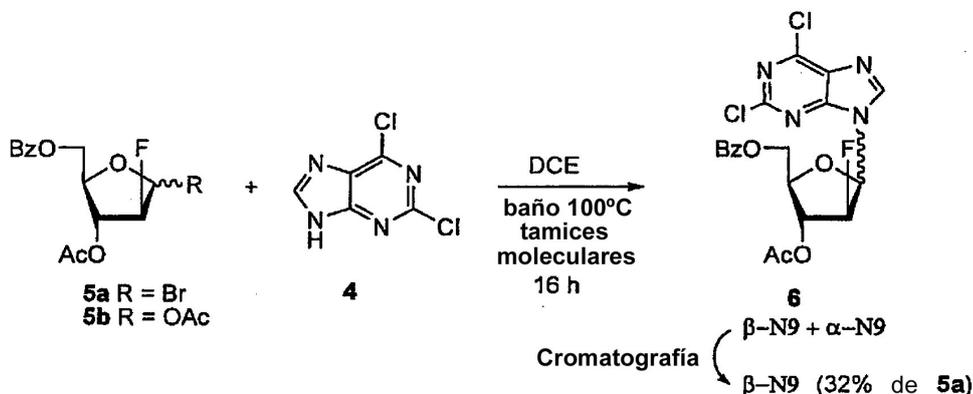
Esquema 2 – Propuesta de Wright et al., de 1.969 para descloro-clofarabina.

Quizá en un esfuerzo para resolver este problema, Reichman *et al.*⁴ sintetizaron bromuro de 3-O-acetil-5-O-benzoil-2-desoxi-2-fluoro-β-D-arabinofuranosilo (**5a**), por un largo procedimiento multi-etapa (**Esquema 3**), que a su vez intercambió el grupo bencilo problemático por un grupo benzoílo.



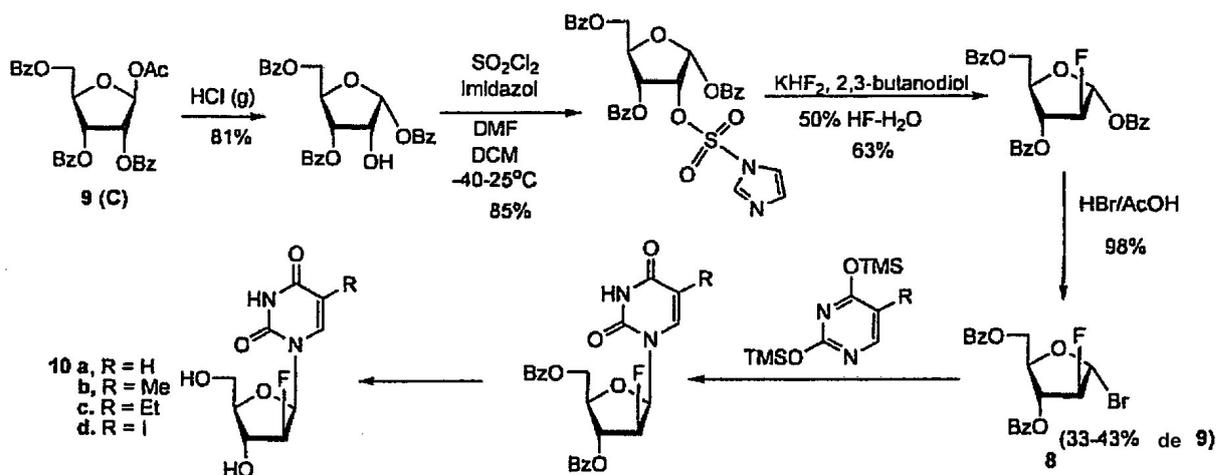
Esquema 3 - Síntesis de Reichman de 1-bromo-2-fluoro-arabinofuranosa 5

Montgomery *et al.*⁵ utilizaron con éxito más tarde este 1- α -bromo-carbohidrato **5a** protegido de manera diferente en la síntesis de nucleósido **6** a base de dicloropurina protegida por el acoplamiento de 2,6-dicloropurina (**4**) libre en DCE a 100°C durante un periodo de 16 horas en presencia de tamices moleculares (**Esquema 4**). Aunque el anómero β deseado de **6** fue el producto principal, también se formaron otros nucleósidos incluyendo el anómero β de **6**, una vez más mostrar pre-fluoración del anillo de carbohidrato conduce a una etapa de acoplamiento inherentemente ineficaz. El nucleósido **6** protegido puro sólo se obtuvo después de la purificación por cromatografía de columna con rendimiento del 32% a partir de compuesto intermedio **5a** y por lo tanto con menor rendimiento basado en el material de partida de carbohidrato verdadero. Los autores también ensayaron el 1-O-Ac-desbromo-análogo **5b** en el acoplamiento con **4** pero esto no proporcionó un rendimiento aceptable del anómero β deseado de **6**.



Esquema 4 - Síntesis de Montgomery de un nucleósido protegido a base de dicloropurina.

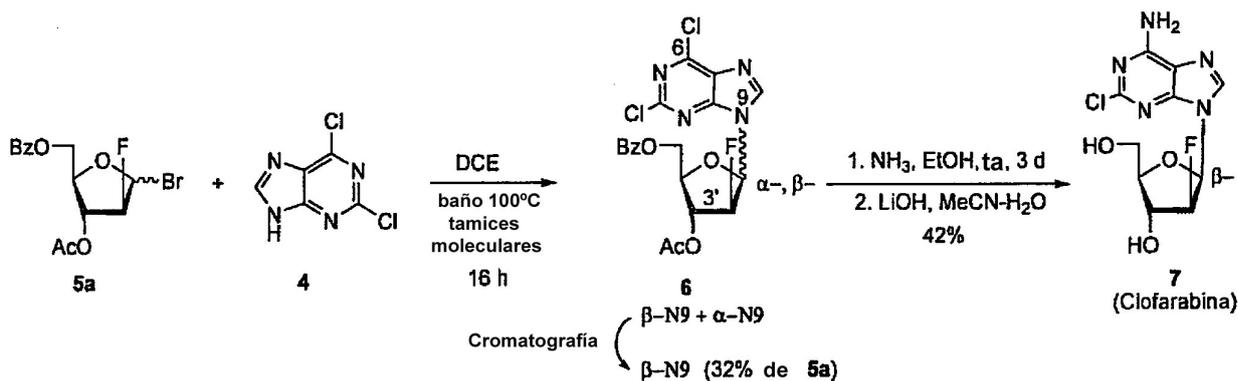
Al mismo tiempo que Montgomery utilizó 1- α -bromo-azúcar **5a** como un material de partida en la síntesis de nucleósido **6** de dicloropurina (anterior), Howell *et al.*⁶ utilizaron en su lugar el análogo próximo bromuro de 2-desoxi-2-fluoro-3,5-di-O-benzoil- α -D-arabino-furanosilo (**8**) (**Esquema 5**). Estos dos compuestos, es decir, **5a** y **8**, difieren sólo por el grupo protector acilo situado en C3-O. El bromoazúcar **8** de Howell *et al.*, se preparó en 4 etapas sintéticas con rendimiento total de 33-43% (43% si se usa un reciclado) de 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosa (**9**); que es el mismo material de partida que el usado en nuestra síntesis de clofarabina) usando etapas de reordenamiento, sulfonilación, fluoración y finalmente bromación (**Esquema 5**). Este bromoazúcar **8** ha sido desde entonces el material de partida clave en la mayoría de las síntesis de clofarabina que conocemos, pero también se puede usar en la síntesis de otros nucleósidos tales como una serie de (2'-fluoro-2'-desoxi- β -D-ribofuranosil)-uracilos **10a-d**.⁷



Esquema 5 - Síntesis de Howell de nucleósidos a base de uracilo.

Montgomery fue el primero en descubrir un método para la síntesis de clofarabina (7).⁸ El método comprendió usar su acoplamiento no catalizado ya descrito⁷ de 1- α -bromo-azúcar 5a con 2,6-dicloropurina (4), seguido por una doble etapa de aminación y desprotección (Esquema 6). La reacción de acoplamiento de 4 y 5a a reflujo en DCE proporcionó una mezcla anomérica de isómeros de N9 a partir de los que se obtuvo el isómero de anómero β de N9 deseado del compuesto intermedio 6 con rendimiento del 32% después de cromatografía de columna. La aminación y desprotección del anómero β de N9 deseado de 6 proporcionó clofarabina (7). La propia aminación proporcionó un compuesto intermedio de clofarabina monobenzoilado (es decir, aminación sólo desprotegida del grupo C3'-OAc y sustituido el grupo C6-Cl) que tenía que desprotegerse además por adición de LiOH para proporcionar 7. Tres recristalizaciones en agua proporcionaron 7 puro con rendimiento del 42%. El rendimiento total de clofarabina fue sólo 13% basado en 5a y por lo tanto con menor rendimiento basado en el material de partida de carbohidrato que se usó para fabricar el propio 5a.

No sólo no se adaptó la tediosa purificación de 6 y 7 a producción comercial con aumento de escala, sino que la síntesis del carbohidrato material de partida 5a⁶ fue complicada. Por otra parte, la inestabilidad de 5a fue también una desventaja para el aumento de escala y la reacción de acoplamiento se tuvo que realizar en condiciones muy secas (es decir, bajos niveles de agua), puesto que de otro modo 5a se descomponía parcialmente durante la reacción.



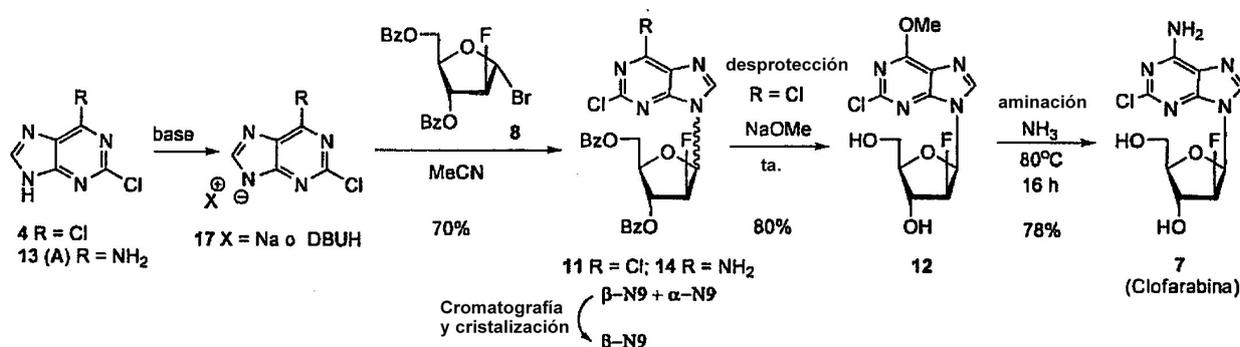
Esquema 6 - La primera síntesis de clofarabina, por Montgomery.

Mucho más recientemente, Montgomery indicó un método mejorado que implicaba el acoplamiento de la sal 17 de sodio u otras sales (tal como se forma usando DBU), de purina 2-cloro-6-sustituida (debido a la relativamente alta acidez del hidrógeno de N9) con el bromuro de 2-desoxi-2-fluoro-3,5-di-O-benzoil- α -D-arabinofuranosilo (8) ahora preferido para proporcionar una mezcla anomérica de compuesto intermedio 11 (Esquema 7).⁹ Una diferencia clave y obvia entre éste y el procedimiento más antiguo fue el uso de una sal aniónica de la purina, que actuaría haciéndola más reactiva. Por supuesto, la reacción de acoplamiento se podía realizar a temperatura ambiente en vez de a 100°C. Se puede ver que el compuesto intermedio 11 es un análogo próximo del compuesto intermedio usado en la primera síntesis de Montgomery de clofarabina. El anómero β de N9 de 11 se separó del anómero α de N9 por una columna de desorción súbita y se cristalizó en etanol y cloroformo con rendimiento de casi 70%. El producto se contaminó con una pequeña cantidad del anómero α . Así, es evidente que el avance con este

procedimiento que conduce al rendimiento mucho mayor del anómero β que se forma era un resultado de utilizar una reacción S_N2 en la etapa de acoplamiento en vez de S_N1 . Debido a que era difícil retirar los grupos benzoilo con amoníaco, se usó metóxido de sodio en vez de previamente a la aminación. Esto dio como resultado que se sustituyera el halógeno situado en C6 con un grupo metoxi para proporcionar compuesto **12**, con rendimiento del 80%. La aminación con amoníaco desplazó el grupo metoxi para proporcionar clofarabina (**7**) con rendimiento del 78%. Como resultado de usar una propuesta S_N2 para la etapa de acoplamiento, el rendimiento fue mejorado a 47% basado en carbohidrato **8**, que es un rendimiento total de hasta 18% de **8**.

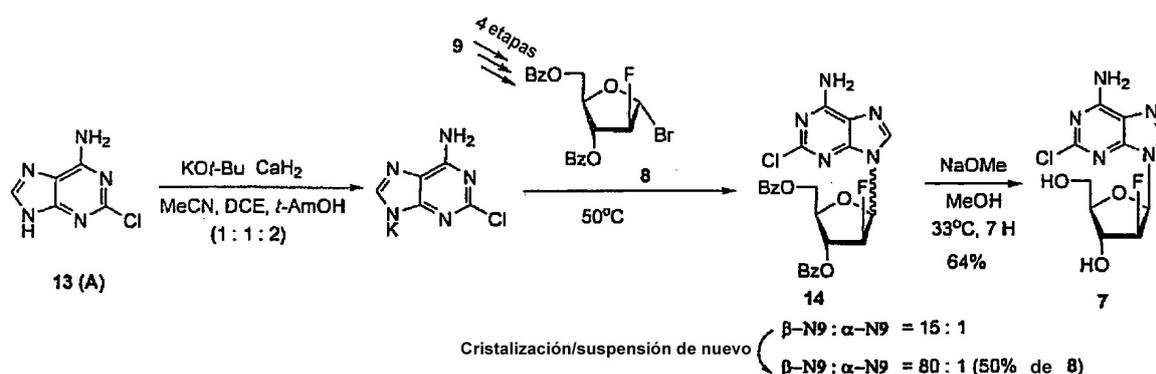
Aunque se prefirió un átomo de halógeno situado en C6, también se reivindicaron grupos alcoxi, azido, amino y amino protegido en esta posición. Así, 2-cloroadenina (**13**) convertida en su derivado de sal de DBU se podía acoplar con **8** pero esto sólo se demostró en una escala muy pequeña y el rendimiento de anómero β de N9 de **14**, cuando se aísla después de TLC preparativa, fue un bajo 28%.

A pesar de estas mejoras, aún quedaba la principal desventaja de este procedimiento, que es que la mezcla anomérica de compuestos intermedios requería cromatografía de columna para su separación. También los ejemplos de la patente no demostraron que este procedimiento fuera aplicable para fabricación a gran escala de clofarabina.



Esquema 7 – Síntesis de clofarabina mejorada de Montgomery.

Los investigadores en ILEX Products, Inc. and Ash Stevens, Inc. optimizaron los procedimientos de Montgomery discutidos anteriormente usando la sal **11** de potasio de 2-cloro-6-aminopurina (también conocida como 2-cloroadenina; **13**), en vez de las sales de sodio de 2,6-dicloropurina (**4**), en el acoplamiento con el mismo bromocarbhidrato **8** en un sistema disolvente ternario en presencia de KO^t-Bu y CaH₂.¹⁰ La selección de **13** en vez de **4** significa que la etapa de aminación de Montgomery ya no se requería, economizando una sola etapa sintética. La formación de la sal de potasio de purina y la reacción de acoplamiento se realizaron en un recipiente (**Esquema 8**). La elección de mezcla de disolventes tuvo una influencia significativa sobre la selectividad anomérica y la conversión. El CaH₂ aditivo tuvo un efecto beneficioso retirando cantidades traza de agua del disolvente. Después de optimización, se podía obtener compuesto intermedio **14** de la reacción de acoplamiento con una relación 15:1 β - α - que se elevó a una relación anomérica de 80:1 (β/α) con rendimiento del 50% con cristalización de acetato de butilo-heptano y suspensión de nuevo con MeOH. La desprotección del **14** β -enriquecido proporcionó clofarabina bruta, que después de cristalización de MeOH, proporcionó clofarabina pura con rendimiento del 64%. El rendimiento de carbohidrato **8** fue 32% y por lo tanto el rendimiento total fue hasta aproximadamente 14% basado en carbohidrato **9** de partida.



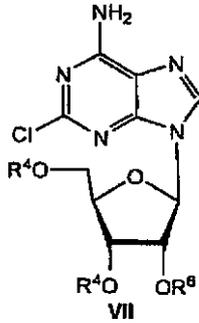
Esquema 8 - Síntesis de clofarabina de ILEX Products, Inc. y Ash Stevens, Inc.

Por lo tanto, aún hay necesidad de un procedimiento mejorado para fabricar clofarabina.

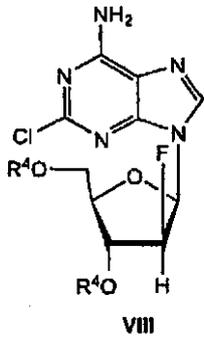
Sumario de la invención

El primer aspecto de la presente solicitud es un procedimiento que comprende:

mezclar carbonato de guanidina, un agente de fluoración y un compuesto de la fórmula VII:

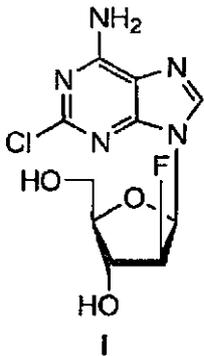


5 , en la que cada R⁴ es independientemente un grupo protector de hidroxilo, OR⁶ es un grupo saliente para obtener un compuesto de la fórmula VIII:

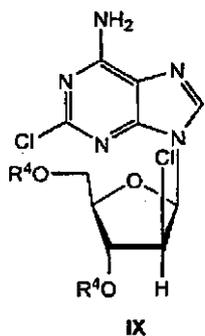


, en la que R⁴ es como se definió anteriormente.

Preferiblemente, el procedimiento descrito anteriormente comprende una etapa de desprotección del compuesto de la fórmula VIII para obtener clofarabina de la fórmula I:

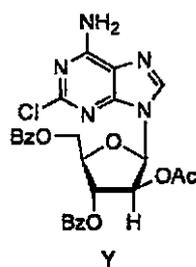
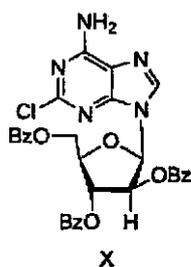
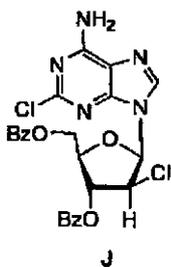


10 El compuesto de la fórmula VIII usado en la etapa de desprotección comprende preferiblemente no más de 0,10% (área de pico) por HPLC de un compuesto de la fórmula IX:



, en la que R^4 es como se definió anteriormente.

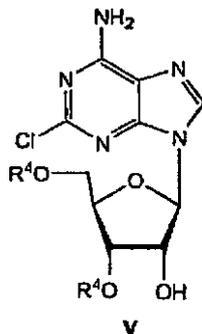
- 5 El compuesto de la fórmula VIII que se tiene que desproteger presenta preferiblemente una pureza HPLC (% de área de pico) de al menos 99%, más preferiblemente 99,5% y lo más preferiblemente 99,8%. El compuesto de la fórmula VIII que se tiene que desproteger contiene preferiblemente no más de 0,1% por HPLC (área de pico) de un compuesto de la fórmula J, no más de 0,1% por HPLC (área de pico) de un compuesto de la fórmula X, no más de 0,1% por HPLC (área de pico) de un compuesto de la fórmula Y y no más de 0,15% por HPLC (área de pico) de la cantidad total del compuesto de la fórmula X y el compuesto de la fórmula Y:



- 10 El agente de fluoración es preferiblemente HF o una mezcla de HF y una base de Lewis orgánica. La base de Lewis orgánica es preferiblemente una amina. La "mezcla" en la presente memoria se refiere a cualquier composición discreta o no discreta, complejo o sal que se pueda formar de mezclar HF y la base de Lewis orgánica. Las composiciones discretas que se pueden referir como complejos incluyen: trietilamina - tris(fluoruro de hidrógeno) (3HF.Et₃N), conocida como TREAT HF, trietilamina - bis(fluoruro de hidrógeno) (2HF.Et₃N) y trietilamina - fluoruro de hidrógeno (HF.Et₃N). Las composiciones no discretas se podían formar por combinaciones de HF y la base de Lewis
- 15 que no formen un único complejo, pero podían ser mezclas, o podían poseer un exceso molar de la base de Lewis con respecto a HF.

- 20 Se puede añadir un disolvente a la mezcla de carbonato de guanidina, el agente de fluoración y el compuesto de la fórmula VII en la etapa de mezcla anterior. El disolvente es preferiblemente un disolvente éster, más preferiblemente EtOAc o n-PrOAc. El disolvente también puede ser uno de lo siguiente: PhMe, EtOAc/PhMe, DCE, DCM, Et₃N, THF, i-PrOAc y BuOAc.

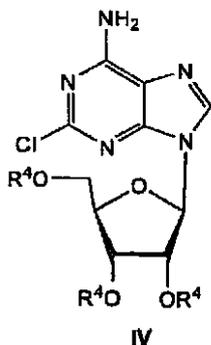
El compuesto de la fórmula VII se prepara preferiblemente derivatizando un compuesto de la fórmula (V):



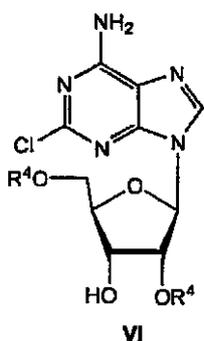
, en la que R^4 es como se definió anteriormente.

El compuesto de la fórmula (V) se puede preparar por un procedimiento que comprende:

1) desproteger parcialmente un compuesto de la fórmula (IV):



, para obtener una primera mezcla de reacción que comprende el compuesto de la fórmula (V) y un compuesto de la fórmula (VI):

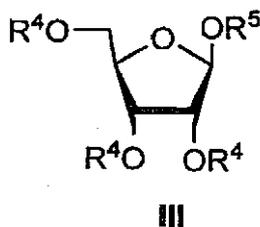


- 5 2) isomerizar el compuesto de la fórmula VI en la mezcla obtenida en la etapa 1) al compuesto de la fórmula V en un disolvente a una temperatura elevada para obtener una segunda mezcla de reacción y
- 3) aislar el compuesto de la fórmula (V) de la segunda mezcla de reacción.

La desprotección parcial de IV se lleva a cabo preferiblemente en presencia de un reactivo nucleófilo, más preferiblemente hidrato de hidrazina en una mezcla de AcOH glacial y piridina o acetato de hidroxilaminio en piridina.

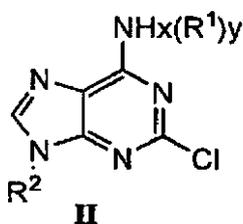
- 10 La etapa de desprotección parcial usando hidrato de hidrazina se puede realizar en una mezcla de piridina y ácido acético y extrayendo después la disolución resultante de la mezcla (VI) y (V) en un disolvente orgánico (por ejemplo MIBK o DCM) con una disolución de base acuosa (por ejemplo, NaHCO₃ ac.), seguido por la etapa de isomerización y recristalización de (V), la cantidad de ácido acético residual en el compuesto de la fórmula (V) se controla preferiblemente a no más de 0,5% peso/peso por GC.
- 15 La mezcla que comprende el compuesto de la fórmula (V) y la fórmula (VI) obtenida en la etapa 1) se puede diluir con un disolvente orgánico que no sea sustancialmente miscible con agua, tal como MIBK o DCM, más preferiblemente MIBK y tratar por tratamiento final acuoso que comprenda una operación de extracción ácida acuosa y una operación de extracción básica acuosa para retirar sustancialmente hidrazina y derivados de hidrazina (tales como BzNHNH₂), piridina y ácido acético, seguido por concentración de la disolución de MIBK de compuestos de la fórmula (V) y la fórmula (VI) que se diluye después con un segundo disolvente, tal como **MeOH**, sin ninguna etapa de purificación adicional y se somete después directamente a isomerización de la etapa 2).
- 20

El compuesto de la fórmula (IV) se prepara por: acoplamiento de una ribofuranosa protegida de la fórmula III:



, en la que R⁴ es como se definió anteriormente, OR⁵ es un grupo saliente, con una

2-cloroadenina siliada de la fórmula II:

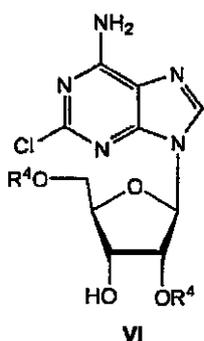


5 , en la que R^1 es $\text{Si}(\text{R}^3)_3$, R^2 es hidrógeno o R^1 , R^3 es alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo o heteroarilo y contiene 1 a 10 átomos de carbono y x es 0 ó 1 mientras y es 2 ó 1, respectivamente, en presencia de un ácido de Lewis o un ácido de Brönsted, tales como los procedentes de ácidos sulfónicos, que incluyen triflato de trimetilsililo (TMSOTf) y ácido triflico (TfOH). Preferiblemente, la 2-cloroadenina sililada no se aísla previamente.

La 2-cloroadenina sililada de la fórmula (II) se puede preparar por: sililación de 2-cloroadenina (2-cloro-6-aminopurina) con un agente de sililación en un disolvente orgánico o neto (es decir, el agente de sililación actúa como el disolvente).

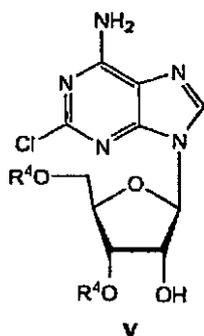
El segundo aspecto de la presente solicitud es un procedimiento que comprende:

10 1) mezclar un disolvente y un compuesto de la fórmula VI:



, en la que cada R^4 es independientemente un grupo protector de hidroxilo, para obtener una primera mezcla;

2) calentar la primera mezcla de la etapa 1) durante un periodo de tiempo suficiente de manera que se isomericice una cantidad sustancial del compuesto de la fórmula VI a un compuesto de la fórmula (V):



15 , en la que cada R^4 es como se definió anteriormente, para obtener una segunda mezcla que comprende el compuesto de la fórmula (VI) y el compuesto de la fórmula (V) y

3) aislar el compuesto de la fórmula (V) de la segunda mezcla para obtener un compuesto aislado de la fórmula (V) y una tercera mezcla que comprende el compuesto de la fórmula (VI).

20 El compuesto de la fórmula (VI) usado en la etapa de mezcla puede existir como un compuesto sustancialmente puro o con más frecuencia en una mezcla con otros compuestos, tales como compuesto de la fórmula (V).

La etapa de calentamiento se realiza preferiblemente durante al menos 5 horas, más preferiblemente al menos 6 horas. Dependiendo de las condiciones específicas de la etapa de calentamiento, tales como disolvente y temperatura, el "periodo de tiempo suficiente" se puede ajustar de manera que una cantidad sustancial del

compuesto de la fórmula VI se isomericice a un compuesto de la fórmula (V). Por ejemplo, la etapa de calentamiento se puede realizar durante cinco a veinticuatro horas en DMSO o sec-BuOH a 100°C.

Preferiblemente, la isomerización se realiza sustancialmente en ausencia de AcOH, piridina e hidrazina o hidrato de hidrazina, acetato de hidroxilaminio o gel de sílice.

- 5 El disolvente usado en el procedimiento anterior se puede seleccionar de manera que la primera mezcla sea heterogénea durante la etapa de calentamiento. Preferiblemente, el compuesto de la fórmula (V) está sustancialmente menos disuelto en el disolvente que el compuesto de la fórmula (VI) durante la etapa de calentamiento, pero el compuesto de la fórmula (V) es suficientemente insoluble y el compuesto de la fórmula (VI) es suficientemente soluble en el disolvente cuando la temperatura elevada se disminuye para efectuar el aislamiento del compuesto de fórmula (V) por cristalización selectiva. Por ejemplo, el compuesto de la fórmula (V) presenta una solubilidad a 25°C de preferiblemente menos de 10 gramos por 1.000 gramos de disolvente y más preferiblemente menos de 1 gramo por 1.000 gramos de disolvente.

- 10 Cuando la primera mezcla es heterogénea durante la etapa de calentamiento, el compuesto de fórmula (VI) se isomeriza preferiblemente al compuesto de la fórmula (V) hasta que el nivel del compuesto de la fórmula (VI) en la fase disolución de la segunda mezcla alcanza un estado estacionario.

- 15 Por otra parte, el disolvente usado en el procedimiento anterior también se puede seleccionar de manera que la primera mezcla esté en forma de una disolución homogénea durante la etapa de calentamiento, pero el compuesto de la fórmula (V) sea sustancialmente insoluble y el compuesto de la fórmula (VI) sea sustancialmente soluble en el disolvente cuando la temperatura elevada se disminuye para efectuar el aislamiento del compuesto de la fórmula (V) por cristalización selectiva.

20 Cuando la primera mezcla durante el calentamiento está en forma de una disolución homogénea, el procedimiento según la presente invención comprende preferiblemente repetir al menos una vez las etapas 1)-3) para tratar la tercera mezcla.

- 25 La primera mezcla se calienta preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 35°C a 120°C, más preferiblemente, para algunos disolventes, tales como MeOH y BuOH, la primera mezcla se calienta a la temperatura de reflujo del disolvente específico usado.

El disolvente usado en el procedimiento anterior para mezclar con el compuesto de la fórmula (VI) se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un alcohol inferior (C₁-C₆), DMSO y combinaciones de los mismos.

- 30 El compuesto aislado de la fórmula (V) se recristaliza preferiblemente de al menos un disolvente de manera que la cantidad de ácido acético residual en el compuesto recristalizado de la fórmula (V) se controla a no más de 0,5% en peso por ensayo de GC. Al menos un disolvente es preferiblemente una mezcla de DMSO y MeOH.

El compuesto de la fórmula (V) obtenido según la presente solicitud se puede convertir en clofarabina.

- 35 La reacción de isomerización descrita anteriormente se puede controlar convenientemente por medición del ensayo HPLC o la pureza HPLC de compuesto VI en la disolución homogénea de la primera mezcla calentada o la fase de disolución de la primera mezcla heterogénea calentada. De esa manera, se puede determinar un periodo de tiempo suficiente para la etapa de calentamiento. Por ejemplo, cuando la pureza HPLC del compuesto VI en la disolución homogénea de la primera mezcla o cuando el ensayo HPLC del compuesto VI en la fase disolución de la primera mezcla en forma heterogénea deja de disminuir o no disminuye más de 0,1% durante un periodo de 2 horas, la etapa de calentamiento se puede terminar por enfriamiento a temperatura ambiente. Alternativamente, cuando la primera mezcla calentada está en forma heterogénea y el ensayo de compuesto VI en la fase disolución no es mayor que 0,3% cuando se usan aproximadamente 10 a 20 volúmenes de disolvente con respecto al peso de los componentes no disolventes de la primera mezcla ("componentes no disolventes de la primera mezcla" se refiere al peso de V + VI), la etapa de calentamiento se puede terminar. La reacción de isomerización se puede realizar típicamente dentro de un periodo de 6 a 10 horas y terminar después.

- 45 Cuando la primera mezcla calentada está en forma heterogénea es deseable que se isomericice la mayor parte de compuesto (VI). El compuesto aislado de la fórmula (V) contiene sólo un nivel bajo de compuesto de la fórmula (VI). Se puede recuperar compuesto (V) en torta de masa filtrante por filtración de la mezcla heterogénea después de enfriamiento a temperatura ambiente con aproximadamente 94-96% de pureza HPLC, contaminado con aproximadamente 2-4% de pureza HPLC de compuesto (VI) y el propio líquido filtrado contiene preferiblemente una cantidad mínima de compuesto de la fórmula (VI).

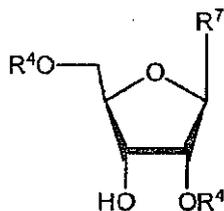
50 Cuando la primera mezcla calentada es una disolución homogénea, un periodo de tiempo suficiente es preferiblemente el periodo de tiempo durante el que se alcanza el equilibrio de la isomerización. En una disolución homogénea de una mezcla de V y VI, el equilibrio es aproximadamente 2:1 (peso/peso o mol/mol basado en % de área HPLC).

- 55 Es preferible que la primera mezcla se caliente hasta que la isomerización de un compuesto de la fórmula VI a un

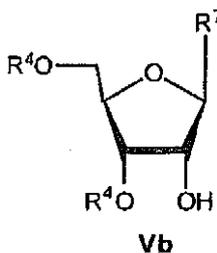
compuesto de la fórmula (V) sea completa, sustancialmente completa, o alcance un estado estacionario. Cuando la primera mezcla calentada esté en forma heterogénea, se puede determinar que la isomerización es sustancialmente completa o completa si no hay o hay poco aumento de rendimiento adicional del compuesto de la fórmula (V) en la fase sólida (es decir, que está constituido en su mayoría por el compuesto de la fórmula (V)). Cuando la mezcla calentada es una disolución homogénea, se puede determinar que la isomerización es completa o sustancialmente completa, cuando se consigue el equilibrio de la isomerización, por ej., si la relación del compuesto de la fórmula (VI) y el compuesto de la fórmula (V) alcanza un estado estacionario, que típicamente aproximadamente 2:1.

Un tercer aspecto de la presente solicitud es un procedimiento que comprende:

1) irradiar un compuesto de la fórmula VIb en una forma sólida



10 **VIb**, en la que cada R^4 es independientemente un grupo protector de hidroxilo y R^7 es 2-cloro-adenin-9-ilo con radiación electromagnética de manera que se isomeriza al menos cantidad parcial del compuesto de la fórmula VIb a un compuesto de la fórmula (Vb)



Vb, en la que cada R^4 y R^7 son como se definió anteriormente y

15 2) aislar el compuesto de la fórmula (Vb) del compuesto de la fórmula (VIb). El aislamiento de la etapa 2 se puede realizar por métodos de separación o purificación incluyendo cristalización o cromatografía o una combinación de métodos de separación. Cuando el compuesto de la fórmula Vb es V y VIb es VI entonces el método de separación puede ser cristalización de un disolvente constituido por MeOH y DMSO.

La radiación electromagnética es preferiblemente radiación infrarroja.

20 Otros objetos y características de la presente invención llegarán a hacerse evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas en el momento presente.

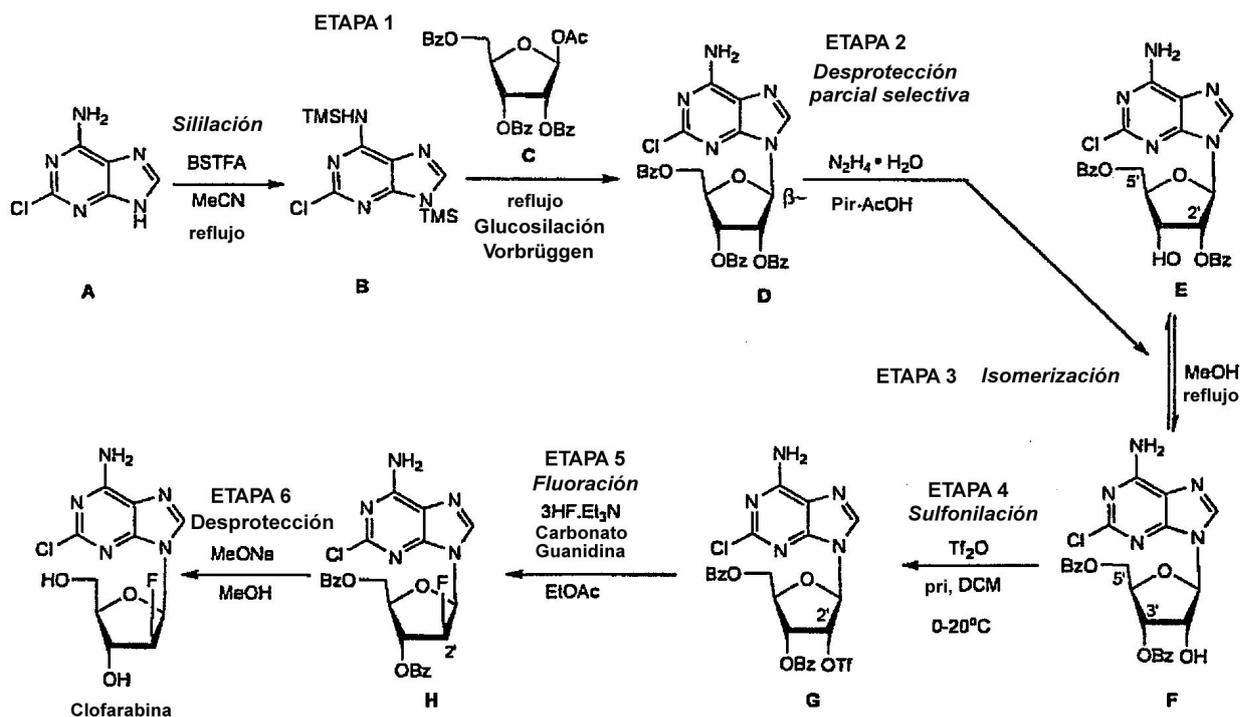
Las siguientes realizaciones se proporcionan para explicar más, pero no limitar, la presente invención.

25 Como se usa en la presente memoria, el término "grupo protector de hidroxilo" se refiere a un grupo destinado a proteger un grupo hidroxilo contra reacciones no deseables durante procedimientos sintéticos. Por ejemplo, los grupos protectores hidroxilo incluyen alquilo, cicloalquilo, arilalquilo, arilo, éteres, ésteres, éteres cíclicos, ésteres cíclicos, acetal cíclico y cetal cíclico. Preferiblemente, el grupo protector de hidroxilo en esta solicitud es un grupo acilo, más preferiblemente un grupo benzoilo o un grupo benzoilo sustituido.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "grupo saliente" se refiere en general a un grupo que es desplazable por un nucleófilo. Los grupos salientes se conocen en la técnica. Ejemplos de grupos salientes incluyen, pero no se limitan a, ésteres (por ej., acetato, benzoato), haluros (por ej., I, Br, F, Cl), sulfonatos (por ej., mesilato, tosilato, triflato), sulfuros (por ej., SCH_3), *N*-hidroxisuccinimida, *N*-hidroxibenzotriazol y similares. Los nucleófilos son especies que son capaces de atacar a una molécula en el punto de unión del grupo saliente causando desplazamiento del grupo saliente. Los nucleófilos se conocen en la técnica. Ejemplos de grupos nucleófilos incluyen, pero no se limitan a, aminas, hidrazinas, hidroxilaminas, tioles, alcoholes, reactivos de Grignard, especies aniónicas (por ej., alcóxidos, amidas de metal, carbaniones) y similares. En esta solicitud, en el grupo saliente OR^5 , R^5 es preferiblemente un grupo acilo, tal como acetilo. El grupo saliente OR^6 en esta solicitud es preferiblemente un éster de sulfonato o sulfamato (por ej., $R^8 = SO_2Nhet$) donde *Nhet* es un anillo heteroaromático que contiene nitrógeno) y contiene 1-12 átomos de carbono y R^6 es preferiblemente $SO_2C_nF_{2n+1}$. Como se usa en la presente memoria, el término "isomerización térmica" se refiere a isomerización que tiene lugar como resultado de

transferencia de calor desde una fuente de calor a la sustancia o sustancias de isomerización. Como se usa en la presente memoria, el término "condiciones térmicas" se refiere a condiciones de reacción en que tiene lugar transferencia de calor desde una fuente de calor a la mezcla de reacción. A menos que se indique de otro modo, los valores de porcentaje de pureza por HPLC son valores de % de área de pico.

- 5 La presente solicitud incluye una nueva síntesis de clofarabina (también conocida como 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-adenina) que implica el acoplamiento directo de 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-ribofuranosa (también conocida como carbohidrato **C** protegido) y 2-cloroadenina bis-sililada (también conocida como nucleobase **B** sililada), mono-desbenzoilación selectiva, formación de éster de sulfonato (sulfonilación), fluoración y finalmente desprotección (**Esquema 1**).



10

Esquema 1 -Síntesis de clofarabina según una realización de esta invención.

En la primera etapa, la etapa de acoplamiento de carbohidrato **C** protegido y nucleobase **B** proporciona solamente o sustancialmente el anómero β de N9 (**D**) deseado. La alta selectividad en esta reacción de glucosilación de Vorbrüggen es un resultado de participación del grupo C2-OBz que actúa como un grupo estereo-dirigente fuerte.

- 15 Después de esto, la desbenzoilación parcial usando hidrato de hidrazina en exceso (es decir, hidrazinólisis; Ishido *et al.*¹¹) en AcOH glacial y piridina (1:4 v/v) o acetato de hidroxilaminio en exceso (es decir, hidroxiaminólisis; Ishido *et al.*¹²) en piridina proporciona una mezcla del 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F** deseado y el 2',5'-di-O-benzoil-regioisómero **E** no deseado, junto con algo del éster de bis-5'-O-benzoilo desprotegido no deseado. Cuando se usó hidrato de hidrazina en AcOH glacial y piridina, se observó una relación aproximadamente 2:1 del 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F** deseado al 2',5'-di-O-benzoil-regioisómero **E** no deseado por análisis HPLC de la mezcla de producto de reacción y esta relación aproximadamente 2:1 se mantiene después de aislamiento por tratamiento final acuoso sin una etapa de cristalización. Los isómeros se pueden separar por cristalización fraccionada, sin embargo, debido a que la mezcla original contiene relativamente aproximadamente un tercio de 2',5'-di-O-benzoil-regioisómero **E** (referido a **F**) en la mezcla de 2',5'-di-O-benzoil-regioisómero **E** y 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F**, el máximo rendimiento teórico del 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F** es aproximadamente 67%. Por lo tanto, la reacción de desprotección parcial de compuesto **D** da como resultado resultados de pérdida de rendimiento significativa debido a la co-formación del 2',5'-di-O-benzoil-regioisómero **E** no deseado. Esto es ineficaz y por lo tanto existe la necesidad de reciclar el 2',5'-di-O-benzoil-regioisómero **E** no deseado. Un aspecto de la invención en la presente memoria estudia esta necesidad.

- La isomerización de 2',5'-di-O-benzoil-ribonucleósidos, preparados por hidrazinólisis¹¹ o hidroxiaminólisis¹² de ribonucleósidos de purina y pirimidina completamente acilados para proporcionar una mezcla junto con 3',5'-di-O-benzoil-ribonucleósidos, se ha realizado por tratamiento cromatográfico en Wakogel C-300 (esta es una variedad comercial de gel de sílice) por Ishido *et al.*¹³ El grado de isomerización depende de la estructura química del resto de nucleobase. Ishido *et al.*¹⁴ indicaron que el tratamiento de 3',5'-di-O-benzoil-N⁶-benciladenosina o 2',5'-di-O-benzoil-N⁶-benciladenosina con acetato de hidroxilaminio en piridina en experimentos separados rápidamente (1,5 – 2 h)

isomerizados para proporcionar mezclas 7:3, respectivamente. Sin embargo, la isomerización selectiva para proporcionar la 3',5'-di-O-benzoil-N⁶-benciladenosina requirió de nuevo cromatografía en Wakogel C-300. Para la aplicación específica de la isomerización de mezclas de **E** y **F** en escalas de fabricación para proporcionar con eficacia **F** sustancialmente o completamente puro desprovisto de compuesto **E**, los autores no encontraron la isomerización cromatográfica ya mencionada eficaz. Sorprendentemente, sin embargo, los autores descubrieron que cuando una mezcla de **E** (21,1% por HPLC) y **F** (70,8% por HPLC) (típicamente la mezcla E/F es casi exactamente 2:1 por HPLC) como un sólido, en ausencia de cantidades sustanciales de reactivo o tampón de desprotección parcial, se irradiaba bajo una lámpara de infrarrojos (lámpara de luz infrarroja de 250 W con índice de potencia de 0,5 KW), situada a aproximadamente 20 cm del sólido que proporcionó una temperatura del aire de aproximadamente 60°C, tenía lugar un enriquecimiento relativamente bajo de **F** (78,7% por HPLC), mientras que se observó que **E** (17,2% por HPLC) disminuía, cuando se determina por análisis HPLC (véase la Tabla 2). Esto indicó a los autores que la isomerización de **E** a **F** podía transcurrir en condiciones de transferencia de calor (es decir, cuando se calentaba la mezcla por conducción o se calentaba por irradiación) sin la necesidad de gel de sílice. La velocidad de isomerización en este experimento fue relativamente lenta. Los autores no observaron la isomerización durante cristalización fraccionada de una mezcla de **E** y **F** en la que la mezcla se disolvió por calentamiento en un disolvente. Tampoco detectaron los autores isomerización de una mezcla de **E** y **F** durante el secado de compuesto **F** 95% puro a vacío a 50°C durante 4 h, después a 60°C durante 4 h y después a 80°C durante 2 h (Tabla 1). Así, los grados de isomerización útiles de **E** y **F** requieren ciertas condiciones de reacción que no se encuentran durante la implantación de operaciones típicas de cristalización y secado.

Tabla 1

Condición de secado a vacío	pureza HPLC compuesto E	pureza HPLC compuesto F
Secar a 50°C durante 4 h	0,36%	95,2%
Continuar secado a 60°C durante 4 h	0,34%	95,2%
Continuar secado a 80°C durante 2 h	0,33%	95,1%

Los autores no observaron isomerización en condiciones de cristalización clásicas.

Tabla 2 - Isomerización de una mezcla de **E** y **F** como un sólido bajo una lámpara de infrarrojos.

Tiempo	Compuesto (E) ^a	Compuesto (F) ^a
0 h	21,1%	70,8%
2 h	20,7%	71,9%
5 h	18,2%	73,7%
10,5 h	17,2%	78,7%

a. Porcentaje de área, cuando se determina por análisis HPLC.

Basado en la observación de que la mezcla de **E** y **F** isomerizados en condiciones de transferencia de calor, los autores realizan más experimentos con el objetivo de desarrollar un método nuevo e industrialmente útil de isomerización de mezclas de **E** y **F** utilizando transferencia de calor. Los autores descubrieron inesperadamente que una mezcla de compuestos de la fórmula **F** y **E** experimentaba isomerización cuando se disolvía en un disolvente calentado (es decir, como una disolución homogénea) cuando se calienta a temperaturas por encima de la temperatura ambiente durante un periodo de tiempo. En 10 volúmenes de DMSO a aproximadamente 100°C, una mezcla 21:1 de **F** y **E** isomerizados para proporcionar una mezcla 1,9:1 en entre 6,5 h y 19 h (la relación fue 3,3:1 en 6,5 h sin cambio significativo (desde 98,4% de área a 98,7% de área) en el % de área total combinada de **F** y **E**). En 20 volúmenes de sec-BuOH a aproximadamente 100°C, una mezcla 23:1 de **F** (90% de pureza HPLC) y **E** isomerizados para proporcionar una mezcla 1,9:1 (63,3% de compuesto **F** y 33,8% de compuesto **E** por análisis HPLC de la mezcla) en entre 5 h y 23,5 h (la relación fue 2,1:1 en 5 h con sólo 1% de cambio (de 94 % de área a 93 % de área) en el % de área total combinada de **F** y **E**). Una relación aproximadamente 2:1 de **F** y **E** se formó de manera consistente en las condiciones homogéneas. Cuando la disolución de reacción que había proporcionado una mezcla 1,9:1 de **F** y **E** descrita anteriormente en 20 volúmenes de sec-BuOH a aproximadamente 100°C se enfrió a aproximadamente 10°C, cristalizó compuesto **F** con 97% de pureza HPLC (sólo 2% de compuesto **E**) con rendimiento aproximadamente del 60% basado en la mezcla 23:1 original de **F** y **E**, que es consistente con la recuperación eficaz del compuesto **F** de la mezcla 1,9:1 de **F** y **E**. Se encontró el compuesto **E** en aproximadamente 82% de pureza HPLC (y 15% de compuesto **F**) en las aguas madres de la cristalización, con rendimiento aproximadamente del 40%. Cuando las aguas madres de un experimento equivalente (pero que se había iniciado

utilizando una mezcla 1,4:1 de F y E antes de la primera equilibración y cristalización) conteniendo el compuesto E enriquecido se calentaron de nuevo a aproximadamente 100°C durante 12 horas, se volvió a equilibrar y se formó una relación 1,9:1 de F y E que después de enfriamiento a temperatura ambiente proporcionó cristales de compuesto F cristalizado con 96% de pureza HPLC (sólo 2% de compuesto E) con rendimiento de aproximadamente 17% basado en la mezcla original de F y E. Así, por equilibración de nuevo (es decir, se obtiene isomerización hasta el punto estático (equilibrio), como se puede determinar por análisis HPLC de la disolución) de las aguas madres de cristalización que se enriquecen con el compuesto E no deseado, se pudo obtener un mayor rendimiento del teórico de compuesto F. Estos experimentos confirmaron que se podía usar transferencia de calor (es decir, calentamiento) para fomentar la isomerización y reciclar por lo tanto el isómero E no deseado para proporcionar mayores cantidades de isómero F por encima de las cantidades que puede proporcionar la etapa de desbenzoilación parcial de ribonucleósido D. Una desventaja de este protocolo es que las aguas madres se deben aislar y equilibrar además y cristalizar después de nuevo. Por lo tanto, los autores aún observaron una necesidad de un procedimiento mejorado y razonaron que si se podía identificar un disolvente o una mezcla de disolventes en que el compuesto F era sustancialmente insoluble pero en que el compuesto E era sustancialmente soluble a temperaturas a que pudo tener lugar la isomerización térmica de compuesto E a F, se debería generar un mayor rendimiento del teórico de compuesto F en la fase sólida y el compuesto E se debería convertir sustancialmente o completamente en un compuesto F, asumiendo que el calentamiento fue realizado durante tiempo suficientemente prolongado.

En línea con esta necesidad, los autores descubrieron que el 2',5'-di-O-benzoil-regioisómero E no deseado se puede isomerizar al 3',5'-di-O-benzoil-isómero F deseado en condiciones térmicas en un disolvente por los parámetros de reacción de selección cuidadosa (es decir, disolvente, concentración y temperatura) de manera que el 3',5'-di-O-benzoil-isómero F deseado se sitúa sustancialmente en la fase sólida mientras al mismo tiempo el isómero no deseado se sitúa en la fase líquida. En dichas condiciones, el fenómeno combinado de equilibración de los dos isómeros E y F en la fase de disolución y la precipitación continua de 3',5'-di-O-benzoil-isómero F recién formado fuerza la mezcla de reacción (es decir, el sólido más fases de disolución) hacia un contenido en 3',5'-di-O-benzoil-isómero F total mayor que con que se empezó. Esto es, se puede obtener un rendimiento de recuperación teórico mayor del 100% de isómero F. El disolvente preferido para esta conversión fue MeOH. La temperatura preferida a presión atmosférica fue la temperatura de reflujo de MeOH (es decir, aproximadamente 65°C). Por ejemplo una mezcla heterogénea de 1,0 g de 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (E) (27,4% de pureza por HPLC) y 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (F) (47,0% de pureza por HPLC) se isomerizó en MeOH (20 ml) a temperatura de reflujo (aproximadamente 65°C) durante 66 horas, después de enfriar a temperatura ambiente, filtración y secado, se obtuvieron 0,62 g de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (F) puro de 95,6% que es equivalente a un rendimiento del 126% calculado basado en compuesto F, o con rendimiento del 80% calculado basado en la mezcla de compuestos E y F en la mezcla original. El líquido filtrado contenía muy poco de compuesto E y F (1,6% de pureza HPLC de compuesto F y 5,8% de pureza HPLC de compuesto E). En una escala mayor, este método fue conveniente, rápido y eficaz. La reacción de isomerización se puede controlar de manera conveniente por medición del ensayo HPLC de compuesto E en la fase de disolución de la mezcla heterogénea. Cuando el ensayo HPLC de compuesto E en la fase disolución deja de disminuir o no disminuye más de 0,1% durante un periodo de 2 horas o el ensayo de compuesto E en la fase disolución no es mayor que 0,3%, la reacción se puede terminar por enfriamiento a temperatura ambiente. La reacción de isomerización se puede realizar típicamente dentro de un periodo de 6 a 10 horas y terminar después. Después de esta isomerización, el 3',5'-di-O-benzoil-isómero F deseado se aísla convenientemente por filtración. De esta manera, se puede recuperar compuesto (F) en la torta de masa filtrante con aproximadamente 94-96% de pureza HPLC, contaminado con aproximadamente 2-4% de pureza HPLC de compuesto (E).

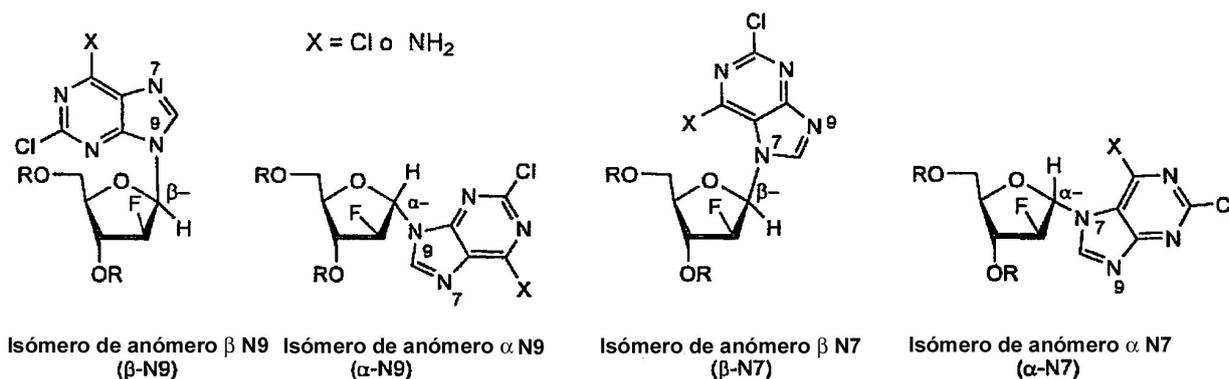
Bauman y Wirsching¹⁵ describieron un método para el aislamiento de 3',5'-di-O-acetil-2-fluoroadenosina de una mezcla de incluyendo 3',5'-di-O-acetil-2-fluoroadenosina y 2',5'-di-O-acetil-2-fluoroadenosina que implica cristalización fraccionada de MeCN o MeCN/acetona, pero no se explica ningún método de isomerización.

En la siguiente etapa, el 3',5'-di-O-benzoil-isómero F se sulfonila en C2'-OH usando un agente de sulfonilación (es decir, el anhídrido sulfónico Tf₂O). Es posible que otros grupo salientes, dicho sulfonato heteroaromático (por ej., imidazolsulfonato), se puedan usar en vez de triflato para activar el C2'-OH.

Se usa después un reactivo de fluoración para sustituir el grupo sulfonato en C2' en presencia de una base o sal de base (tal como carbonato de guanidina). El reactivo de fluoración 3HF.Et₃N se prefiere ya que no es corrosivo¹⁶ y es aplicable para síntesis a gran escala. Debido a que los distribuidores comerciales de 3HF.Et₃N contienen cloruro (preferiblemente en forma de HCl) y debido a que el ión cloruro es más reactivo que el ión fluoruro en las condiciones de reacción ensayadas en la presente memoria, se forman cantidades significativas del compuesto J de cloruro no deseado, que es un análogo del precursor H penúltimo deseado (Esquema 9). Debido a que la forma desprotegida (es decir, compuesto K) de compuesto J de cloruro puede ser muy difícil de retirar del API se requiere que sus niveles se limiten en el procedimiento de síntesis aguas arriba. Los autores descubrieron sorprendentemente que este control se puede conseguir por el uso de 3HF.Et₃N junto con carbonato de guanidina. Cuando se usó carbonato de guanidina como aditivo en la reacción de fluoración, se formaron cantidades relativamente inferiores y aceptables del análogo J de cloruro. Después de fluoración, la clofarabina H protegida resultante se sometió a cristalización para retirar impurezas que de otro modo afectarían a la calidad del producto API final.

En la etapa sintética final, la clofarabina **H** protegida purificada se desprotege para proporcionar clofarabina muy pura sin cantidades detectables de isómeros. Esto se puede cristalizar además como una rutina para asegurar que el API satisface su especificación.

- 5 Una cuestión significativa y fuente de ineficacia con los métodos sintéticos de las síntesis de clofarabina de la técnica anterior que utilizan el acoplamiento de 2-desoxi-2-fluoro-arabinofuranósidos protegidos con nucleobases de purina, es la formación concomitante de regio- y estereoisómeros incluyendo α -N9, α -N7 y β -N7 (**Figura 1**) además del isómero β -N9 deseado. El isómero α -N9 es una impureza no deseada común en particular (véase el Esquema 4, 6, 7 y 8 para ejemplos de síntesis en que se forma este estereoisómero) y es difícil de retirar, requiriendo cromatografía o cristalización para retirarlo.



10

Figura 1 - Isómeros de 2-desoxi-2-fluoro-arabinofuranósidos acoplados con nucleobases de purina.

- 15 Por contraste, según una realización de esta invención, el isómero β -N9 protegido, 2-cloroadenosina **D** protegida, se obtiene de manera selectiva y completamente, o sustancialmente, exento del isómero **D2** α -N9, el isómero **D3** β -N7 e isómero **D4** α -N7 (**Figura 2**) que significa que los compuestos intermedios sintéticos aguas abajo están también completamente o sustancialmente exentos de isómeros. Esto se consigue conduciendo la reacción de acoplamiento de nucleósido en un sistema de carbohidrato de ribosa en que está presente el oxígeno de C2', en contraste con un sistema de 2'-desoxi-ribosa en que está ausente el oxígeno-C2'. Esto es, en esta invención la D-ribofuranosa **C** (**9**) protegida se acopla con la 2-cloroadenina **B** bis-sililada. Sin estar ligados por la teoría, no se forma el isómero α -N9 no deseado en cantidades apreciables debido a participación de grupos vecinos (también conocido como asistencia anquimérica) del grupo C2'-OBz (**Esquema 1**) que dirige la nucleobase a la cara β del anillo de carbohidrato durante acoplamiento de las dos unidades. Además, las condiciones de la reacción de la etapa de acoplamiento podían permitir la reversibilidad de la formación del nucleósido que significa que puede tener lugar isomerización de los regioisómeros **D3** y **D4** N7 no deseados al isómero **D** β -N9 deseado.

- 25 Una realización de esta invención es la síntesis de clofarabina en que el nucleósido se construye por el acoplamiento de la nucleobase y unidades de carbohidrato antes de que se instale el átomo de flúor de C2' en el anillo del carbohidrato.

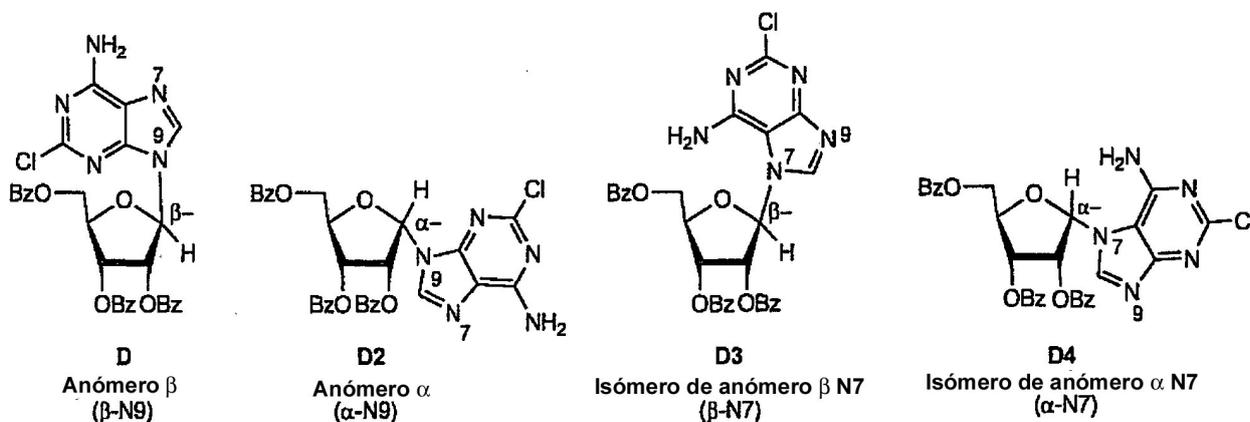


Figura 2 - Isómeros de ribofuranósido acoplados con 2-cloroadenina sililada.

La 2-cloroadenosina **D** protegida se mono-desprotege de manera regioselectiva usando hidrato de hidrazina en

piridina y ácido acético o acetato de hidroxilaminio en piridina siguiendo métodos similares de Ishido^{11,12} para proporcionar una mezcla del 3',5'-di-O-benzoil-nucleósido **F** deseado y el 2',5'-di-O-benzoil-regioisómero **E** no deseado, junto con algo del bis-5' desprotegido-O-benzoil-nucleósido no deseado (5'-O-benzoil-2-cloroadenosina). En un aspecto de esta etapa, se lavó el producto de reacción bruto con una base acuosa, preferiblemente NaHCO₃ hasta que el ensayo GC de AcOH en la fase orgánica es <=0,5% en peso. Esto es importante para asegurar que el API se puede producir exento de isómeros tales como 2-cloro-9-(β-D-arabinofuranosil)-adenina. Aunque esta mezcla comprende un rendimiento relativamente moderado del 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F** deseado debido a la co-formación del 2',5'-di-O-benzoil-regioisómero **E** no deseado, los autores descubrieron que el calentamiento de la mezcla en disolventes incluyendo alcoholes, preferiblemente MeOH, aumenta la cantidad absoluta de 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F** en la mezcla cuando sólo es parcialmente soluble. Sin estar limitados por la teoría, esto es debido a una reacción de isomerización conducida al equilibrio que transcurre mediante migración de acilo entre las posiciones C2'-O y C3'-O, que enriquece **F** debido a que el 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F** deseado se sitúa sustancialmente en la fase sólida de la mezcla mientras al mismo tiempo el 2',5'-di-O-benzoil-isómero **E** del regioisómero no deseado se sitúa sustancialmente en la fase líquida. Se indicó en la bibliografía por Ishido *et al.*,¹⁴ que algunos ribonucleósidos parcialmente protegidos experimentaban isomerización durante la cromatografía sobre gel de sílice. Los autores de la invención en la presente memoria no encontraron que esto fuera eficaz para la isomerización de compuesto **E** y **F** debido a que no se consideró práctico o eficaz para implantación a una escala industrial. Otros métodos descritos¹⁵ para separación de 3',5'-di-O-acil- y 2',5'-di-O-acil-isómeros cuentan con cristalización fraccionada o cromatografía.

En la fase de disolución de la mezcla de reacción el equilibrio entre los regioisómeros **E** y **F** junto con la precipitación simultánea de 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F** recién formado promueve la composición total de la mezcla de reacción (fases sólida más disolución) hacia una que comprende una mayor cantidad de 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F** que con que se empezó. Así, aunque la constante de equilibrio en la condiciones de reacción en la fase de disolución proporciona una relación aproximadamente 2:1 del 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F** y 2',5'-di-O-benzoil-isómero **E**, el 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F** deseado se retira físicamente de la mezcla de equilibrio por su precipitación (es decir, se transporta a la fase sólida). El instante de tiempo en que la reacción de isomerización se debería terminar se puede determinar por medición de manera periódica del ensayo de la fase disolución y determinando cuando la cantidad absoluta de isómero **E** en la disolución deja de disminuir. Este procedimiento de isomerización no es un procedimiento de cristalización fraccionada debido a que se consume en realidad el 2',5'-isómero **E** no deseado (es decir, por su conversión en isómero **F**) durante la reacción de isomerización y no se enriquece en la fase de disolución durante la reacción. De hecho, la reacción de isomerización se controla por consumo del 2',5'-isómero **E** no deseado en la fase de disolución durante la reacción.

Después de la operación de isomerización térmica, el 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F** requisito se puede obtener sustancialmente exento del 2',5'-di-O-benzoil-isómero **E** por filtración con un rendimiento aceptable y con una pureza HPLC de >95%. Opcionalmente, el 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F** se puede recrystalizar de un sistema disolvente, incluyendo de una mezcla de sulfóxido y alcohol, preferiblemente de MeOH y DMSO. Esta operación de cristalización, sin embargo, se realiza para retirar específicamente hidrazina, otras impurezas procedentes de hidrazina (incluyendo N-benzoilhidrazina) y ácido acético del compuesto intermedio y no es necesario para el fin de retirar estereo- o regioisómeros de 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F** puesto que ya está aceptablemente enriquecido. Se prefiere la eliminación de hidrazina, otras impurezas procedentes de hidrazina y ácido acético del 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F** debido a que asegura que se pueda obtener una pureza aceptable de clofarabina con respecto a las directrices de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, por sus siglas en inglés) sobre las impurezas en nuevas sustancias farmacéuticas (Q3A(R2)) y la Directriz de EMEA (CHMP) sobre los Límites de las Impurezas Genotóxicas (2.006). Después de esta recrystalización, el regioisómero **E** fue típicamente menor que 0,1% por HPLC. Por una combinación de i) extracción acuosa de NaHCO₃ de la fase orgánica durante tratamiento final acuoso que se realiza después de la reacción de isomerización parcial y ii) recrystalización de compuesto **F**, se controla preferiblemente ácido acético a <=0,5% en peso por ensayo de GC.

Así, otra realización de esta invención es la isomerización térmica del regioisómero 2',5'-di-O-benzoil-isómero **E** no deseado en MeOH para proporcionar 3',5'-di-O-benzoil-isómero **F**. Otro aspecto de esta invención en esta realización es el control de la reacción de isomerización por medios analíticos para obtener la cantidad máxima de isómero **F** y después el aislamiento de isómero **F** sustancialmente enriquecido (típicamente 94-96% por HPLC) por filtración de la mezcla de reacción de isomerización y finalmente una posterior recrystalización del compuesto **F** para obtener compuesto **F** exento de impurezas que podían conducir de otro modo a API de pureza inaceptable.

La sulfonilación de C2'-OH de compuesto **F** con anhídrido triflico (Tf₂O) proporciona 2'-O-trifil-2-cloroadenosina (**G**). En un aspecto de la invención, la disolución de compuesto **G** bruto se seca de manera que el nivel residual de agua es bajo, preferiblemente menor que 1.000 ppm cuando se determina por análisis de valoración Karl Fischer, debido a que esto reduce la cantidad de formación de impureza en la etapa de reacción a continuación, que a su vez asegura que la pureza del API se consiga específicamente con un nivel aceptable del estereoisómero 2-cloro-9-(β-D-arabinofuranosil)-adenina. Los autores descubrieron que la fluoración de triflato **G** se podía conseguir para proporcionar fluoruro **H** con rendimientos y purezas variables con KF en presencia de reactivo 18-corona-6, KHF₂, CsF, TBAF o 3HF.Et₃N junto con bases amina tales como Et₃N, piridina, DIPEA, N-metilimidazol, DBU o guanidina, o junto con sales de amina incluyendo carbonato de guanidina (véase la Tabla 3). Sin embargo, se observaron

resultados superiores con reactivo 3HF.Et₃N, preferiblemente cuando se usa junto con bases amina o sales de amina. Se prefiere 3HF.Et₃N para fabricación industrial debido a que no corroe apreciablemente el vidrio.¹⁶ Debido a que los proveedores comerciales de 3HF.Et₃N pueden contener niveles variables de cloruro dependiendo de la calidad y el proveedor y debido a que el ión cloruro es más reactivo que el ión fluoruro en la condiciones de reacción usadas para la conversión de compuesto **G** en compuesto **H**, se forman cantidades significativas del cloruro **J** no deseado (es decir, el análogo de cloruro de compuesto **H**) (**Esquema 9**) incluso cuando el nivel de cloruro en el reactivo de fluoración es bajo.

Los autores descubrieron, sin embargo, que cuando se usaba 3HF.Et₃N junto con carbonato de guanidina que el nivel de cloroazúcar **J** se podía controlar a niveles menores que o iguales a aproximadamente 0,3% (% de área de pico en trazas de HPLC) en **H** bruto y niveles menores que o iguales a aproximadamente 0,10% (por HPLC) en **H** recristalizado, que significa que después de desprotección de clofarabina protegida, se observó cloroazúcar **K** a niveles menores que o iguales a 0,10% (por HPLC) en el propio API. Esto se demostró crucial para obtener API de clofarabina con pureza que fuera aceptable con respecto a las directrices de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) sobre las impurezas en nuevas sustancias farmacológicas (Q3A(R2)).

El carbonato de guanidina proporcionó mejores resultados que las bases libres que se ensayaron incluyendo base exenta de guanidina. Sin estar limitados por la teoría, esto podía ser un resultado de la combinación de ácido y base o un fenómeno relativo al pH en el sistema de reacción o modificando la naturaleza de la nucleofilia del complejo HF-base. Por lo tanto, es posible que otras bases o sales básicas usadas junto con 3HF.Et₃N en cantidades diferentes o similares, en los mismos o diferentes sistemas disolventes, pudieran proporcionar resultados similares, iguales o mejores.

La impureza **J** del cloroazúcar que se puede formar en la etapa de fluoración y su posterior producto **K** de desprotección (2'-cloro-clofarabina) demostró ser muy difícil de retirar de los fluoroanálogos deseados (es decir, compuesto **H** y clofarabina, respectivamente) por purificación, especialmente clofarabina. De hecho, los autores descubrieron que en un intervalo de condiciones de cristalización que la impureza **K** de cloro estaba ligeramente enriquecida en la cristalización de clofarabina. La recristalización del penúltimo precursor **H** que se contaminó con impureza **J** de cloroazúcar de sistemas disolventes incluyendo mezclas de alcohol y disolvente éster, preferiblemente MeOH y EtOAc, condujo a un enriquecimiento en **H** con respecto a impureza **J** de cloroazúcar pero la pureza total de la impureza **J** de cloro aún fue demasiado alta (que significa que su análogo **K** desprotegido contaminaría la clofarabina en niveles inaceptablemente altos) si no se controlaba en la etapa de fluoración por la elección apropiada de reactivo y condiciones de fluoración. Así, el uso de carbonato de guanidina como aditivo para la reacción de fluoración fue muy importante para permitir la síntesis de API de clofarabina de alta calidad.

Tabla 3: Fluoración de compuesto **G** con agentes de fluoración para preparar compuesto **H**.

Entrada	Agente de fluoración	Aditivo(s) base	Disolvente, Temperatura, Tiempo	Relación de H a J en sólido aislado (relación en disolución)	% de área HPLC de J en disolución de reacción (% de área HPLC de J en H bruto)	Rendimiento aislado {% de área HPLC de J en H recristalizado}
1	3 eq. KF	NA	DCM, 23°C, 12 h	No reacción	-	-
2	3 eq. KF/3 eq. 18-corona-6	NA	EtOAc, 80°C, 3 h	(5,6:1)	2,5%	-
3	3 eq. KHF ₂	NA	DMSO, 50°C, 4 h	(0,91:1)	4,4%	-
4	3 eq. CsF	NA	MeCN, 22°C, 4 h	(10:1)	0,1%	-
5	6 eq. CsF	NA	NMP, 100°C, 5 h	Bajo conversión	-	-
6	6 eq. TBAF	NA	MeCN, 23°C, 7 h	(6,7:1)	0,9%	-
7	6 eq. TBAF	NA	MeCN, -15°C, 7 h	(8:1)	0,5%	-
8	6 eq. 3HF.Et ₃ N	4 eq. Piridina	EtOAc, 80°C, 23 h	(3,9:1)	7,6%	-

(continuación)

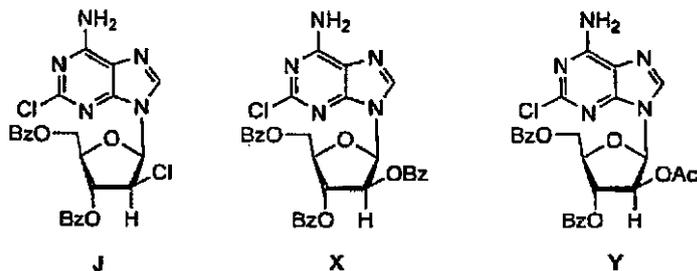
Entrada	Agente de fluoración	Aditivo(s) base	Disolvente, Temperatura, Tiempo	Relación de H a J en sólido aislado (relación en disolución)	% de área HPLC de J en disolución de reacción (% de área HPLC de J en H bruto)	Rendimiento aislado {% de área HPLC de J en H recristalizado}
9	6 eq. 3HF.Et ₃ N	4 eq. DIPEA	EtOAc, 80°C, 3,5 h	123:1 (139:1)	0,47%	59%
10	6 eq. 3HF.Et ₃ N	4 eq. N-Metilimidazol	EtOAc, 80°C, 7 h	111:1 (108:1)	0,60%	54%
11	6 eq. 3HF.Et ₃ N	4 eq. DBU	EtOAc, 80°C, 4,5 h	137:1 (140:1)	0,37%	49%
12	3 eq. 3HF.Et ₃ N	4 eq. Et ₃ N	EtOAc, 80°C, 7 h	100:1 (103:1)	0,60%	61%
13	6 eq. 3HF.Et ₃ N	4 eq. Et ₃ N	EtOAc, 80°C, 4,5 h	114:1 (94:1)	0,70%	58%
14	6 eq. 3HF.Et ₃ N	6 eq. guanidina	EtOAc, 80°C, 4,5 h	61:1 (62:1)	0,73%	47%
15	6 eq. 3HF.Et ₃ N	4 eq. guanidina	EtOAc, 80°C, 6 h	(115:1)	0,40%	-
16	6 eq. 3HF.Et ₃ N	4 eq. Carbonato de guanidina	EtOAc, 80°C, 12 h	215:1 (235:1)	0,28%	50%
17	6 eq. 3HF.Et ₃ N	2 eq. carbonato de guanidina 3 eq. Et ₃ N	EtOAc, 80°C, 4,5 h	580:1	(0,14%)	51%
18	9 eq. 3HF.Et ₃ N	4 eq. carbonato de guanidina 3 eq. Et ₃ N	EtOAc, 80°C, 10 h	455:1	(0,16%)	57%
19	6 eq. 3HF.Et ₃ N	4 eq. carbonato de guanidina 2,0 eq. Et ₃ N	EtOAc, 80°C, 12 h	684:1	(0,11%)	56% {0,07%}
20	6 eq. 3HF.Et ₃ N	4,0 eq. carbonato de guanidina	EtOAc, 80°C, 12 h	919:1	(0,08%)	60% {0,07%}

Así, otra realización de esta invención es el uso de 3HF.Et₃N junto con una base amina o aditivo de sal de amina, o los dos, preferiblemente carbonato de guanidina y una base amina tal como Et₃N y lo más preferiblemente carbonato de guanidina, para la fluoración de triflato **G** para proporcionar fluoruro **H**. Esto proporciona una alta relación HPLC del fluoruro **H** a impureza **J** de cloro en el sólido aislado, no recristalizado, (referido como **H** bruto), preferiblemente >200:1, más preferiblemente >500:1, lo más preferiblemente >900:1, así como una baja pureza HPLC total de impureza **J** de cloro en **H** bruto (es decir, no recristalizado) preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 0,3 % de área por HPLC como se observa en la Tabla 2. Otro aspecto de esta realización es que el compuesto **H** se cristaliza para proporcionar compuesto **H** que se conforma a una especificación de pureza específica de pureza HPLC preferiblemente >99,0%, más preferiblemente >99,5% y lo más preferiblemente >99,8% con compuestos **J**, **X** e **Y** cada uno de manera individual a <=0,1% de pureza HPLC. Esto asegura que se pueda obtener clofarabina con

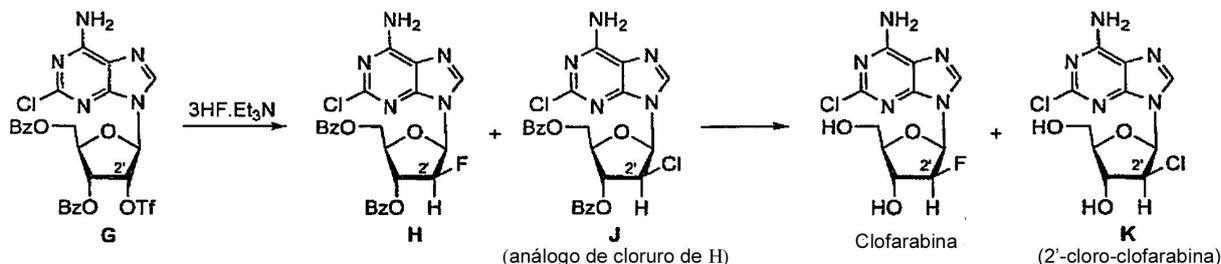
5

10

pureza aceptable.



- 5 La síntesis de clofarabina por uso de esta invención transcurre en el mismo número de etapas que las rutas de la técnica anterior competitivas (contando **A** (también conocida como **13**) como el material de partida) y el rendimiento total de carbohidrato **C** de partida (también conocido como **9**), incluyendo recristalización para proporcionar material de calidad API dispuesto para consumo humano, es aproximadamente 15%. En términos de rendimiento total, el procedimiento de esta invención es competitivo con los métodos de la técnica anterior. En términos de calidad API, la realización de esta invención permite que se fabrique clofarabina de alta calidad por diseño de la ruta de síntesis y operaciones de purificación (por ej., extracciones y cristalizaciones) para controlar las impurezas.



Esquema 9

10

En comparación con la técnica anterior, las realizaciones según la presente invención presentan las siguientes ventajas:

- 15 1. La presente solicitud proporciona una nueva propuesta a la síntesis de clofarabina. Típicamente, en las síntesis de clofarabina indicadas previamente, el sustituyente del átomo de flúor de C2' se pre-instala en el anillo de carbohidrato antes de que se condense el anillo de carbohidrato con la nucleobase. Por contraste, según una realización de la presente invención, el sustituyente flúor se instala posterior a la fusión de carbohidrato y nucleobase. Esto significa que el estereoisómero α -N9 no deseado no se forma sustancialmente.
- 20 2. A diferencia de la mayoría de las síntesis de clofarabina indicadas previamente, el procedimiento según una realización de esta invención no requiere cromatografía. Esto es importante debido a que la cromatografía típicamente exige mucho tiempo y típicamente utiliza volúmenes de disolvente relativamente grandes, que dan como resultado un procedimiento más costoso y menos compatible con el medio ambiente. Por razones de coste, medioambientales y reguladoras se deben recuperar o disponer los disolventes de la cromatografía gastados de los que pueden ser costosos. La ausencia de la necesidad de cromatografía como un método de purificación según una
- 25 3. Conversión del 2',5'-di-O-benzoil-regioisómero (**E**) no deseado en el 3',5'-di-O-benzoil-isómero (**F**) deseado por una isomerización térmica heterogénea controlada de manera analítica (una mezcla que comprende una fase sólida y una fase líquida), aumentando de ese modo el rendimiento total del 3',5'-di-O-benzoil-isómero (**F**) deseado que el producido en la reacción original en que se formó. Esto hace más eficaz el procedimiento total. Por control analítico de esta isomerización térmica se puede obtener el rendimiento más alto basado en la mezcla de compuestos **E** y **F**.
- 30 4. La presente solicitud describe una nueva modificación de condiciones de fluoración que reduce la cantidad de análogo (**J**) de cloruro altamente no deseado de clofarabina **H** protegida por el uso específico de aditivo de
- 35

carbonato de guanidina. Esto da como resultado eficacia del procedimiento aumentada por reducción de la carga en las etapas de purificación posteriores.

5. Según una realización de esta invención, se obtiene API de clofarabina de alta calidad por control del perfil de impurezas de los precursores **E** y **H** y la pureza HPLC total de precursor **H**. El control de la calidad de estos precursores asegura que se pueda obtener API de alta calidad que satisfaga la especificación requerida. La pureza de clofarabina misma es difícil de mejorar cuando se contamina con diversas impurezas del procedimiento, tales como cloruro **K** y estereoisómeros, tales como 2-cloro-9-(β-D-arabinofuranosil)-adenina.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación de 2',3',5'-tri-O-benzoil-2-cloroadenosina (**D**).

- 10 En una atmósfera de N_{2(g)}, se agitaron 2-cloroadenosina (**A** (**9**), 50 g, 294,9 mmoles), MeCN (600 ml) y BSTFA (227,5 g, 883,8 mmoles) y se calentó para hacerlo hervir a reflujo hasta que la mezcla se volvió en su mayor parte clara (aproximadamente 1 h). Se añadieron TfOH (8,77 g, 58,5 mmoles) y 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosa (**C**, 142,5 g, 282,5 mmoles) de manera secuencial a la mezcla y se agitó a reflujo durante aproximadamente 1 h. La mezcla se enfrió a 20-35°C y se diluyó con MTBE (500 ml) y se lavó durante un periodo de 0,5 a 1 h con NaHCO₃ saturado (750 ml). La fase orgánica se evaporó a vacío a 40 a 50°C para proporcionar 2',3',5'-tri-O-benzoil-2-cloroadenosina (**D**): RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,9-8,1 (m, 6 H), 7,94 (s, 1 H), 7,3-7,6 (m, 9 H), 6,45 (d, J=2,7 Hz 1 H), 6,15 (m, 2 H), 5,30 (s, 2 H), 4,90 (dd, J_{4',5a}=3,2 Hz, J_{5'a,5'b}=12,0 Hz, 1 H), 4,82 (m, 1 H), 4,72 (dd, J_{4',5a}=4,1 Hz, J_{5'a,5'b}=12,0 Hz, 1 H); RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 166,3; 165,5; 165,4; 156,4; 154,7; 151,1; 139,1; 134,1; 134,1; 133,8; 130,2; 130,1; 129,9; 129,4; 129,0; 128,8; 128,5; 119,1; 86,5; 81,3; 74,6; 71,7; 64,0.

- 20 Ejemplo 2 - Preparación de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**).

- A 2',3',5'-tri-O-benzoil-2-cloroadenosina (**D**) preparada anteriormente se cargó AcOH (277 g), piridina (1.109,6 g) e hidrato de hidrazina al 80% (73,8 g, 1,18 moles) a temperatura ambiente. La mezcla se calentó a 75 a 80°C en una atmósfera de N_{2(g)} hasta que la pureza HPLC de compuesto **F** dejó de aumentar dentro de un periodo de 2 h (normalmente requirió entre 6 y 10 h). Se enfrió la mezcla a 35°C y se diluyó con MIBK (3.774,4 g) y se lavó después a <35°C con H₂SO₄ 2 N (3.378 ml) para retirar hidrazina y piridina. Se lavó la fase orgánica con NaHCO₃ saturado (1.734 ml) hasta que la cantidad de AcOH en la fase de disolución orgánica no fue mayor que 0,5% en peso, cuando se determina por ensayo de GC. Se evaporó la fase orgánica a vacío a 65°C hasta que no se recogió más destilado para proporcionar una mezcla de aproximadamente 2:1 de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) y 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**E**) que contenía algún MIBK residual (típicamente aproximadamente 2 volúmenes).

Ejemplo 3a - Enriquecimiento de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) de una mezcla de 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**E**) y 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**).

- Se cargó MeOH (356,4 g) a la mezcla de 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**E**) y 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) preparada anteriormente y se agitó la mezcla heterogénea resultante a aproximadamente 65°C hasta la cantidad de **E** en la fase de disolución, cuando se determina por ensayo, no disminuyó de manera significativa dentro de un periodo de 2 h (esto llevó aproximadamente 10 horas). La mezcla heterogénea se enfrió a entre 20 y 25°C y se filtró y se lavó la torta de masa filtrante dos veces con MeOH (11,09 g cada uno) y se secó a vacío a 50-60°C durante entre aproximadamente 8 h. Usando este protocolo, la 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) sólida, aislada, fue aproximadamente típicamente aproximadamente 94-96% pura por HPLC y la 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**E**) fue aproximadamente 2-4% pura por HPLC.

Ejemplo 3b - Enriquecimiento de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) de una mezcla de 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**E**) y 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) por isomerización.

- 45 A una mezcla de 1,0 g de 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**E**) (27,4% de pureza por HPLC) y 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) (47,0% de pureza por HPLC) se añadió MeOH (20 ml) y la mezcla heterogénea resultante se agitó a temperatura de reflujo (aproximadamente 65°C) durante 66 horas. La mezcla heterogénea se enfrió a temperatura ambiente y se filtró y se secó proporcionando 0,62 g de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) (95,6% de pureza por HPLC; rendimiento del 126% calculado basado en compuesto **F** o rendimiento del 80% calculado basándose en los compuestos **E** y **F** en la mezcla original). El líquido filtrado contenía compuesto **F** al 1,6% de pureza por HPLC y compuesto **E** al 5,8% de pureza por HPLC.

Ejemplo 3c - Enriquecimiento de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) de una mezcla de 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**E**) y 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) usando luz infrarroja.

Una mezcla sólida de 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**E**) (21,1% por HPLC) y 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) (70,8% por HPLC) se irradió con luz infrarroja (lámpara de 250 W con índice de potencia de 0,5 KW colocada aproximadamente 20 cm del sólido) a aproximadamente 60°C (temperatura del aire) durante 10,5 h proporcionando una mezcla de 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**E**) (17,2% por HPLC) y 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) (78,7% por HPLC) 17,5% de 3-OH y 79% de 2-OH. La reacción de isomerización fue seguida por análisis HPLC y se muestran los datos para las muestras tomadas a intervalos específicos en la tabla a continuación:

Tiempo	Compuesto (E) ^a	Compuesto (F) ^a
0 h	21,1%	70,8%
2 h	20,7%	71,9%
5 h	18,2%	73,7%
10,5 h	17,2%	78,7%

a. Porcentaje de área, cuando se determina por análisis HPLC.

Ejemplo 3d - Isomerización de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) a una mezcla de 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**E**) y 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**).

Una disolución de 0,5 g de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) (90,2% de pureza por HPLC; que contiene 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**E**) de 4,0% de pureza HPLC en sec-butanol (10 ml) a aproximadamente 100°C se agitó durante 25,5 horas. El análisis HPLC de la disolución mostró que estaba constituida por una mezcla de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) (60,7%) y 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**E**) (32,4%). El enfriamiento de la disolución a temperatura ambiente (aproximadamente 10°C) proporcionó 0,3 g de sólido después de filtración contenía 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) al 96,8% (pureza por HPLC).

Ejemplo 4 - Cristalización de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**).

La 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) sólida bruta preparada anteriormente en el EJEMPLO 3a se disolvió en DMSO (825 g, 750 ml) y después se añadió MeOH (4.118,4 g) gota a gota a aproximadamente 20 a 25°C. 30 Minutos más tarde, se filtró la mezcla heterogénea y se lavó la torta de masa filtrante dos veces con MeOH (332,6 g cada uno) y se secó a vacío a 60°C durante 4 a 6 h. Se obtuvo 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) (199,8 g, rendimiento del 45,2% basado en 2',3',5'-tri-O-benzoil-2-cloroadenosina (**D**) usada en el Ejemplo 2) con 97,4% de pureza por HPLC y la 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**E**) fue 0,05% de pureza por HPLC. RMN de ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ 8,4 (s, 1 H), 8,11 (d, J=7,2 Hz), 7,98 (d, J=7,7 Hz), 7,89 (s, 2 H), 7,69 (m, 2 H), 7,58 (m, 2 H), 7,52 (m, 2 H), 6,10 (d, J=6,1 Hz, 1 H), 6,03 (d, J=6,0 Hz, 1 H), 5,70 (dd, J=4,1 Hz, 5 Hz, 1 H), 5,13 (dd, J= 6,0; 12,0 Hz, 1 H), 4,61-4,72 (m, 3 H).

Ejemplo 5 - Preparación de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-2'-O-trifluorometilsulfonyl-β-D-ribofuranosil)-adenina (**G**).

A una mezcla heterogénea de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**) cristalizada (65 g, pureza: 94,7% por A% HPLC, 120,7 mmoles) en DCM (650 ml) y piridina (65 ml) a aproximadamente 0 a 20°C en una atmósfera de N_{2(g)} se añadió Tf₂O (85,1 g, 301,6 mmoles) gota a gota mientras se mantenía la temperatura dentro del intervalo de 0 a 20°C. La mezcla se volvió clara y se estimó que la reacción era completa cuando la pureza HPLC de **F** no fue mayor que 1%. Se lavó la mezcla con NaHCO₃ saturado (325 ml) y se lavó la fase orgánica con H₂SO₄ 2 N (325 ml) a temperatura ambiente. Se secó la fase orgánica usando tamices moleculares de 3Å hasta que el valor de la valoración de Karl Fischer fue ≤1.000 ppm. Se evaporó la fase orgánica a vacío a 40°C hasta que quedaban aproximadamente 290 g de residuo (incluyendo aproximadamente 130 ml de DCM). Se usó el residuo directamente en la etapa a continuación. La pureza típica de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-2'-O-trifluorometilsulfonyl-β-D-ribofuranosil)-adenina (**G**) fue ≥95% y el rendimiento fue ≥95%. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8,11 (dd, J = 8,3; 1,2 Hz, 2H), 7,98 (dd, J = 8,3; 1,2 Hz, 2H), 7,87 (s, 1H), 7,70 - 7,60 (m, 1H), 7,59 - 7,46 (m, 3H), 7,41 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 6,34-6,23 (m, 2H), 6,16 (dd, J = 5,3; 3,2 Hz, 1H), 6,07 (a s, 2H), 4,86 (dd, J = 12,2; 3,3 Hz, 1H), 4,81 - 4,74 (m, 1H), 4,65 (dd, J = 12,2; 4,2 Hz, 1H).

Ejemplo 6 - Preparación de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-adenina (**H**)

Al residuo de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-2'-O-trifluorometilsulfonyl-β-D-ribofuranosil)-adenina (**G**) preparada anteriormente se cargó EtOAc (697,5 g) y carbonato de guanidina (87 g, 482,9 mmoles) a temperatura ambiente y la mezcla se calentó a 60°C. Se añadió 3HF.Et₃N (116,7 g, 723,9 mmoles) gota a gota a la mezcla (durante un periodo de 0,5 a 1 h), después se calentó la mezcla para hacerla hervir a reflujo (80°C) hasta que la pureza HPLC de compuesto **G** no fue mayor que 3% (requirió aproximadamente 10 h). La mezcla de reacción se enfrió por debajo de

35°C y se añadió NaHCO₃ saturado (775 ml) gota a gota. Se filtró la mezcla para ayudar a la separación de fases y se extrajo la fase acuosa con EtOAc (232,5 ml). La fase orgánica combinada se evaporó a vacío a 40°C hasta que hubo aproximadamente 200 g (incluyendo aproximadamente 150 ml de EtOAc) de residuo restante. Se disolvió el residuo en MeOH (450 ml) con reflujo y después se filtró caliente. El líquido filtrado se enfrió para permitir la precipitación y se mantuvo a aproximadamente 50°C durante otras 2 h. Se enfrió la mezcla heterogénea a aproximadamente 20 a 25°C durante un periodo de 2 h y después se mantuvo a esta temperatura durante 6 h. Se filtró la mezcla heterogénea y se lavó la torta de masa filtrante dos veces con MeOH (50 ml cada uno). Se secó el sólido a vacío a 60°C durante aproximadamente 4 a 6 h para proporcionar 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-adenina (**H**) con una pureza por HPLC de 98% junto con ≤0,10% de pureza de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-2'-desoxi-2'-cloro-β-D-arabinofuranosil)-adenina (**J**). La 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-adenina (**H**) se recrystalizó de una mezcla de EtOAc y MeOH (1:3 v/v, 600 ml) para reducir además la pureza total de 2-cloro-9-(2',3',5'-tri-O-benzoil-β-D-arabinofuranosil)-adenina y 2-cloro-9-(2'-O-acetil-3',5'-di-O-benzoil-β-D-arabinofuranosil)-adenina a no más de 0,15%. El rendimiento fue 44,4% basado en 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (**F**). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8,0-8,1 (m, 5 H), 8,0 (s, 1 H), 7,3-7,6 (m, 5 H), 6,61 (t, J=2,85 Hz, 1 H), 6,54 (d, J=2,4Hz, 2 H), 5,75 (dd, J= 2,1; 17,1 Hz, 1 H), 5,37 (dd, J=2,7 Hz, 49,8 Hz, 1 H), 4,81 (d, J=4,2 Hz, 1 H), 4,57 (m, 1H).

Ejemplo 7 - Preparación de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-adenina (clofarabina).

Una mezcla de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-adenina (H) (5 g) y 29% de MeONa/MeOH (0,11 g) en MeOH (75 ml) se agitó a entre 30 a 40°C hasta que la reacción se completó (dentro de aproximadamente 1-3 h). Se añadió AcOH (0,035 g) y se evaporó la mezcla a 30 a 40°C a vacío hasta que hubo aproximadamente 25 g (incluyendo aproximadamente 5 volúmenes de MeOH) de mezcla heterogénea restante. La mezcla se enfrió a 0 a 20°C y se filtró después de 2 h. Se lavó la torta de masa filtrante dos veces con MeOH (5 ml cada uno) y se secó a vacío a 60°C para proporcionar 2,6 g de clofarabina como un sólido blanco con 99,8% de pureza por HPLC con rendimiento del 86,7% basado en compuesto H. Se disolvió la clofarabina bruta (2,6 g) en agua (104 ml) a aproximadamente 80°C y se filtró caliente a aproximadamente 70-80°C. Se enfrió lentamente el líquido filtrado para cristalizar la clofarabina y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se filtró la mezcla, se lavó con MeOH (5,2 ml) y se secó a vacío para proporcionar clofarabina (2,1 g) con rendimiento de ca. 80% con 99,8% de pureza por HPLC. RMN de ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ 8,27 (dd, 1 H, H8, J=1,8 Hz), 6,33 (dd, J=4,8 Hz, J=13,8 Hz, 1 H), 5,95 (d, J=5,1 Hz, 1 H), 5,21 (dt, J=4,2 Hz, J=52,8 Hz, 1 H), 5,08 (t, J=5,7 Hz, 1 H), 4,42 (dc, J=19,1 Hz, 1 H), 3,83 (m, J=5,1 Hz, 1 H), 3,65 (m, J=6,0 Hz, J=11,7 Hz, 2 H).

Las referencias discutidas anteriormente son:

¹ Wright J. A., Taylor N. F. and Fox J. J. *J. Org. Chem.* **1969**, *34* (9), 2632-2636.

² Anderson C.D., Goodman L. and Bake B. R. *J. Amer. Chem. Soc.* **1958**, *80* (19), 5247-5252.

³ Watanabe K. A., Chu C. K. and Fox J. J. (Sloan-Kettering Institute for Cancer Research), US 4,751,221 (**1988**).

⁴ Reichman U., Watanabe K. A. and Fox J. J., *Carbohydr. Res.* **1975**, *42*, 233-240.

⁵ Montgomery J. A., Shortnacy A. T., Carson D. A. and Secrist J. A., *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2389-2392.

⁶ Howell H.G., Brodfuehrer P. R., Brundidge S. P., Sapino C. J., *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2597-2598; Tann C. H., Brodfuehrer P. R., Brundidge S. P., Sapino C. J. and Howell H.G., *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3644-3647.

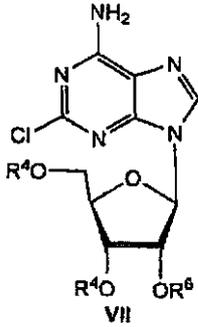
⁷ Tann C. H., Brodfuehrer P. R., Brundidge S. P., Sapino C. J. and Howell H.G. *J. Org. Chem.*

- 1985, 50, 3644-3647; Howell H.G., Brodfuehrer P. R., Brundidge S. P., Benigni D. A. and Sapino C. J., *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 85-88.
- ⁸ Montgomery, J. A., Shortnacy-Fowler, A. T., Clayton, S. D., Riordan, J. M. and Secrist III, J. A., *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 397-401; Montgomery J. A. and Secrist J. A. (Southern Research Institute), WO 9014352 A1 and US 5,034,518.
- ⁹ Montgomery J. A., Fowler A. T., Secrist, III, J. A., (Southern Research Institute), US 6,949,640 (**2005**) and US 7,470,784 (**2008**).
- ¹⁰ Bauta W. E., Schulmeier B. E., Puente J. F., Cantrell W. R., Jr., Lovett D., Goebel J., Anderson B., Ionescu D. and Guo R., *Org. Proc. Res. Dev.*, **2004**, 8, 889-896; William E.B., Burke B. D., Schulmeier B. E., Cantrell W. R., Jr., Lovett D., Puente J. (ILEX Products, Inc.), US 6,680,382 (**2004**).
- ¹¹ Ishido Y., Nakazaki N. and Sakairi N., *J.C.S., Perkin Trans. I*, **1979**, 2088-2098.
- ¹² Ishido Y., Sakairi N., Okazaki K., and Nakazaki N., *J.C.S., Perkin Trans. I*, **1980**, 563-573.
- ¹³ Sakairi N, Rahman, Md. D, Tamaki K., and Ishido Y., *Nucleosides & Nucleotides*, **1982**, 1, 99-110.
- ¹⁴ Ishido Y., Sakairi N, and Hirao I., *Nucleic Acids Research*, Special publication No. 5, **1978**, s263-265.
- ¹⁵ Bauman J. G. and Wirsching R. C. (Schering Aktiengesellschaft, Berlin), US 5,602,246 (**1997**).
- ¹⁶ McClinton, M. A., *Aldrichimica Acta*, **1995**, 28, 31-35.
- ¹⁷ Yoneda, N., *Tetrahedron*, **1991**, 47, 5329-5365.

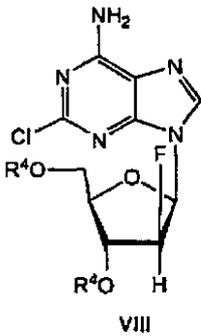
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento que comprende:

mezclar carbonato de guanidina, un agente de fluoración y un compuesto de la fórmula VII:

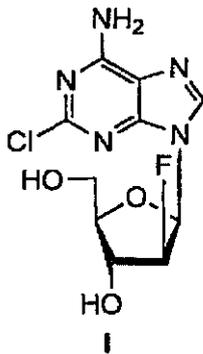


5 , en la que cada R⁴ es independientemente un grupo protector de hidroxilo, OR⁶ es un grupo saliente para obtener un compuesto de la fórmula VIII:

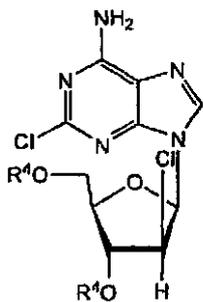


, en la que R⁴ es como se definió anteriormente.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además una etapa de desprotección del compuesto de la fórmula VIII para obtener clofarabina de la fórmula I:



10 3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que el compuesto de la fórmula VIII usado en la etapa de desprotección comprende no más de 0,10% por HPLC de un compuesto de la fórmula IX:

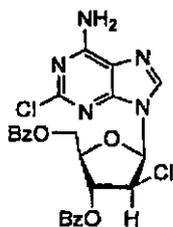


IX

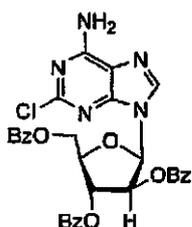
, en la que R⁴ es como se definió anteriormente en la reivindicación 1.

4. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que el compuesto de la fórmula VIII que se tiene que desproteger presenta una pureza por HPLC de al menos 99% (área de pico).

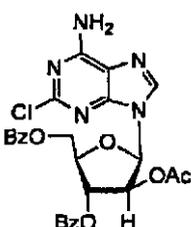
5. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que el compuesto de la fórmula VIII que se tiene que desproteger contiene no más de 0,1% por HPLC de un compuesto de la fórmula J, no más de 0,1% por HPLC de un compuesto de la fórmula X, no más de 0,1% por HPLC de un compuesto de la fórmula Y y no más de 0,15% por HPLC (área de pico) de la cantidad total del compuesto de la fórmula X y el compuesto de la fórmula Y:



J



X

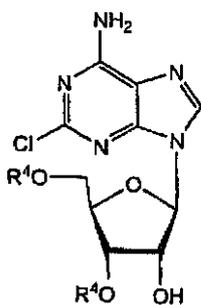


Y

6. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente de fluoración es HF o una mezcla de HF y una base de Lewis orgánica.

7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que la base de Lewis orgánica es una amina.

8. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de la fórmula VII se prepara derivatizando un compuesto de la fórmula (V)

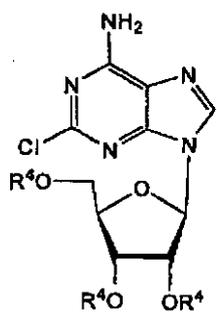


V

, en la que R⁴ es como se definió anteriormente en la reivindicación 1.

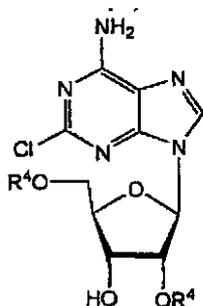
9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que el compuesto de la fórmula (V) se prepara por un procedimiento que comprende:

1) desproteger parcialmente un compuesto de la fórmula (IV):



IV

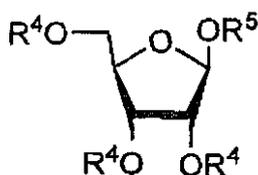
para obtener una primera mezcla de reacción que comprende el compuesto de la fórmula (V) y un compuesto de la fórmula (VI)



VI

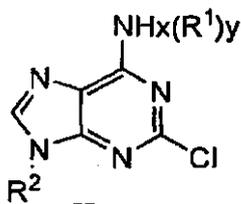
- 2) isomerizar el compuesto de la fórmula VI en la mezcla obtenida en la etapa 1) al compuesto de la fórmula V en un disolvente a una temperatura elevada para obtener una segunda mezcla de reacción y
- 3) aislar el compuesto de la fórmula (V) de la segunda mezcla de reacción.

10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que el compuesto de la fórmula (IV) se prepara por: acoplamiento de una ribofuranoza protegida de la fórmula III:



III

en la que R⁴ es como se definió anteriormente, OR⁵ es un grupo saliente, con una 2-cloroadenina silylada de la fórmula II:

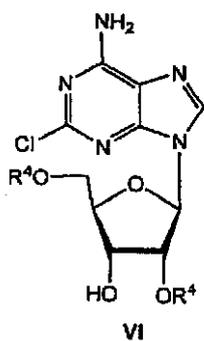


II

, en la que R¹ es Si(R³)₃, R² es hidrógeno o R¹, R³ es alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilo o heteroarilo y contiene 1 a 20 átomos de carbono y x es 0 ó 1 mientras y es 2 ó 1, respectivamente, en presencia de un ácido de Lewis o un ácido de Brönsted.

11. Un procedimiento que comprende:

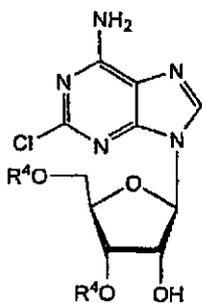
- 1) mezclar un disolvente y un compuesto de la fórmula VI



VI

en la que cada R⁴ es independientemente un grupo protector de hidroxilo, para obtener una primera mezcla;

2) calentar la primera mezcla de la etapa 1) durante un periodo de tiempo suficiente de manera que una cantidad sustancial del compuesto de la fórmula VI se isomeriza a un compuesto de la fórmula (V)



V

5 en la que cada R⁴ es como se definió anteriormente, para obtener una segunda mezcla que comprende el compuesto de la fórmula (VI) y el compuesto de la fórmula (V) y

3) aislar el compuesto de la fórmula (V) de la segunda mezcla para obtener un compuesto aislado de la fórmula (V) y una tercera mezcla que comprende el compuesto de la fórmula (VI).

10 12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que la etapa de calentamiento se realiza durante al menos 5 horas.

15 13. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que el disolvente se selecciona de manera que la primera mezcla es heterogénea durante la etapa de calentamiento, el compuesto de la fórmula (V) está sustancialmente menos disuelto en el disolvente que el compuesto de la fórmula (VI) durante la etapa de calentamiento, pero el compuesto de la fórmula (V) es suficientemente insoluble y el compuesto de la fórmula (VI) es suficientemente soluble en el disolvente cuando la temperatura elevada se disminuye para efectuar el aislamiento del compuesto de la fórmula (V) por cristalización selectiva.

14. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que durante la etapa de calentamiento, la primera mezcla es heterogénea y el compuesto de la fórmula (VI) se isomeriza al compuesto de la fórmula (V) hasta que el nivel del compuesto de la fórmula (VI) en la fase de disolución de la segunda mezcla alcanza un estado estacionario.

20 15. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que el disolvente se selecciona de manera que la primera mezcla está en forma de una disolución homogénea durante la etapa de calentamiento, pero el compuesto de la fórmula (V) es sustancialmente insoluble y el compuesto de la fórmula (VI) es sustancialmente soluble en el disolvente cuando la temperatura elevada se disminuye para efectuar el aislamiento del compuesto de la fórmula (V) por cristalización selectiva.

25 16. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que el disolvente se selecciona del grupo que consiste en un alcohol inferior (C₁-C₆), DMSO y combinaciones de los mismos.

17. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que la primera mezcla cuando se calienta está en forma de una disolución homogénea y el procedimiento comprende repetir al menos una vez las etapas 1)-3) para tratar la tercera mezcla.

30 18. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que la primera mezcla se calienta a una temperatura de aproximadamente 35°C a 120°C.

19. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que la primera mezcla se calienta a la temperatura de reflujo

del disolvente.

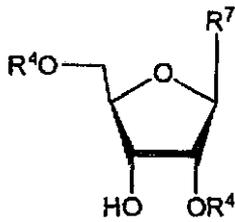
20. El procedimiento según la reivindicación 11, que comprende además una etapa de conversión del compuesto de la fórmula (V) en clofarabina.

5 21. El procedimiento según la reivindicación 11, que comprende además una etapa de recristalización del compuesto aislado de la fórmula (V) de al menos un disolvente de manera que la cantidad de ácido acético residual en el compuesto recristalizado de la fórmula (V) se controla a no más de 0,5% en peso por ensayo de GC.

22. El procedimiento según la reivindicación 21, en el que al menos un disolvente es una mezcla de DMSO y MeOH.

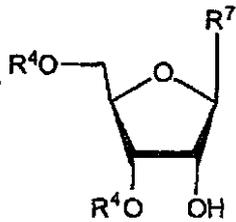
23. Un procedimiento que comprende:

1) irradiar un compuesto de la fórmula VIb en una forma sólida:



VIb

10 en la que cada R⁴ es independientemente un grupo protector de hidroxilo y R⁷ es 2-cloro-adenin-9-ilo con radiación electromagnética de manera que se isomeriza al menos una cantidad parcial del compuesto de la fórmula VIb a un compuesto de la fórmula (Vb)



Vb

en la que cada R⁴ y R⁷ son como se definió anteriormente y

2) aislar el compuesto de la fórmula (Vb) del compuesto de la fórmula (VIb).

15 24. El procedimiento según la reivindicación 23, en el que la radiación electromagnética es radiación infrarroja.