

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 380**

51 Int. Cl.:

C07H 19/173 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2010 E 10809432 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2467391**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de cladribina**

30 Prioridad:

18.08.2009 US 234683

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.05.2016

73 Titular/es:

**SCINOPHARM (KUNSHAN) BIOCHEMICAL
TECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)
No. 88 Weiye Road Kunshan
Jiangsu 215300, CN**

72 Inventor/es:

**HENSCHKE, JULIAN PAUL;
ZHANG, XIAOHENG;
CHU, GUODONG;
MEI, LIJUN y
CHEN, YUNGFA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 572 380 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

Procedimiento para la preparación de cladribina

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. número de serie 61/234.683 presentada el 18 de agosto, 2009.

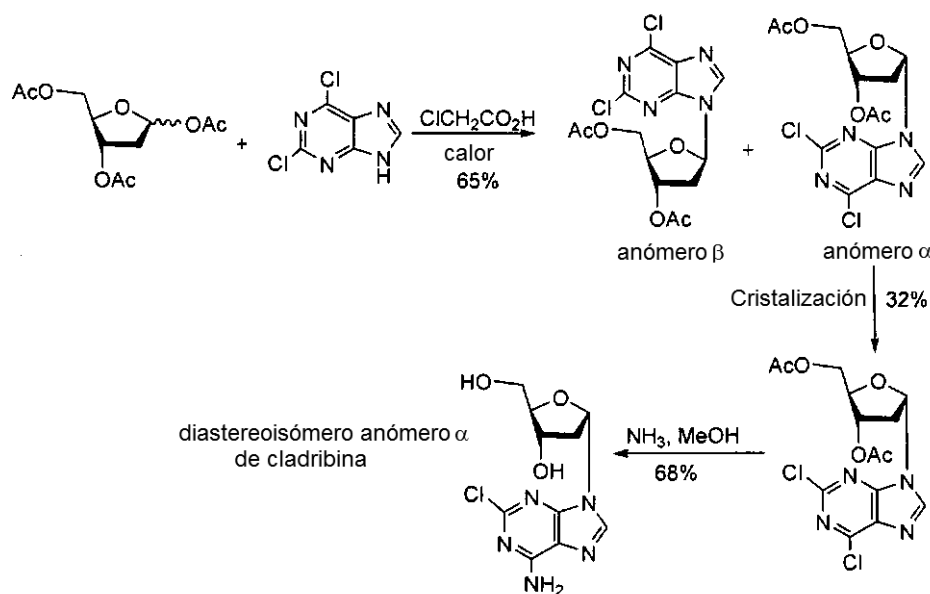
Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

10 La presente solicitud se refiere a la síntesis de la 6-amino-2-cloro-9-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-purina de calidad API (ingrediente farmacéutico activo), conocida de otra manera como cladribina (I), CdA y 2-cloro-2'-desoxiadenosina, que se puede usar a escala de fabricación.

Descripción de la técnica relacionada

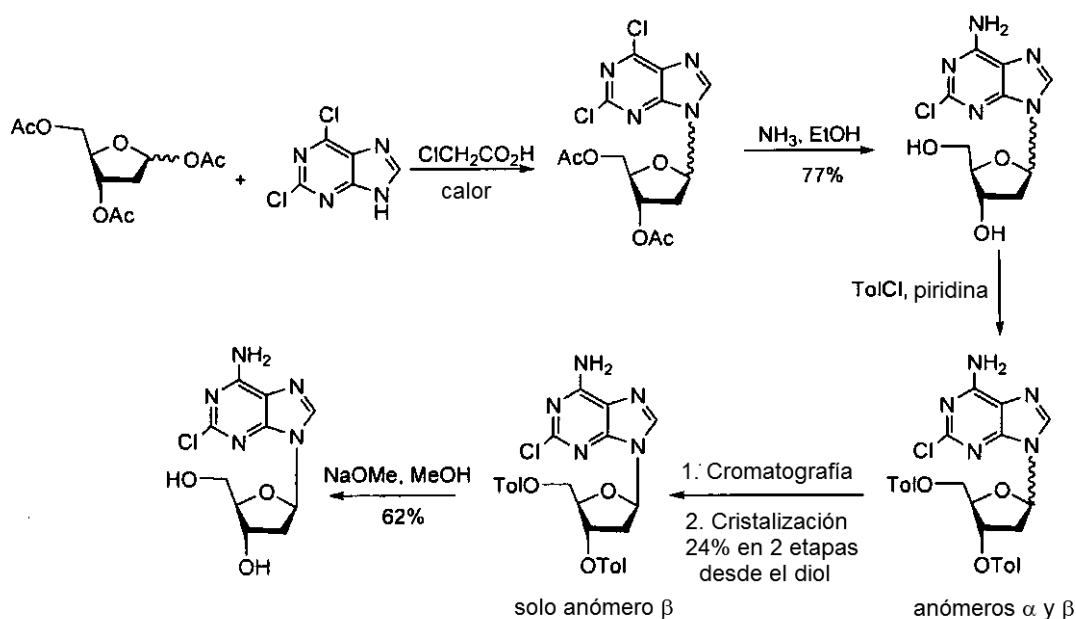
15 Previamente, Robins y Robins (Robins, M. J. y Robins, R. K., *J. Am. Chem. Soc.* 1965, 87, 4934-4940) describieron que la fusión catalizada por ácido de la 1,3,5-tri-O-acetil-2-desoxi-D-ribofuranosa y 2,6-dicloropurina daba un rendimiento de 65% de una mezcla anomérica de 2,6-dicloro-9-(3',5'-di-O-acetil-2'-desoxi-α-β-D-ribofuranosil)-purinas, a partir de la cual se obtenía el anómero α en forma de un producto cristalino puro por cristalización fraccionada en etanol con 32% de rendimiento y el anómero β equivalente permanecía en las aguas madre (véase el esquema 1). El anómero β, que se podría haber usado para sintetizar la cladribina, no se aislaba más. El anómero α se trataba con amoníaco en metanol lo que producía la desacetilación y aminación simultáneas, para dar la 6-amino-2-cloro-9-(2'-desoxi-α-D-ribofuranosil)-purina, que es un diastereoisómero de la cladribina.



20

Esquema 1 - Síntesis del anómero α de la cladribina de Robins, 1965.

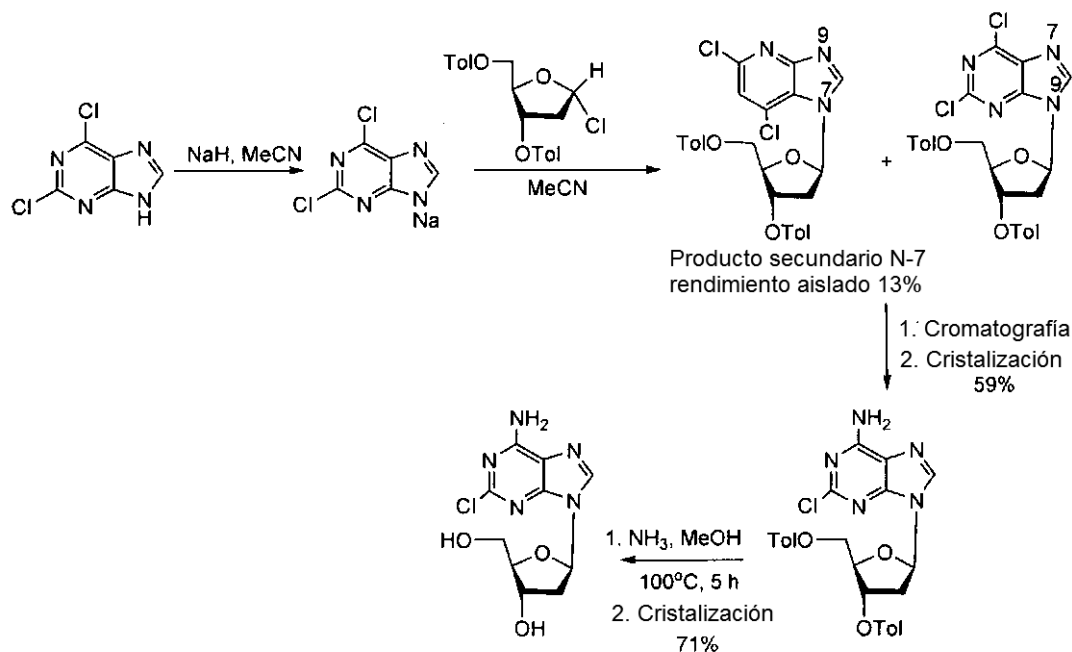
25 Broom et al. (Christensen, L. F., Broom, A. D., Robins, M. J., y Bloch, A., *J. Med. Chem.* 1972, 15, 735-739) adaptaron el método de Robins et al. tratando la mezcla acetilada (es decir, 2,6-dicloro-9-(3',5'-di-O-acetil-2'-desoxi-α,β-D-ribofuranosil)-purina) con amoníaco líquido y reacetilando las 2'-desoxi-α- y -β-adenosinas resultantes con cloruro de p-toluoilo (véase el esquema 2). La 2-cloro-9-(3',5'-di-O-p-toluoil-2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-adenina después se separó por cromatografía y la eliminación del grupo p-toluoilo produjo la cladribina con 9% de rendimiento total basado en la fusión de la 1,3,5-tri-O-acetil-2-desoxi-D-ribofuranosa y 2,6-dicloropurina.



Esquema 2 - Síntesis de cladribina de Brooms, 1972.

5 Para aumentar la estereoselectividad en favor del anómero β, Robins et al. (Robins, R. L. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 106, 6379-6382, US4760137, EP0173059) proporcionaron un método mejorado en el que se acoplaba la sal de sodio de la 2,6-dicloropurina con la 1-cloro-2-desoxi-3,5-di-O-p-toluoil-α-D-ribofuranosa en acetonitrilo (MeCN) para dar el nucleósido β protegido aislado con 59% de rendimiento, después de cromatografía y cristalización, además de 13% del regioisómero N-7 no deseado (véase el esquema 3). La selectividad aparentemente más alta en esta reacción de acoplamiento se atribuye a que es un desplazamiento S_N2 directo del ion cloruro por la sal de sodio de la purina. El 2'-desoxi-β-nucleósido N-9 se trató con amoníaco en metanol a 100°C para dar la cladribina con 42% de rendimiento total. El inconveniente de este procedimiento es que el nitrógeno nucleófilo de la posición 7 compite en la reacción de S_N2 con la posición 9 nucleófila, conduciendo a una mezcla de los isómeros N-7 y N-9-glicosilo, así como a la necesidad de cromatografía y cristalización para obtener el isómero deseado puro.

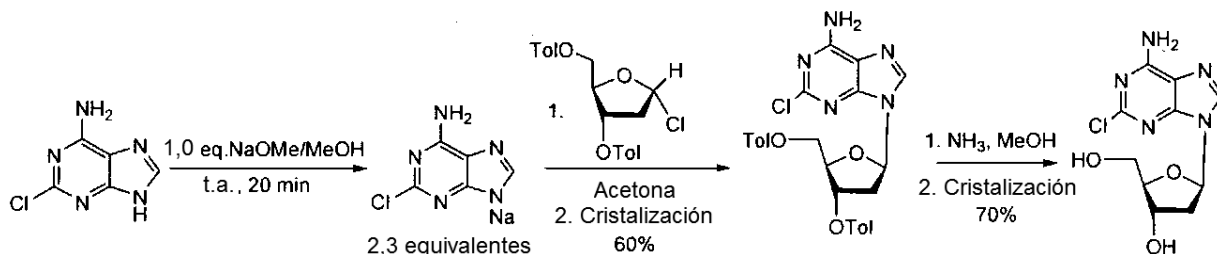
10



Esquema 3 - Procedimiento de S_N2 de Robins

15 Gerszberg y Alonso (Gerszberg S. y Alonso, D., documentos W00064918 y US20020052491) también usaban un procedimiento de S_N2 con 1-cloro-2-desoxi-3,5-di-O-p-toluoil-α-D-ribofuranosa, pero se acoplaba con la sal de sodio

de la 2-cloroadenina en acetona dando el anómero β deseado de la cladribina protegida con 60% de rendimiento después de cristalización en etanol (véase el esquema 4). Después de la etapa de desprotección usando amoníaco en metanol (MeOH), se aislaba el anómero β de la cladribina con un rendimiento total de 42% basado en el 1-cloroazúcar, y 30% si se calculaba basado en la sal de sodio, puesto que esta se usaba con un exceso molar de 2,3.



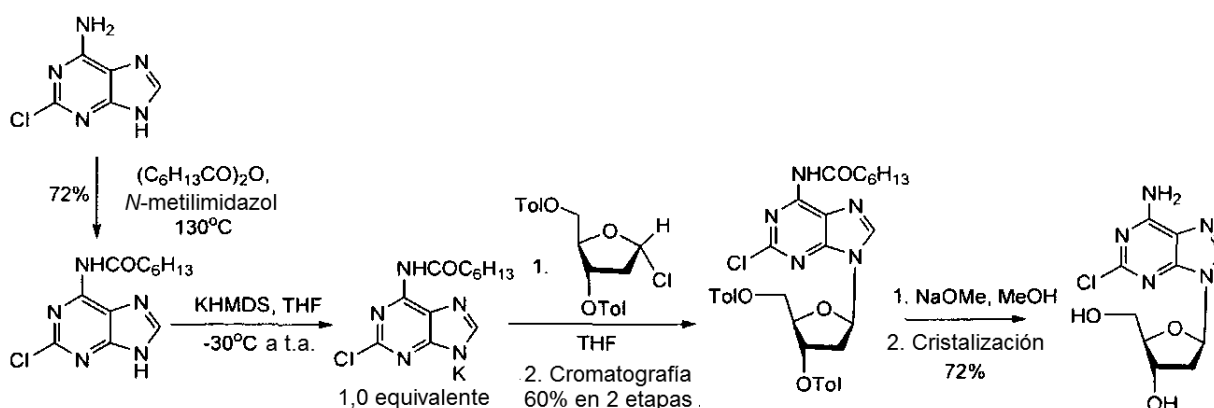
5

Esquema 4 - Síntesis de cladribina de Gerszberg y Alonso

Para aumentar la regioselectividad hacia la glicosilación en la posición N-9, Gupta y Munk (Gupta, P. K. y Munk, S. A., documentos US20040039190, W02004018490 y CA2493724) recientemente llevaron a cabo una reacción de S_N2 usando el anómero α anoméricamente puro, 1-cloro-2-desoxi-3,5-di-O-p-toluoil- α -D-ribofuranosa, pero acoplándolo con la sal de potasio de una purina modificada con 6-heptanoilamido (véase el esquema 5). El grupo alquilo voluminoso probablemente impartía impedimento estérico alrededor de la posición N-7, dando como resultado la regioselectividad mejorada descrita. A pesar de esto, después de desprotección, el rendimiento total de cladribina basado en el 1-cloroazúcar era 43%, no mostrando una gran mejora en el rendimiento total frente a métodos relacionados. Además, la 2-cloroadenina requería acilación previa con anhídrido heptanoico a alta temperatura (130°C) con 72% de rendimiento, y el acoplamiento requería enfriamiento criogénico (-30°C) y el uso de la base fuerte hexametildisilazida de potasio y le seguía la cromatografía en columna para purificar el producto cladribina protegido.

10

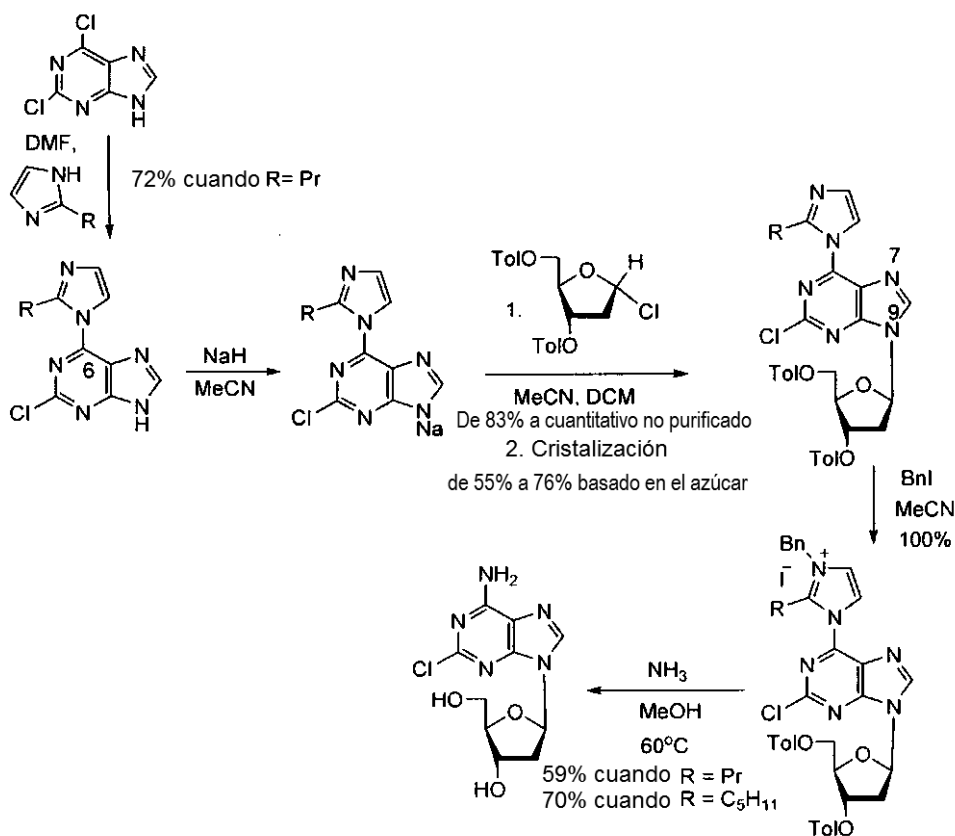
15



Esquema 5 - Síntesis de cladribina de Gupta y Munk

Más recientemente Robins et al. (Robins, M. J. et al, *J. Org. Chem.* 2006, 71, 7773-7779, US20080207891) publicaron un procedimiento para la síntesis de cladribina que pretendía lograr rendimientos casi cuantitativos en la glicosilación regioselectiva en N-9 de las sales de sodio de la 6-(imidazol-sustituido-1-il)-purina con 1-cloro-2-desoxi-3,5-di-O-p-toluoil- α -D-ribofuranosa en mezclas de MeCN/diclorometano (DCM) para dar cantidades pequeñas o no detectables del anómero α no deseado (véase el esquema 6). En realidad, esto solo se demostraba a escala de multimiligramos a varios gramos, y aunque el rendimiento del acoplamiento real después de cromatografía del anómero β -N-9 deseado era alto (de 83% a cuantitativo), los productos de 6-(imidazol-sustituido-1-ilo) protegidos se obtenían con rendimientos de 55% a 76% después de recristalización. Después de esto, se usaba yoduro de bencilo tóxico para activar los grupos 6-(imidazol-1-ilo) que después se desplazaban posteriormente con amoníaco a 60-80°C en amoníaco en metanol para dar la cladribina con 59-70% de rendimiento después de cromatografía de intercambio iónico y múltiples cristalizaciones, o después de extracción con DCM y cristalización. Aunque se demostró una alta glicosilación anomérica y regioselectiva, el procedimiento es más largo que las técnicas anteriores, no es económico en átomos y no es fácilmente aplicable a la síntesis industrial de la cladribina debido a la dependencia en la cromatografía y el requisito de un recipiente de presión en la sustitución de los grupos 6-(imidazol-sustituido-1-ilo).

30

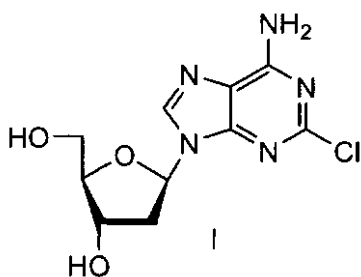


Esquema 6 - Síntesis de cladribina basada en 6-(imidazol-1-ilo) de Robins

Por lo tanto es necesario un procedimiento más directo, menos laborioso, que produzca la cladribina con buen rendimiento y alta pureza, que sea aplicable a escala industrial.

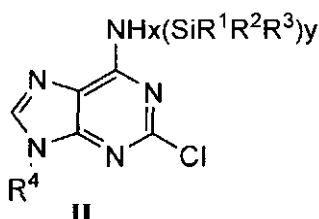
5 Resumen de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente solicitud, un procedimiento para hacer la cladribina de fórmula I



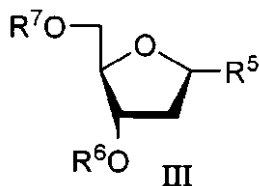
, comprende:

a) acoplar un compuesto de fórmula II



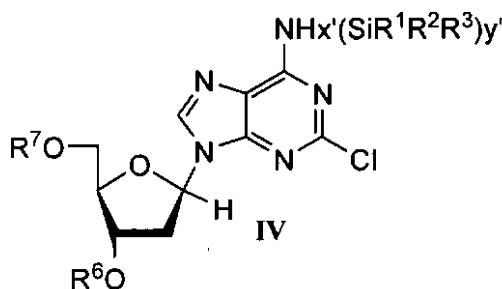
10 en donde cada uno de R¹, R² y R³ es independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, preferiblemente, cada uno de R¹, R² y R³ tiene independientemente 1-20 átomos de carbono, más preferiblemente, cada uno de R¹, R² y R³ es metilo, x es 0, 1 o 2, y es 2, 1 o 0, y R⁴ es hidrógeno o SiR¹R²R³, con la condición de que cuando x es 2, y es

0, R^4 es $\text{SiR}^1\text{R}^2\text{R}^3$, con una 2-desoxi-ribofuranosa protegida de fórmula III



5 en donde cada uno de R^6 y R^7 es independientemente un grupo protector de hidroxilo, y R^5 es un grupo lábil, en un disolvente orgánico y en presencia de un ácido de Brønsted o ácido de Lewis basado en ácido sulfónico, para obtener una mezcla de reacción que comprende

un anómero β de fórmula IV



en donde x' es 0, 1 o 2, y' es 2, 1 o 0;

10 b) precipitar selectivamente el anómero β de fórmula IV de la mezcla de reacción en presencia de MeCN para obtener una mezcla heterogénea;

c) aislar el anómero β de fórmula IV precipitado de la mezcla de reacción heterogénea para obtener el anómero β de fórmula IV aislado y sustancialmente enriquecido; y

d) convertir el anómero β de fórmula IV aislado y sustancialmente enriquecido para obtener la cladribina.

15 Preferiblemente, el grupo protector de hidroxilo puede ser un grupo acilo, tal como grupo benzoilo sustituido o no sustituido y grupo aroilo sustituido con halógeno, más específicamente el grupo 4-cloro-benzoilo. El grupo protector de hidroxilo también puede ser un grupo sililo. R^5 es un grupo lábil que saldrá del compuesto de fórmula III durante la reacción de acoplamiento, de modo que el compuesto de fórmula II y el compuesto de fórmula III reaccionan y forman el compuesto de fórmula IV. Por ejemplo, el grupo lábil sale del compuesto de fórmula III tras activación con un ácido de Lewis o ácido de Brønsted. El grupo lábil puede ser, por ejemplo, alcoxi, ariloxi o aciloxi (incluyendo acetoxi, benzoiloxi y benzoiloxi sustituido), más preferiblemente un grupo acetoxi.

25 El compuesto de fórmula II se puede preparar por sililación de 2-cloro adenina con un agente de sililación en un disolvente orgánico o solo, en donde x es 0, 1 o 2, y es 2, 1 o 0, R^4 es hidrógeno o $\text{SiR}^1\text{R}^2\text{R}^3$, respectivamente, y cuando x es 2, y es 0, R^4 debe ser $\text{SiR}^1\text{R}^2\text{R}^3$. El compuesto de fórmula II tiene al menos un grupo sililo, más preferiblemente al menos dos grupos sililo, Preferiblemente, la sililación se lleva a cabo en un disolvente orgánico. El disolvente orgánico puede ser un nitrilo, un éter, un hidrocarburo (tal como un hidrocarburo aromático y un hidrocarburo clorado) o un agente de sililación, incluyendo MeCN, THF, DCM, DCE, PhMe, HMDS, BSTFA, BSA o una mezcla de dos o más de estos disolventes. Más preferiblemente, el disolvente orgánico es MeCN. Preferiblemente, el disolvente orgánico es el mismo que el usado en la etapa de acoplamiento a). El agente de sililación puede ser BSTFA, HMDS, BSA, TMSCl, MSA, MSTFA o una mezcla de al menos dos de estos agentes. Más preferiblemente, el agente de sililación es BSTFA. Preferiblemente, el compuesto sililado de fórmula II se usa directamente en la siguiente reacción de acoplamiento sin aislarlo.

La etapa de acoplamiento a) se lleva a cabo en presencia de ácido de Brønsted o de Lewis basado en ácido sulfónico.

35 Preferiblemente, el ácido de Lewis basado en ácido sulfónico es un ácido de Lewis no metálico. El ácido de Brønsted o de Lewis no metálico usado en la etapa (a) puede ser TfOH, TMSOTf, TESOTf, TMSI, TBSOTf, TsOH, MsOH, MS_2O , o una combinación de dos o más de estos ácidos. Más preferiblemente, el ácido es TfOH. El disolvente orgánico usado en la etapa de acoplamiento (a) es preferiblemente MeCN. La etapa de acoplamiento a) se puede llevar a cabo a una temperatura de entre aproximadamente 0°C a aproximadamente temperatura de reflujo del disolvente orgánico; más preferiblemente de 40°C a 80°C , en particular aproximadamente 60°C , de modo que el anómero β deseado del compuesto nucleósido protegido de fórmula IV precipita selectivamente en la mezcla de reacción sustancialmente exento de los isómeros no deseados y otros productos de reacción e impurezas.

De acuerdo con una realización preferida de la presente solicitud, antes de empezar la etapa c), el procedimiento como se ha descrito antes comprende además una etapa de envejecimiento de la mezcla heterogénea formada en la etapa b), es decir, mantenimiento de la mezcla heterogénea formada en la etapa b) a una temperatura elevada, preferiblemente de 40°C a 85°C, más preferiblemente a 60°C, durante un periodo de tiempo prolongado, preferiblemente no menor de 2 horas, más preferiblemente de 6 a 24 horas.

La etapa de conversión d) puede comprender desproteger el compuesto de fórmula IV y/o eliminar un grupo sililo, si lo hay, para hacer el producto cladribina.

También se describe un procedimiento para hacer la cladribina con una mayor pureza, que comprende:

a) disolver la cladribina bruta en un disolvente prótico en presencia de una base para formar una disolución que comprende cladribina bruta disuelta;

b) mantener la disolución a una temperatura elevada (es decir, una temperatura que es mayor que la temperatura ambiente, preferiblemente entre 60°C y temperatura de reflujo del disolvente prótico) de modo que la disolución sea homogénea hasta que se reduzca la cantidad de impurezas de nucleósido protegido o parcialmente protegido a un límite superior predeterminado;

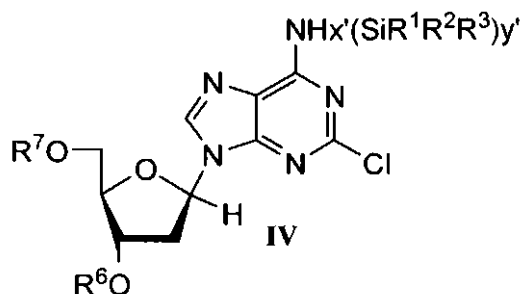
c) enfriar la disolución de la etapa b) de modo que se formen cristales de cladribina y se aislen. La temperatura elevada se refiere a una temperatura que es mayor que la temperatura ambiente, preferiblemente entre 60°C y la temperatura de reflujo del disolvente prótico.

El disolvente prótico puede ser un alcohol alifático (p. ej., C₁-C₆), tal como MeOH y EtOH, o una mezcla de alcohol alifático y agua. Preferiblemente, el disolvente prótico es una mezcla de agua y metanol. El disolvente prótico usado en la presente memoria puede ser una mezcla de dos o más disolventes próticos. La base puede ser un alcóxido, hidróxido, carbonato, amoníaco o amina, y preferiblemente metóxido sódico.

Preferiblemente, el límite superior predeterminado de la cantidad de impurezas de nucleósido protegido o parcialmente protegido puede ser 0,1% por análisis de HPLC de la disolución.

La cladribina aislada mencionada antes se puede recrystalizar adicionalmente, p. ej., en un alcohol alifático y agua.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente solicitud, un procedimiento para hacer un anómero beta de fórmula IV



en donde cada uno de R¹, R² y R³ es independientemente alquilo, alquenido, alquínilo o arilo (p. ej., de C₁ a C₂₀), x' es 0, 1 o 2, y' es 2, 1 o 0, y cada uno de R⁶ y R⁷ es independientemente un grupo protector de hidroxilo, con una pureza mejorada, comprende:

(a) tratar una mezcla que comprende el anómero beta de fórmula IV y al menos un isómero no deseado, con un ácido de Brønsted o de Lewis basado en ácido sulfónico en MeCN, y en presencia de un agente de sililación (preferiblemente BSTFA) de modo que al menos un isómero no deseado isomeriza y se convierte en el anómero beta de fórmula IV; y

(b) aislar el anómero beta de fórmula IV de la mezcla de la etapa (a).

El catalizador preferiblemente es TfOH o TMSOTf. El compuesto de fórmula IV que se va a purificar puede estar contaminado con isómero anomérico alfa no deseado (p. ej., el compuesto de fórmula V mostrado a continuación) y/o regioisómeros en N-7 (p. ej., compuestos de fórmula VI y VII mostrados a continuación).

La mezcla que comprende el compuesto de fórmula IV también se puede obtener tratando un derivado no sililado del compuesto de fórmula IV (es decir, en donde x' = 2 e y' = 0) con un agente de sililación (preferiblemente BSTFA), preferiblemente con exceso molar con respecto al derivado no sililado del compuesto de fórmula IV, en un disolvente orgánico (preferiblemente MeCN), preferiblemente sin posterior aislamiento del compuesto de fórmula IV del disolvente orgánico.

El compuesto de fórmula IV con una pureza mejorada obtenido según la presente solicitud se puede convertir

después en cladribina, p. ej., eliminando los grupos protectores y/o sililo, si los hay.

También se describe un procedimiento para hacer un anómero beta de fórmula IV como se ha definido antes (es decir, cada uno de R^1 , R^2 y R^3 es independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, x' es 0, 1 o 2, y' es 2, 1 o 0, y cada uno de R^6 y R^7 es independientemente un grupo protector de hidroxilo), que comprende acoplamiento de un compuesto de fórmula II como se ha definido antes, con una 2-desoxi-ribofuranosa protegida de fórmula III como se ha definido antes, en un disolvente orgánico y en presencia de un ácido de Brønsted o de Lewis basado en ácido sulfónico, para obtener el compuesto de fórmula IV, el cual después se puede convertir en cladribina. El disolvente orgánico puede ser un nitrilo orgánico, compuesto aromático, compuesto clorado, éter, hidrocarburo o una mezcla de dos o más de estos compuestos. Preferiblemente, el disolvente orgánico puede ser MeCN, PhMe, DCM, THF o una mezcla de dos o más de estos compuestos.

Las diferentes características novedosas que caracterizan la invención se señalan con particularidad en las reivindicaciones adjuntas y que forman parte de la descripción. Para una mejor comprensión de la invención, sus ventajas operativas y objetos específicos alcanzados mediante su uso, debe hacerse referencia a la materia descriptiva en la que se ilustran y describen realizaciones preferidas de la invención.

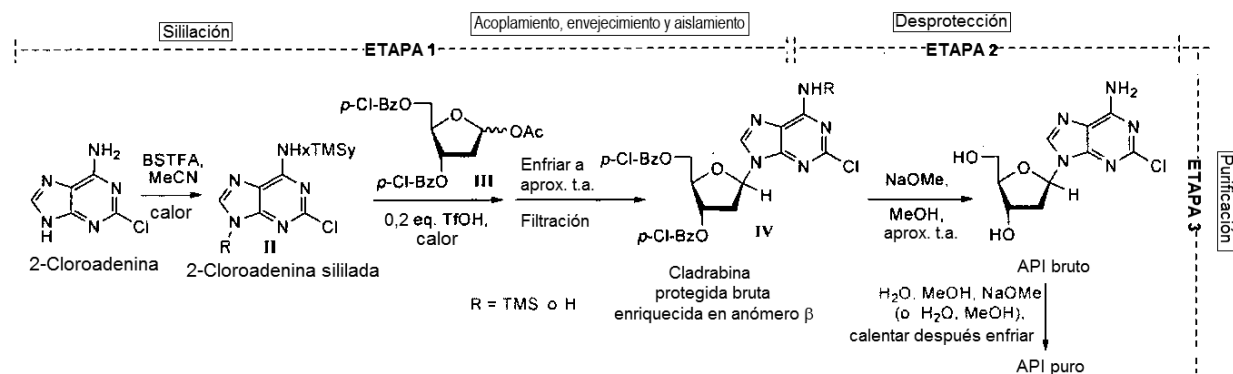
15 Descripción detallada de las realizaciones actualmente preferidas

Como se usa en la presente memoria, la expresión “anómero β enriquecido” (anómero beta) se refiere a un producto nucleósido que comprende más de 1:1, preferiblemente al menos 2:1, más preferiblemente al menos 3:1 del anómero β /su correspondiente anómero α (anómero alfa).

Como se usa en la presente memoria, la expresión “anómero β sustancialmente enriquecido” (anómero beta) se refiere a un producto nucleósido que comprende más de 10:1, preferiblemente al menos 20:1, más preferiblemente aproximadamente 40:1 del anómero β /su correspondiente anómero α .

Como se usa en la presente memoria, el término “envejecimiento” se refiere a mantener una mezcla de reacción durante un periodo de tiempo prolongado, p. ej., al menos 2 horas, preferiblemente de 6 a 24 horas, a una temperatura elevada (es decir, mayor que la temperatura ambiente), preferiblemente al menos aproximadamente de 40°C a 80°C, más preferiblemente aproximadamente 60°C. Más preferiblemente, durante el envejecimiento, la mezcla de reacción se mantiene en las mismas o sustancialmente las mismas condiciones (p. ej., temperatura, concentración de soluto, cantidad de catalizador) de la reacción inmediatamente anterior, p. ej., la reacción de acoplamiento descrita antes, después de que la reacción inmediatamente anterior se haya completado. Por ejemplo, no se interfiere en o se cambian las condiciones de la reacción inmediatamente anterior durante la etapa de envejecimiento. Como se describe con más detalle más adelante, el envejecimiento conduce a un mayor rendimiento aislado del anómero β deseado de lo que se esperaría de otra forma sin usar la etapa de envejecimiento.

La presente solicitud se refiere a la síntesis de la cladribina (I) (véase, p. ej., el esquema 7 a continuación).

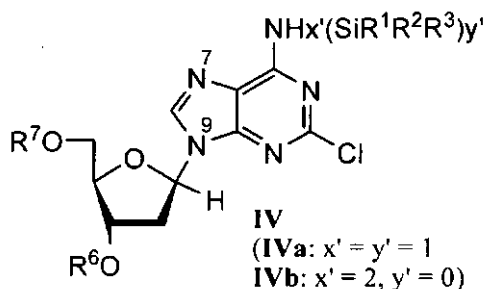


35 Esquema 7 - Síntesis de cladribina de acuerdo con una realización preferida de la presente solicitud

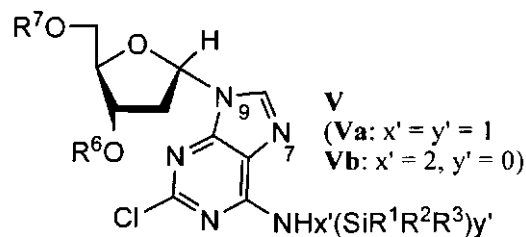
La cladribina se prepara por acoplamiento directo de la tri-O-protegida-2-desoxi-ribofuranosa III con 2-cloroadenina sililada, preferiblemente doblemente sililada (II, 2-cloro-6-aminopurina sililada) catalizado por ácidos de Brønsted, lo más preferiblemente derivados de ácidos sulfónicos o ácidos de Lewis basados en ácido sulfónico, tales como ésteres de trimetilsililo de ácidos sulfónicos. Durante la etapa de reacción de acoplamiento y después de completarse en una etapa de envejecimiento se produce un enriquecimiento total en la cantidad del anómero β deseado del producto N-9-glicosilado, que se cree que se debe a una isomerización no descrita del anómero α V no deseado del producto N-9-glicosilado en el anómero β IV del producto N-9-glicosilado (las fórmulas de estos anómeros se muestran a continuación), el cual después precipita en la mezcla de reacción. Las etapas de sililación, acoplamiento y envejecimiento se pueden llevar a cabo en un solo recipiente de reacción, permitiendo un procedimiento muy eficiente. La reacción de acoplamiento se cataliza mediante una cantidad subestequiométrica del

catalizador, y debido a la naturaleza del catalizador, su pequeña cantidad y la precipitación del anómero β IV deseado del producto N-9-glicosilado protegido en la mezcla de reacción, no es necesaria una etapa posterior de desactivación del catalizador. La falta de una etapa de desactivación del catalizador es una ventaja para la fabricación de cladribina porque evita la necesidad de un tratamiento acuoso, que, de lo contrario, aumentaría el tiempo de operación en la instalación de fabricación. El producto protegido con N-sililo, di-O-acilo IVa se somete a desprotección en una etapa separada para producir la cladribina con buen rendimiento y una pureza alta. La alta pureza anomérica y regioisómera del producto protegido IV significa que no se requiere etapa de purificación. La etapa de acoplamiento avanza con la adición solo de tri-O-protégida-2-desoxi-ribofuranosa III y un catalizador a la 2-cloroadenina sililada II, sin que sea necesaria otra etapa de procesamiento (es decir, sin tratamiento, tratamiento acuoso, desactivación/amortiguación de catalizador, destilación o transferencia de reactivo). El anómero β IV protegido deseado del nucleósido N-9-glicosilado se puede aislar directamente en forma de un sólido de la mezcla de la reacción de acoplamiento por filtración con una alta pureza y rendimiento, y no requiere posterior purificación. El anómero β IV se aísla con un rendimiento mayor y con una cantidad muy pequeña del anómero α V de lo esperado. Esto es muy favorable porque los datos analíticos muestran que la selectividad anomérica del acoplamiento es baja.

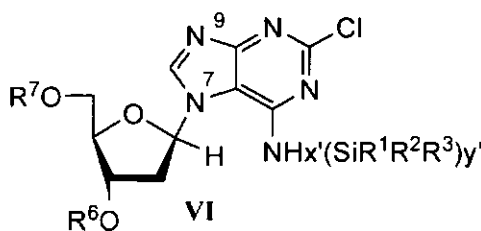
Por lo tanto, mediante la selección de las condiciones en las que se disuelve el anómero α en disolución pero en las que el anómero β deseado no se disuelve, junto con el consumo del anómero α V incluyendo por la isomerización que se produce en disolución, y la precipitación del anómero β protegido deseado resultante, se observa una selectividad total alta. De esta forma, algo del anómero α V formado en la reacción de acoplamiento se puede convertir en el anómero β deseado. Al final de la etapa de envejecimiento, la cantidad de anómero α, tanto en la fase sólida como en la líquida de la reacción, es baja en comparación con la del anómero β. Los regioisómeros en N-7 VI y VII no son problemáticos porque en las condiciones de reacción pueden isomerizar a los isómeros N-9 termodinámicamente más estables. El anómero β protegido del nucleósido aislado se desprotege para dar la cladribina bruta con buena pureza con un rendimiento alto. La cladribina pura para uso humano se puede obtener por una etapa de cristalización adicional. El rendimiento total del producto de calidad API (pureza por HPLC > 99,5%, e impurezas no individuales > 0,1%) es de hasta aproximadamente 55%.



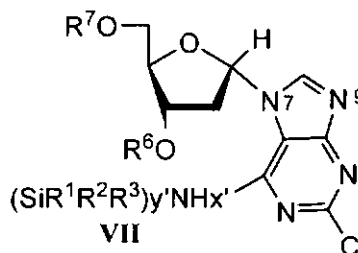
anómero β del producto N-9-glicosilado



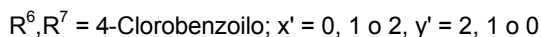
anómero α del producto N-9-glicosilado



anómero β del producto N-7-glicosilado



anómero α del producto N-7-glicosilado



Isómeros de los nucleósidos protegidos

La sililación, acoplamiento, envejecimiento y precipitación descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo en un solo recipiente. Después de la etapa de acoplamiento y envejecimiento, el anómero β N-9-glicosilado (IV) del nucleósido se aísla directamente, en forma de un sólido de la mezcla de la reacción de acoplamiento por filtración con una pureza (típicamente pureza por HPLC no menor de 95%) y rendimiento relativamente altos, y no requiere purificación. Este nucleósido protegido se desprotege para dar la cladribina bruta con una pureza buena con un rendimiento alto. La cladribina pura para uso humano se puede obtener por una etapa adicional de cristalización. El rendimiento total puede ser aproximadamente 55% (salvo que se defina explícitamente de otra forma, el rendimiento descrito aquí y más adelante se calcula a partir de los moles de materiales de partida y moles de producto, es decir, rendimiento = (moles de producto/moles de materiales de partida)*100).

Los autores de la invención han descubierto sorprendentemente que la isomerización estereoquímica del anómero α en el anómero β podría producirse en las condiciones de reacción de la etapa de acoplamiento de la presente solicitud. Lo que es más importante, han descubierto que este procedimiento de isomerización se podría aprovechar para dar un rendimiento mayor del producto IV deseado y una relación mayor del anómero β al anómero α en la mezcla del producto de reacción, de lo que de otra forma proporcionaría la reacción de acoplamiento, mediante la selección adecuada de condiciones en las que el isómero β deseado precipite apreciablemente en la solución de la reacción pero en las que el isómero α no deseado no precipite sustancialmente. Esta isomerización y precipitación proporcionan un mayor rendimiento, y más aún cuando a la etapa de acoplamiento le sigue una etapa de envejecimiento, y pureza del anómero N-9- β deseado cuando se aísla por filtración directa de la mezcla de productos, de lo que sería posible por i) tratamiento directo de la mezcla de productos completa (es decir, fases sólida y líquida), o ii) en condiciones en las que la reacción de acoplamiento se llevara a cabo en condiciones homogéneas.

También se descubrió que los regioisómeros N-7 no deseados VI y VII que también se pueden formar en la reacción de acoplamiento no son problemáticos, porque en las condiciones de reacción de acoplamiento y de envejecimiento seleccionadas de la presente invención pueden isomerizar fácilmente a los isómeros N-9 termodinámicamente más estables. Esto significa que el rendimiento de la reacción no se reduce por estos regioisómeros no deseados. A esta secuencia en "un solo recipiente" le sigue un aislamiento del producto sólido muy sencillo por filtración del anómero β N-9-glicosilado del nucleósido protegido IV deseado muy enriquecido, que solo está contaminado con una cantidad pequeña del anómero α . La cladribina pura se obtiene por desprotección y cristalización, y la pequeña cantidad de isómeros e impurezas formadas en la secuencia de reacciones clave, que precipitan con el producto IV no comprometen la calidad del API final.

En esta invención no se requiere cromatografía o cristalización fraccionada como una operación independiente, para obtener el anómero β N-9-glicosilado del nucleósido protegido IV deseado muy enriquecido, porque el anómero β deseado precipita selectivamente de la mezcla de productos de la reacción de glicosilación durante la reacción de acoplamiento y durante la etapa de envejecimiento en una forma sustancialmente pura. En la realización preferida de esta invención, la pureza del producto precipitado IVa medida por análisis de HPLC es de más de 90%, típicamente más de 95%. Además, el producto IVa también precipita en la mezcla de productos de reacción cuando se enfría desde la temperatura de reacción a aproximadamente temperatura ambiente. Debido a la estereoisomerización del centro estereogénico anomérico del anómero α al anómero β menos soluble durante la reacción y durante la etapa de envejecimiento, se forma más anómero β de lo que se formaría de otra forma en la propia reacción de acoplamiento. Es decir, aunque la selectividad anomérica real de la reacción de acoplamiento es baja (de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 2:1) en las condiciones descritas en esta invención, este fenómeno de precipitación e isomerización conduce al enriquecimiento total del anómero β dentro del sistema de reacción total conduciendo a relaciones de más de aproximadamente 2,4:1, incluso tan altas como aproximadamente 3:1, o incluso mayores, calculado basado en el sistema de reacción entero. La relación de anómero β al anómero α del producto precipitado aislado IV puede ser tan alta como aproximadamente 40:1. Además, después de consumirse el material de partida ribofuranosa III en la etapa de acoplamiento, se prefiere calentar la mezcla a una temperatura elevada durante más tiempo, en lo que se denomina la etapa de envejecimiento, preferiblemente a aproximadamente 60°C, para mejorar el rendimiento total del anómero β deseado. El tiempo al que se detiene la etapa de envejecimiento se puede evaluar midiendo el ensayo (porcentaje en peso) del anómero α V no deseado en la fase de disolución de la mezcla de productos. Típicamente, la etapa de envejecimiento se lleva a cabo durante al menos 6 horas hasta aproximadamente 24 horas, pero el periodo de tiempo requerido para el rendimiento óptimo depende de las condiciones de reacción (p. ej., concentración de soluto, temperatura y cantidad de catalizador) y se puede determinar vigilando la cantidad de anómero α no deseada en la fase de disolución.

La elección del disolvente es importante para este procedimiento. Aunque una serie de disolventes orgánicos pueden ser eficaces en la etapa de acoplamiento, el más preferido es el MeCN. La cantidad de disolvente MeCN usado con respecto a la nucleobase II y derivado de 2-desoxi-ribose III se puede seleccionar a lo largo de un intervalo, pero se prefiere de aproximadamente 12 a aproximadamente 20 volumen/peso (basado en la 2-cloroadenina) y se prefiere de aproximadamente 12 a aproximadamente 14 volumen/peso. Si se usa demasiado poco MeCN, la 2-cloroadenina no se disuelve completamente en la etapa de sililación. Si se selecciona un disolvente que no tiene algunas de las características físicas deseadas del MeCN, entonces el enriquecimiento y el aislamiento conveniente por filtración del anómero β puede ser difícil y/o ineficaz.

Por lo tanto, este procedimiento muy conveniente desarrollado por los autores de la invención era muy inesperado al comienzo de la investigación. El procedimiento es muy selectivo para el isómero β IV deseado, incluso cuando se pueden formar potencialmente cuatro isómeros (es decir, los anómeros α y β del producto N-7-glicosilado VI y VII, así como los anómeros α y β del producto N-9-glicosilado IV y V) durante la reacción de acoplamiento. Se prefiere una temperatura superior a aproximadamente 0°C, en particular una temperatura de aproximadamente 60°C para la reacción de acoplamiento.

La 2-cloroadenina se puede sililar con un agente de sililación tal como N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), cloruro de trimetilsililo (TMSCl), cloruro de *terc*-butil-dimetilsililo (TBSCl), TMSOTf, triflato de *terc*-butil-dimetilsililo (TBSOTf) y hexametildisilazano, bis(trimetilsilil)sulfato, *terc*-

- butilclorodimetilsilano, butil(cloro)dimetilsilano, 1-(*terc*-butildimetilsilil)imidazol, *terc*-butil(cloro)difenilsilano, *N-terc*-butildimetilsilil-*N*-metiltrifluoroacetamida, *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, 1,3-dimetil-1,1,3,3-tetrafenildisilazano, 1,1,3,3-tetrametil-1,3-difenildisilazano, 1,1,3,3-tetrametil-1,3-divinildisilazano, *N*-metil-*N*-trimetilsililacetamida, *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), clorotriisopropilsilano, clorotrietilsilano, *N*-(trimetilsilil)acetamidasilano, sin embargo, se prefiere la BSTFA cuando la reacción de sililación se lleva a cabo en MeCN y se usa con exceso molar con respecto a la 2-cloroadenina. Aunque el exceso molar de BSTFA puede ser mayor de 2,0 equivalentes, se prefieren aproximadamente 3 equivalentes. Cuando se usó BTSFA o BSA para sililar la 2-cloroadenina en MeCN se descubrió por análisis de GCMS que la 2-cloroadenina estaba doblemente sililada y el cromatograma de corriente iónica total (TIC) sugería la existencia de solo un isómero de la 2-cloroadenina doblemente sililada.
- Por conveniencia y eficacia se prefiere que la etapa de sililación se lleve a cabo en el mismo disolvente que se usa en la etapa de la reacción de acoplamiento, aunque estas etapas se pueden llevar a cabo en disolventes diferentes o mezclas de disolventes. La etapa de sililación y acoplamiento se pueden llevar a cabo en el mismo recipiente de reacción único, o en recipientes separados si se requiere una operación de filtración después de la etapa de sililación. Si se usan agentes de sililación distintos de la BSTFA que producen un subproducto reactivo que interfiere con la integridad de la etapa de acoplamiento, entonces el producto sililado II se puede purificar mediante su aislamiento por métodos conocidos para los que tienen experiencia en la técnica, tales como, incluyendo la cristalización, precipitación o evaporación del disolvente para proporcionar un residuo o destilación. Se puede usar una variedad de disolventes en la etapa de acoplamiento tales como tetrahidrofurano (THF), tolueno (PhMe), DCE (dicloroetano), HMDS y DCM, pero se prefiere en MeCN.
- La 2-cloroadenina sililada II se acopla con una 2-desoxi-ribofuranosa III en un disolvente orgánico y en presencia de un ácido de Brønsted o de Lewis no metálico basado en ácido sulfónico, incluyendo triflato de trimetilsililo (TMSOTf), TBSOTf, triflato de trietilsililo (TESOTf), ácido triflico (TfOH), ácido metanosulfónico (MsOH), ácido *para*-toluenosulfónico (TsOH), anhídrido del ácido triflico (Tf₂O), y anhídrido del ácido metanosulfónico (Ms₂O), pero preferiblemente TfOH. Se pueden usar otros ácidos de Brønsted o de Lewis, tales como los conocidos para los expertos en la técnica de las reacciones de acoplamiento de nucleósidos, pero estos son menos preferidos. La presente invención se lleva a cabo preferiblemente usando una cantidad subestequiométrica baja del catalizador de se mantuvo a esta temperatura durante 1 hora, y después se enfrió a aproximadamente 15°C y se agitó a esta temperatura durante 2 horas. Los Sin querer estar ligados por la teoría, se cree que la reacción de acoplamiento
- Sin querer estar ligados por la teoría, se cree que la reacción de acoplamiento avanza por un mecanismo de reacción S_N1 para dar una mezcla anomérica de productos nucleósidos protegidos, porque la relación de los productos nucleósidos protegidos anoméricos IV y V es independiente de la relación de la mezcla anomérica original de la 2-desoxi-ribofuranosa protegida III. Por lo tanto, no se necesitan requisitos especiales para un material de partida III anoméricamente puro. Esto es ventajoso, porque el material de partida III que no es anoméricamente puro se puede producir de forma más barata. Esto contrasta con otros métodos de la técnica anterior para sintetizar cladribina, tales como los mostrados en los esquemas 3-6, que usan un material de partida de hidrato de carbono anoméricamente puro.
- Mezclas de productos nucleósidos acoplados obtenidos por otros métodos sintéticos se pueden convertir en cladribina por sililación e isomerización/precipitación seguido de desprotección, como se describe en esta invención. Como ilustración de esto, una muestra de 50 g de mezcla de nucleósido no sililado bruto que contiene 58,6% (equivalente a 29,3 g) de anómero α N-9-glicosilado Vb y 34,3% (equivalente a 17,15 g) del anómero β N-9-glicosilado IVb se trató con 3 equivalentes molares de BSTFA en MeCN a 60°C durante 3 horas, seguido directamente por la adición de 0,2 equivalentes molares de TfOH con calentamiento a 60°C durante 15 horas. El precipitado sólido se filtró y se secó para dar 24,0 g del producto IV precipitado con pureza de 95%, principalmente sililado (es decir, IVa), cuya composición era equivalentes a 20,55 g de IVb no sililado. Además, se detectó más IV en las aguas madre. Por lo tanto, en total se obtuvo 24% más del anómero β N-9-glicosilado IV de lo que se puso en la reacción de isomerización, del cual se aisló 16% más de los que se puso en la reacción de isomerización en el procedimiento de precipitación y filtración.
- Por lo tanto, aunque probablemente se puede usar una variedad de condiciones en esta invención, las condiciones más preferidas son el uso de MeCN como un disolvente de reacción, BSTFA como un agente de sililación y TfOH como un catalizador y que la reacción de sililación, acoplamiento y etapa de envejecimiento se llevan a cabo en el mismo recipiente a aproximadamente 60°C. A escala de fabricación cuando se hace la cladribina para consumo humano, se prefiere que el producto sililado se filtre a través de un coadyuvante de filtración, pero no se requiere otra operación adicional. Este sistema de reacción favorece el anómero N-9-β IV frente al anómero α V debido a la precipitación del anómero N-9-β en la mezcla de la reacción de acoplamiento con isomerización en el sitio del anómero N-9-α no deseado al anómero N-9-β deseado que precipita en la mezcla de reacción. Esta secuencia de reacción de sililación, acoplamiento y envejecimiento da un rendimiento de aproximadamente 60-65% (calculado a partir del material de partida 2-desoxi-ribose protegida III) a escalas de fabricación de gramos hasta multikilogramos de sólido aislado del anómero N-9-β sustancial y satisfactoriamente puro.
- El análisis directo de la solución de la reacción por HPLC muestra que la reacción de acoplamiento real sin la etapa de envejecimiento produce una relación molar de aproximadamente <1:1 a >2:1 del anómero N-9-β IV/ anómero N-9-α V dependiendo de las condiciones de reacción. Cuando se usan agentes de sililación no preferidos y

catalizadores no preferidos, tales como BSA y Tf_2O , por ejemplo, se encuentra que la selectividad puede ser baja o incluso se puede favorecer el anómero α no deseado frente al anómero β deseado. Los autores de la invención encontraron que la selectividad en la reacción de acoplamiento era mayor cuando se usaba BSTFA (relación molar de hasta aproximadamente 2,3:1 del anómero N-9- β /anómero N-9- α), en lugar de BSA (relación molar de aproximadamente 1:1 del anómero N-9- β /anómero N-9- α) como el agente de siliación, y se usó TfOH como catalizador en MeCN cuando la solución del producto de la reacción de siliación se usó directamente en la etapa de acoplamiento sin aislamiento del compuesto de fórmula II o tratamiento. Después de la etapa de envejecimiento, la relación del anómero β al anómero α del sistema de reacción total puede ser más de aproximadamente 2,6:1, incluso tan alta como aproximadamente 3:1 o incluso más alta, y la relación del anómero β al anómero α del producto IV precipitado aislado puede ser tan alta como aproximadamente 40:1.

En una realización preferida de la invención, la reacción de desprotección del compuesto de fórmula IV se lleva a cabo como una mezcla heterogénea en MeOH a aproximadamente 25°C usando una base alcóxido, preferiblemente metóxido sódico. La cladribina bruta preferiblemente se aísla directamente por filtración proporcionando una pureza química alta de típicamente aproximadamente 96% a aproximadamente 99%. Sin querer estar ligados por la teoría, se cree que la pureza alta de la cladribina bruta se debe a un fenómeno de cristalización de la cladribina que se produce durante la reacción, lo cual estaba respaldado por análisis de difracción de rayos X de polvo (XRPD). La cantidad de disolvente MeOH se puede variar, pero se prefiere aproximadamente 5 volumen/peso con respecto al compuesto de fórmula IV.

Los autores de la invención descubrieron que cuando la reacción de desprotección se llevaba a cabo en las condiciones preferidas de esta invención, se obtenía cladribina bruta de alta pureza química de aproximadamente 96% a aproximadamente 99% por análisis de HPLC. Sin embargo, se encontró, que la cladribina bruta a veces estaba contaminada con pequeñas cantidades de IVb y Vb residual y productos intermedios parcialmente desprotegidos e impurezas. Los autores de la invención descubrieron que era muy difícil eliminar eficazmente estas impurezas mediante una sola etapa de cristalización en mezclas de disolventes alcoholes o alcohol y agua, y a veces el criterio de pureza de la cladribina aislada no cumplía el de las directrices de la ICH sobre impurezas. Por lo tanto, los autores de la invención idearon un protocolo que permitía eliminar las impurezas eficazmente. Este protocolo se combinó eficazmente con el procedimiento de cristalización, que era muy conveniente a escalas de fabricación, y proporcionaba cladribina pura más eficazmente que si eran necesarias operaciones separadas. El protocolo combinado es una realización preferida de esta invención y consistía en disolver la cladribina bruta en una solución de MeOH y agua que contenía una cantidad pequeña de una base soluble en agua, preferiblemente metóxido sódico, en donde la cantidad de base estaba directamente relacionada con la cantidad de los productos intermedios residuales, isómeros e impurezas y productos parcialmente desprotegidos mencionados antes. La mezcla se calentó convenientemente aproximadamente a la temperatura de reflujo para disolver los sólidos, y se enfrió opcionalmente a aproximadamente 70°C o se dejó aproximadamente a la temperatura de reflujo, y se agitó a la misma temperatura hasta que los compuestos residuales mencionados antes se consumieron a menos de o igual a 0,10% por análisis de HPLC. Después, se dejó que la cladribina cristalizara en la solución y se aisló por filtración, se lavó y secó dando cladribina de alta pureza. Aunque se podía usar un intervalo de relaciones en peso de MeOH y agua en la etapa de purificación/cristalización, se prefería una relación de aproximadamente 4:5 en peso/peso, respectivamente. En total, se prefería una relación de aproximadamente 9:1 en peso/peso de la mezcla de MeOH y agua con respecto a la cladribina bruta. Este protocolo se puede llevar a cabo en un solo recipiente de reacción, haciéndolo muy conveniente. En otra realización de esta invención, opcionalmente después de este protocolo, se puede llevar a cabo una recristalización de la cladribina en MeOH y agua.

En las formulas (II) y (IV) descritas antes, x y x' , e y e' no son necesariamente iguales. El anómero α V puede perder su grupo sililo fácilmente tras el aislamiento. El tratamiento con agua o tratamiento con agua ácida u otras condiciones de desililación también pueden producir la eliminación de los grupos sililo. Comparado con otros grupos protectores, los grupos sililo no están fuertemente unidos a los compuestos. Por ejemplo, $x' = 1$ e $y' = 1$, el compuesto aislado de fórmula (IV) puede permanecer igual cuando el "aislamiento" es la filtración directa. Si están implicadas etapa de contacto con agua u otras condiciones de desililación antes o durante la etapa de precipitación, el compuesto de fórmula (IV) con $x'=1$ e $y'=1$ inicialmente, se puede "aislar" posteriormente como un compuesto de fórmula (IV) con $x'=2$ e $y'=0$.

Las ventajas de esta invención para la síntesis incluyen que es aplicable para la síntesis a escala de fabricación de cladribina de calidad API que es adecuada para el consumo humano. El procedimiento sintético es eficaz como se demuestra por un alto rendimiento total, comparado con los rendimientos de procedimientos en competencia descritos en técnicas anteriores. El procedimiento es muy conveniente para realizar a escala de laboratorio y de instalación de fabricación y se demostró mediante la ilustración de multi-kilogramos, como se describe en los ejemplos más adelante. El procedimiento sintético descrito como la realización preferida de esta invención no requiere que la 2-desoxi-ribosa protegida III sea anómicamente pura, puesto que la pureza anómica de este material de partida no tiene relación con la pureza anómica del producto nucleósido acoplado. Esto reduce el coste de la entrada de material de partida. El que las etapas de siliación, acoplamiento y envejecimiento se puedan llevar a cabo en un solo recipiente de reacción, o en no más de dos si se requiere una etapa de filtración después de la etapa de siliación, es muy ventajoso. El uso único del comportamiento de epimerización de la cladribina protegida junto con la elección adecuada de las condiciones de reacción en las que el anómero β deseado precipita en la solución, pero en las que el anómero α no deseado permanece en solución, proporciona un mejor rendimiento de la

cladribina. Además, la elección adecuada de las condiciones de reacción permitía que el anómero β deseado de la cladribina protegida precipitara en la solución con dicha alta pureza, de modo que se pudiera aislar por filtración y usar directamente para hacer cladribina de calidad API sin su purificación. El uso de ácidos de Lewis no metálicos tales como TMSOTf o ácidos Brønsted evita la contaminación del producto API con residuos metálicos, que pueden ser un problema cuando se usan algunos catalizadores metálicos en la síntesis de nucleósidos. Debido a que el producto de la etapa de acoplamiento y envejecimiento se aislaba directamente por filtración de la mezcla de productos, no se requería tratamiento acuoso, lo que mejoraba la eficacia de tiempo del procedimiento general.

En una realización de esta invención, se sintetiza cladribina que tiene calidad API que se puede aplicar a escalas de fabricación, como sigue:

10 i) La 2-cloroadenina se siliila usando un exceso molar de BSTFA en MeCN a temperatura de reflujo, que después de completarse opcionalmente se filtra en caliente (aproximadamente 55°C) a través de un coadyuvante de filtración.

ii) Después se añade directamente una cantidad subestequiométrica de TfOH a la solución del producto de la etapa (i), seguido de 1-O-acetil-3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-D-ribofuranosa, y la mezcla se calienta a aproximadamente 60°C durante un periodo de horas.

15 iii) Después de consumirse la 1-O-acetil-3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-D-ribofuranosa, la mezcla se envejece aproximadamente en las mismas condiciones que en la etapa (ii) hasta que el porcentaje en peso de 2-cloro-6-amino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2'-desoxi-α-D-ribofuranosil]-purina (Vb; anómero α), que se detecta como su derivado no siliilado en la fase de solución, es menor o igual a 3%.

20 iv) La mezcla de productos después se enfría de aproximadamente 15 a 30°C y después se agita durante no menos de 2 horas, y después se filtra para recoger el producto sólido que se lava opcionalmente con MeCN, y después el sólido se seca para dar sustancialmente la 2-cloro-6-trimetilsililamino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina (IVa).

v) El producto sólido seco de la etapa (iv) se desprotegió por tratamiento con metóxido sódico en MeOH, preferiblemente como una mezcla heterogénea de aproximadamente 20 a 30°C.

25 vi) La mezcla de productos de la etapa (v) después se filtró para recoger el producto sólido y se lavó con MeOH y se secó para dar la cladribina bruta.

vii) La cladribina bruta de la etapa (vi) se purifica añadiéndola a una mezcla de agua, MeOH y metóxido sódico (donde la cantidad de metóxido sódico se determina basándose en la cantidad de IVb, Vb residual y productos intermedios parcialmente desprotegidos e impurezas que quedan de la etapa de desprotección) y calentando a aproximadamente temperatura de reflujo para la disolución, y opcionalmente enfriando a aproximadamente 70°C y agitando a la misma temperatura hasta que se consumieron las impurezas residuales a menos de o igual a 0,10%.

viii) La mezcla de producto purificada de la etapa (vii) se trató opcionalmente con carbón activado a aproximadamente 65°C, se filtró en caliente y se lavó con MeOH y agua precalentados. El producto de la etapa (vii) o el producto tratado opcionalmente con carbón se enfrió para dejarlo cristalizar. La suspensión formada tras la cristalización se enfría a aproximadamente 10-20°C durante no menos de 2 horas, y después se filtra, se lava con MeOH y se seca proporcionando la cladribina con alta pureza.

40 ix) Opcionalmente, la cladribina aislada de la etapa (viii) se puede recrystalizar disolviéndola en una mezcla de agua y MeOH a aproximadamente temperatura de reflujo, y enfriando para permitir la cristalización. La suspensión formada tras cristalización se enfría a aproximadamente 15°C durante no menos de 2 horas, y después se filtra, se lava con MeOH y se seca proporcionando cladribina de alta pureza.

Los siguientes ejemplos se proporcionan solo con el fin de ilustrar mejor y no se pretende que sean limitaciones de la invención descrita.

Ejemplo 1

Preparación de 2-cloro-6-trimetilsililamino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina

45 La 2-cloroadenina (75 g, 0,44 mol, 1,0 eq.), MeCN (900 ml, 12 P), y BSTFA (343,5 g, 1,33 mol, 3,0 eq.) se agitaron y calentaron a temperatura de reflujo hasta que la mezcla se había vuelto casi transparente. La mezcla se enfrió a 60°C y se añadieron TfOH (7,9 ml, 0,089 mol, 0,2 eq.) y después 1-O-acetil-3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-D-ribofuranosa (III; 200,6 g, 1,0 eq.) a la mezcla, y después la mezcla se agitó a 60°C. Después de 1 hora, precipitó algo de sólido en la solución y la mezcla se calentó durante al menos otras 10 horas. La mezcla se enfrió a t.a. y se agitó durante 2 horas. El sólido se filtró y secó a vacío a 60°C para dar 180,6 g con 64% de rendimiento de una mezcla de 2-cloro-6-trimetilsililamino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina (IVa) con 95,4% de pureza por HPLC y su derivado no siliilado 2-cloro-6-amino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2'-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina (IVb) con 1,1% de pureza por HPLC.

Ejemplo 2

Preparación de 2-cloro-6-trimetilsililamino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina por isomerización de una mezcla de 2-cloro-6-amino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-α,β-D-ribofuranosil]-purina

5 Se cargaron 50,0 g de 2-cloro-6-amino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-α,β-D-ribofuranosil]-purina como una mezcla 0,6:1,0 del anómero β IVb y el anómero α Vb (83,16 mmol, el ensayo del anómero α era 58,6% (52,06 mmol) y el anómero β era 34,3% (31,10 mmol, 17,15 g)), 68,6 g BSTFA (266,5 mmol) y 180 ml de MeCN (3,6 P) en un matraz de 4 bocas secado. La mezcla se calentó a 60°C en atmósfera de N₂ durante aproximadamente 3 h y después se añadieron 2,67 g de TfOH (17,8 mmol). La mezcla se agitó a 60°C durante 15 h y después se enfrió a aproximadamente 25°C y se agitó durante 2 h más y después se filtró. La torta de filtración se lavó dos veces con MeCN (20 ml cada vez) y se secó a 60°C a vacío durante 6 h para dar 24 g de sólido blanquecino (el ensayo de la 2-cloro-6-amino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-α-D-ribofuranosil]-purina era 1,4% (0,60 mmol, 0,34 g), la 2-cloro-6-amino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina era 8,4% (3,18 mmol, 2,02 g) y la 2-cloro-6-trimetilsililamino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina era 86,6% (32,73 mmol, 20,78 g)). El análisis de 274,8 g de las aguas madre mediante ensayo, mostró que además del anómero α contenían 0,5% (1,37 g, 2,43 mmol) de 2-cloro-6-amino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina y 0,01% (0,027 g, 0,05 mmol) de 2-cloro-6-trimetilsililamino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina.

Ejemplo 3

Preparación de 2-cloro-2'-desoxi-adenosina (cladribina)

20 A la mezcla preparada antes de 2-cloro-6-trimetilsililamino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina (IVa) y 2-cloro-6-amino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2'-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina (IVb) (179 g, >95,4% de pureza por HPLC) en MeOH (895 ml, 5 P) se añadió solución de MeONa/MeOH al 29% (5,25 g, 0,1 eq.) a 20-30°C. La mezcla se agitó a 20-30°C durante 6 horas, el sólido se filtró, se lavó con MeOH (60 ml, 0,34 P) y después se secó a vacío a 50°C durante 6 horas para dar 72 g de cladribina bruta de blanca a blanquecina con 98,9% de pureza por HPLC con aproximadamente 93% de rendimiento.

Ejemplo 4

Recristalización

30 La cladribina bruta (70 g), H₂O (350 ml, 5 P), MeOH (350 ml, 5 P) y solución de MeONa/MeOH al 29% (0,17 g) se agitaron y calentaron a temperatura de reflujo hasta que la mezcla se volvió transparente. La mezcla se agitó durante 3 horas y después se filtró para separar los precipitados a 74-78°C. La mezcla se agitó y calentó a temperatura de reflujo hasta que la mezcla se volvió transparente y después se enfrió. Empezaron a formarse cristales a aproximadamente 45°C. La suspensión se agitó durante 2 horas al punto de turbidez. La suspensión se enfrió lentamente a una velocidad de 5°C/0,5 horas. La suspensión se mantuvo a 10-20°C durante 4-8 horas y después se filtró. La torta de filtración se lavó tres veces con MeOH (50 ml cada vez) y se secó a 50°C a vacío durante 6 horas para dar 62,7 g de la cladribina 99,9% pura por HPLC con aproximadamente 90% de rendimiento.

Ejemplo 5

Preparación de 2-cloro-6-trimetilsililamino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina

40 La 2-cloroadenina (2,2 Kg, 13,0 mol, 1,0 eq.), MeCN (20,7 Kg, 12 P), y BSTFA (10,0 Kg, 38,9 mol, 3,0 eq.) se agitaron y calentaron a temperatura de reflujo durante 3 horas y después se filtraron a través de Celite y se enfriaron a aproximadamente 60°C. Se añadieron TfOH (0,40 Kg, 2,6 mol, 0,2 eq.) y 1-O-acetil-3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-D-ribofuranosa (III; 5,87 Kg, 13,0 mol, 1,0 eq.) al filtrado y la mezcla se agitó a aproximadamente 60°C durante 29,5 horas. La suspensión se enfrió a aproximadamente 20°C y se agitó durante 2 horas. Los sólidos se filtraron y se lavaron con MeCN (2,8 Kg) dos veces a vacío a 60°C para dar 5,17 kg con 96,5% de pureza por HPLC con 62% de rendimiento, de una mezcla de 2-cloro-6-trimetilsililamino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina (IVa) y el derivado no sililado 2-cloro-6-amino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2'-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina (IVb).

Ejemplo 6

Preparación de 2-cloro-2'-desoxi-adenosina (cladribina)

50 A una mezcla de metóxido sódico al 25% en MeOH (0,11 Kg, 0,5 mol, 0,1 eq.) y MeOH (14,8 Kg, 5 P) a aproximadamente 25°C, se añadió 2-cloro-6-trimetilsililamino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina (IVa) y el derivado no sililado 2-cloro-6-amino-9-[3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2'-desoxi-β-D-ribofuranosil]-purina (IVb) (3,70 Kg, pureza combinada por HPLC >96,3%) y la mezcla se agitó a aproximadamente 25°C durante 2 horas. Los sólidos se filtraron, se lavaron con MeOH (1,11 Kg, 0,4 P) y después se secaron a vacío a 60°C durante 4 horas para dar 1,43 Kg de una cladribina bruta con 97,8% de pureza por HPLC con 87% de rendimiento.

Ejemplo 7

Recristalización de la cladribina bruta

5 Una mezcla de cladribina bruta (1,94 Kg, >96,0% de pureza por HPLC), MeOH (7,77 Kg, 5 P), agua purificada por procedimiento (9,67 Kg, 5 P) y metóxido sódico al 25% en MeOH (32 g, 0,15 mol) se agitó y calentó a temperatura de reflujo hasta que se disolvieron los sólidos. La solución se enfrió a aproximadamente 70°C y se trató con carbón activado (0,16 Kg) y Celite durante 1 hora a aproximadamente 70°C, se lavó con una mezcla previamente calentada de MeOH y agua purificada por procedimiento (p/p = 1:1,25, 1,75 Kg). El filtrado se enfrió a aproximadamente 45°C y se mantuvo a esta temperatura durante 1 hora, y después se enfrió a aproximadamente 15°C y se agitó a esta temperatura durante 2 horas. Los sólidos se filtraron y lavaron con MeOH (1,0 Kg, 0,7 P) tres veces y después se secaron a vacío a 60°C durante 4 horas dando la cladribina de calidad API (1,5 Kg, 5,2 mol) con 80% de rendimiento con 99,84% de pureza por HPLC.

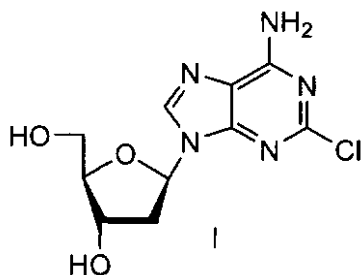
Ejemplo 8

Recristalización de la cladribina bruta

15 Una mezcla de cladribina bruta (1,92 Kg, >95,7% de pureza por HPLC), MeOH (7,76 Kg, 5 P), agua purificada por procedimiento (9,67 Kg, 5 P) y metóxido sódico al 25% en MeOH (36 g, 0,17 mol) se agitó y calentó a temperatura de reflujo hasta que se disolvieron los sólidos. La solución se enfrió a aproximadamente 70°C y se trató con carbón activado (0,15 Kg) y Celite durante 1 hora a aproximadamente 70°C, se lavó con una mezcla previamente calentada de MeOH y agua purificada por procedimiento (1:1,25, 1,74 Kg). El filtrado se enfrió a aproximadamente 45°C y se mantuvo a esta temperatura durante 1 hora, y después se enfrió a aproximadamente 15°C y se agitó a esta temperatura durante 2 horas. Los sólidos se filtraron y lavaron con MeOH (1,0 Kg, 0,7 P) tres veces y dieron cladribina húmeda (1,83 Kg), Una mezcla de esta cladribina (1,83 Kg), MeOH (7,33 Kg, 5 P) y agua purificada por procedimiento (9,11 Kg, 5 P) se agitaron y calentaron a temperatura de reflujo hasta que los sólidos se disolvieron y después se enfriaron a aproximadamente 45°C y se mantuvieron a esta temperatura durante 1 hora. La suspensión se enfrió más a aproximadamente 15°C y se agitó a esta temperatura durante 2 horas. Los sólidos se filtraron y lavaron con MeOH (0,9 Kg, 0,7 P) tres veces y después se secaron a vacío a 60°C durante 4 horas dando la cladribina de calidad API (1,38 Kg, 4,8 mol) con 75% de rendimiento con 99,86% de pureza por HPLC.

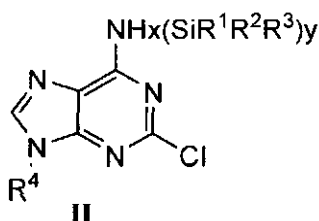
REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para hacer la cladribina de fórmula I



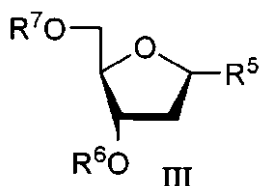
, que comprende:

a) acoplar un compuesto de fórmula II

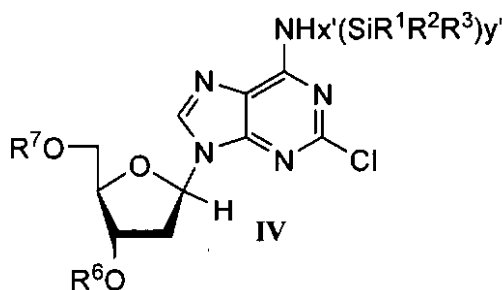


5

en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 es independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, x es 0, 1 o 2, y es 2, 1 o 0, y R^4 es hidrógeno o $SiR^1R^2R^3$, con la condición de que cuando x es 2, y es 0, R^4 es $SiR^1R^2R^3$, con una 2-desoxiribofuranosa protegida de fórmula III



10 en donde cada uno de R^6 y R^7 es independientemente un grupo protector de hidroxilo, y R^5 es un grupo lábil, en un disolvente orgánico y en presencia de un ácido de Brønsted o ácido de Lewis basado en ácido sulfónico, para obtener una mezcla de reacción que comprende un anómero β de fórmula IV



en donde x' es 0, 1 o 2, y' es 2, 1 o 0;

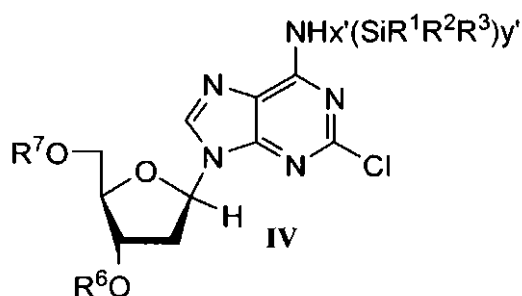
15 b) precipitar selectivamente el anómero β de fórmula IV de la mezcla de reacción para obtener una mezcla heterogénea en presencia de MeCN;

c) aislar el anómero β de fórmula IV precipitado de la mezcla heterogénea para obtener el anómero β de fórmula IV aislado y sustancialmente enriquecido; y

d) convertir el anómero β de fórmula IV aislado y sustancialmente enriquecido en cladribina.

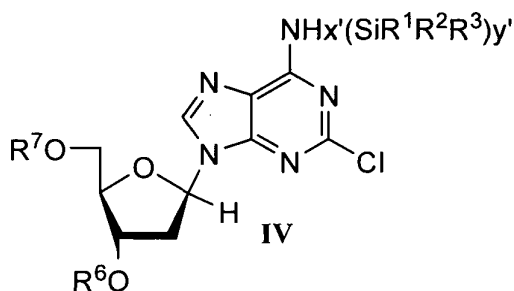
20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el compuesto de fórmula II se prepara por sililación de 2-cloroadenina con un agente de sililación en un disolvente orgánico o solo, en donde x es 0, 1, 2, y es 2, 1, 0, R^4 es hidrógeno o $SiR^1R^2R^3$, y cuando x es 2, y es 0, R^4 es $SiR^1R^2R^3$.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en donde el agente de sililación es BSTFA.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde la etapa de acoplamiento se lleva a cabo en presencia de un agente de sililación.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el grupo protector de hidroxilo es un grupo aroilo sustituido con halógeno.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el grupo lábil es acetoxi.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el disolvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en MeCN, THF, DCM, DCE, PhMe, HMDS, BSTFA, BSA, y combinaciones de los mismos, preferiblemente el disolvente orgánico es MeCN.
10. 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde antes de empezar la etapa c), el procedimiento comprende además una etapa de mantener la mezcla heterogénea formada en la etapa b) a una temperatura de 40°C a 85°C durante al menos 2 horas.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde la etapa de acoplamiento se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0°C a la temperatura de reflujo del disolvente orgánico.
15. 10. Un procedimiento para hacer un anómero β de fórmula IV



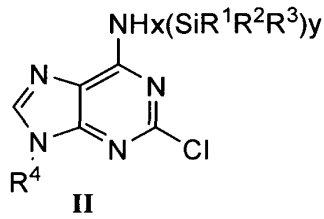
con una pureza mejorada, en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 es independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, x' es 0, 1 o 2, y' es 2, 1 o 0, cada uno de R^6 y R^7 es independientemente un grupo protector de hidroxilo, que comprende:

20. (a) tratar una mezcla que comprende el anómero β de fórmula IV y al menos un isómero no deseado, con un ácido de Brønsted o de Lewis basado en ácido sulfónico, en MeCN, y en presencia de un agente de sililación de modo que el al menos un isómero no deseado isomeriza y se convierte en el anómero β de fórmula IV;
- (b) aislar el anómero β de fórmula IV de la mezcla de la etapa (a), y opcionalmente, convertir en una etapa adicional el anómero β de fórmula IV con una pureza mejorada en cladribina.
11. Un procedimiento para hacer un anómero β de fórmula IV

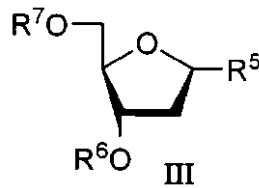


25. en donde cada uno de R^6 y R^7 es independientemente un grupo protector de hidroxilo, cada uno de R^1 , R^2 y R^3 es independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, x' es 0, 1 o 2, y' es 2, 1 o 0, que comprende:

- a) acoplar un compuesto de fórmula II



en donde R⁴ es hidrógeno o SiR¹R²R³, x es 0, 1 o 2, y es 2, 1 o 0, respectivamente, con la condición de que cuando x es 2, y es 0, R⁴ es SiR¹R²R³, y cuando R⁴ es hidrógeno, y es 2 o 1; con una 2-desoxi-ribofuranosa protegida de fórmula III



5

en donde R⁵ es un grupo lábil, en un disolvente orgánico y en presencia de un ácido de Brønsted o ácido de Lewis basado en ácido sulfónico, para obtener una mezcla de reacción que comprende el anómero β de fórmula IV;

b) precipitar selectivamente el anómero β de fórmula IV en la mezcla de reacción para obtener una mezcla heterogénea en presencia de MeCN;

10 c) aislar el anómero β de fórmula IV precipitado de la mezcla heterogénea para obtener el anómero β de fórmula IV aislado y sustancialmente enriquecido; y,

d) opcionalmente, convertir el anómero β de fórmula IV aislado y sustancialmente enriquecido en cladribina.