

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 190**

51 Int. Cl.:

**C07H 19/16** (2006.01)

**A61K 31/7076** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2008 PCT/IL2008/000360**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2008 WO08111082**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2008 E 08719985 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2137202**

54 Título: **Procedimiento de síntesis de IB-MECA**

30 Prioridad:

**14.03.2007 US 906838 P**

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

**08.11.2017**

73 Titular/es:

**CAN-FITE BIOPHARMA LTD. (100.0%)  
10 Bareket Street P.O. Box 7537  
Petach Tikva 49170, IL**

72 Inventor/es:

**BRUZINSKI, PAUL;  
LIU, XUEJUN;  
GIBB, CAMERON y  
HERNANDEZ-ABAD, PEDRO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 641 190 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 de síntesis de IB-MECA

**Campo de la invención**

5 La presente invención se incluye en el campo de la química y en particular se refiere a la síntesis de IB-MECA como se define en las reivindicaciones adjuntas a la memoria descriptiva.

**Antecedentes de la invención**

10 Adenosina es un nucleósido de purina ubicuo que se secreta extracelularmente por células metabólicamente activas y células estresadas. Adenosina es una importante molécula reguladora a través de su unión con al menos 4 receptores superficiales celulares asociados a la proteína G, clasificados actualmente como A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> y A<sub>3</sub> [Linden B. TIPS 15: 298-306 (1994); Poulsen S, Bioorg Med Chem 6: 619-41 (1998)].

15 Casi todos los tejidos humanos expresan receptores de adenosina de 1 o más clases, y esto incluye, en una densidad alta, diversas células tumorales [Merighi S, y col. Br. J. Pharmacol. 134: 1215-1226 (2001)]. La activación de los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>3</sub> ocasiona la transducción de la señal de la proteína G, que conduce a una actividad reducida de las quinasas PKB/Akt y PKA, y una menor formación de AMPc; esto inhibe el crecimiento celular [Fishman P, y col. Oncogene 21: 4060-4064 (2002)].

1-desoxi-1-(6-[[[(3-yodofenil)metil]amino]9H-purina-9-il]-N-metil-β-d-ribofuranuronamida (metil 1-[N6-(3-yodobencil)-adenin-9-il]-β-D-ribofuranamida, IB-MECA; PM=510,29 Da) es un agonista del receptor de adenosina eficaz por vía oral con potencia submicromolar específica en el receptor A<sub>3</sub> (K<sub>i</sub> = 0,47 M).

20 In vivo, IB-MECA administrada por vía oral inhibe el desarrollo de tumores en modelos de ratón singénicos (melanoma, carcinoma de colon) y xenoinjertos (carcinoma de colon y próstata) [Fishman P. y col. Anticancer Res. 23(3A): 2077-2083 (2003)].

25 Se ha descubierto también que proporcionar IB-MECA por vía oral a ratones estimula la producción de neutrófilos mediante un aumento en el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) y, en correspondencia, IB-MECA protege contra la mielotoxicidad inducida por citotoxicidad [Bar-Yehuda S, y col. Exp. Hematol. 30: 1390-139 (2002)]. IB-MECA oral inhibe también la progresión del carcinoma de colon en ratones atímicos, y estimula la recuperación de neutrófilos tras el tratamiento de fármacos citotóxicos en esta cepa.

30 Se han acumulado considerables evidencias que indican que la adenosina, a través de sus receptores, juega también un importante papel en la limitación de la inflamación. Los efectos antiinflamatorios de la adenosina se manifiestan por la inhibición de la producción de TNF-α, interleuquina 1 e interleuquina 6. Se ha descrito la implicación de la adenosina en la mediación del efecto de algunos fármacos antiinflamatorios tales como aspirina, metotrexato y sulfasalazina, respaldando el papel de la adenosina en la regulación del proceso inflamatorio. Recientes estudios sugirieron que IB-MECA, agonista del receptor de la adenosina A<sub>3</sub> muy selectivo (A<sub>3</sub>AR), inhibía la producción de TNF-α y MIP-1α *in vitro*, evitando a la vez el desarrollo de colágeno y la artritis inducida por adyuvantes (AIA) en modelos animales experimentales (documento WO2004/045627). Además, se ha mostrado que A<sub>3</sub>AR se expresa intensamente en células sinoviales y células mononucleares de la sangre periférica (PBMNC) de ratas AIA y su nivel se regula por defecto tras el tratamiento con IB-MECA (documento 2004/038419).

La síntesis química de los agonistas selectivos del receptor A<sub>3</sub> de adenosina, particularmente los compuestos de adenina, entre otros, el IB-MECA, se describió por primera vez por Jacobson K. y col. en la patente de Estados Unidos n.º 5.773.423.

40 La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2006/0014944 describe un procedimiento para la síntesis de nucleótidos.

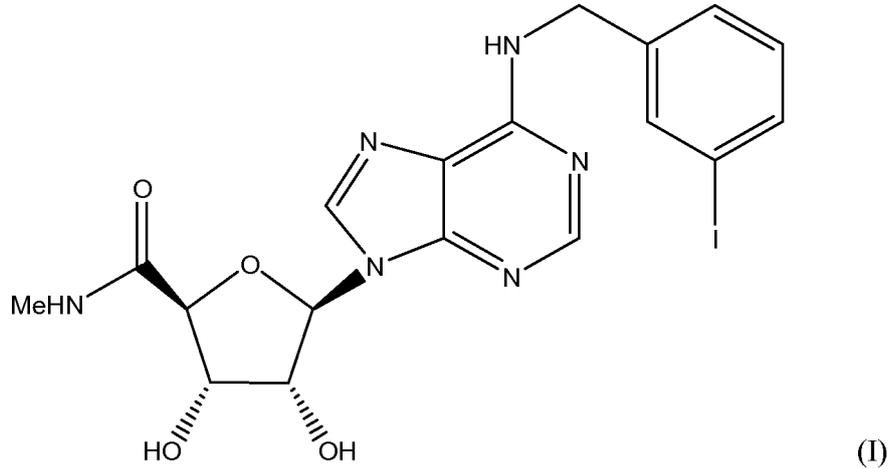
Rodenko B. y col. [Bioorganic & Medicinal Chemistry 14:1618-1629 (2006)] describe una síntesis en fase sólida de análogos de 5'-carboxiamidoadenosina disustituidos o trisustituidos y su actividad antiprotozoaria.

45 Gallo-Rodríguez C. y col. [J. Med. Chem. 37:636-646 (1994)] describe también la síntesis de análogos de 5'-carboxiamidoadenosina sustituidos. Específicamente, se describe la síntesis de derivados de 5'-uronamido y 5'-uronamido-N6-bencilo de adenosina y su selectividad por el receptor de la adenosina A<sub>3</sub>. Se hace particular referencia a compuestos tales como 5'-N-metil-N6-(3-halobencil)adenosina y las arilaminas yodables y su potencial uso como sondas farmacológicas y bioquímicas para los receptores A<sub>3</sub>.

50 Afify y Pedersen [J. Heterocyclic Chem. 37:339-341 (2000)] describen la síntesis de adenosina N6 alquilada, incluyendo, N6-(3-yodobencil)adenosina-5'-N-metiluronamida (IB-MECA) mediante la reacción de benzotriazol con aldehído alifático, aromático o heteroaromático y adenosina.

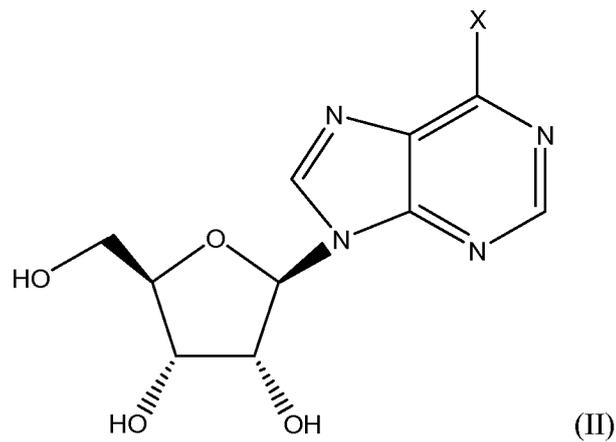
**Sumario de la invención**

De acuerdo con el primero de sus aspectos, la invención proporciona un procedimiento para la síntesis química de IB-MECA como se define en las reivindicaciones adjuntas a la memoria descriptiva. Se divulga también en el presente documento un procedimiento para la síntesis química de IB-MECA que tiene la siguiente fórmula (I):

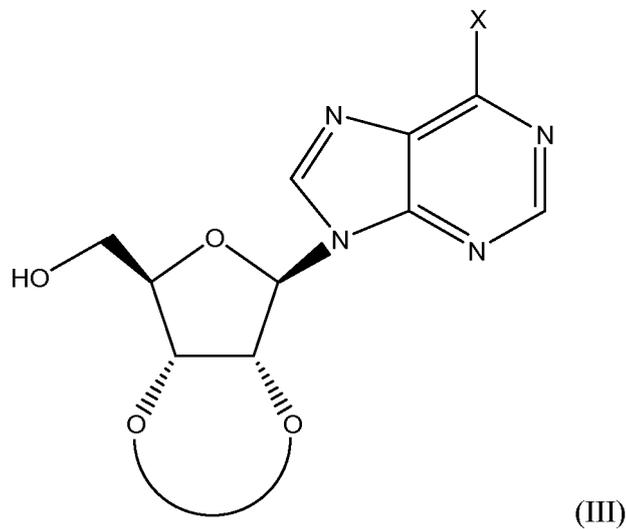


El procedimiento divulgado en el presente documento comprende:

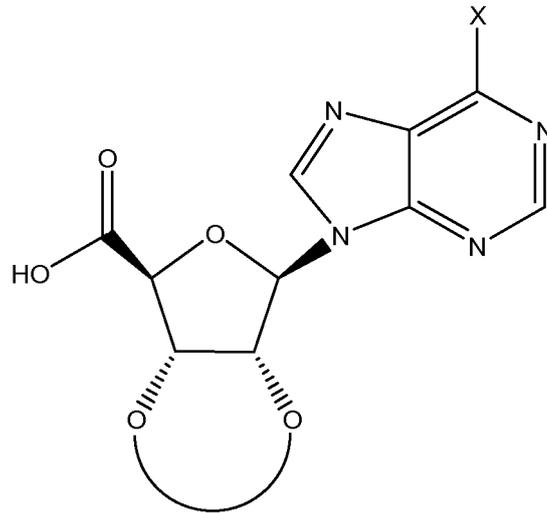
- (i) hacer reaccionar 6-halopurina-9-ribósido de la siguiente fórmula (II):



10 en la que X es un halógeno seleccionado entre Cl, I o Br;  
con un reactivo protector de diol para obtener una 6-halopurina protegida con diol de la siguiente fórmula (III):

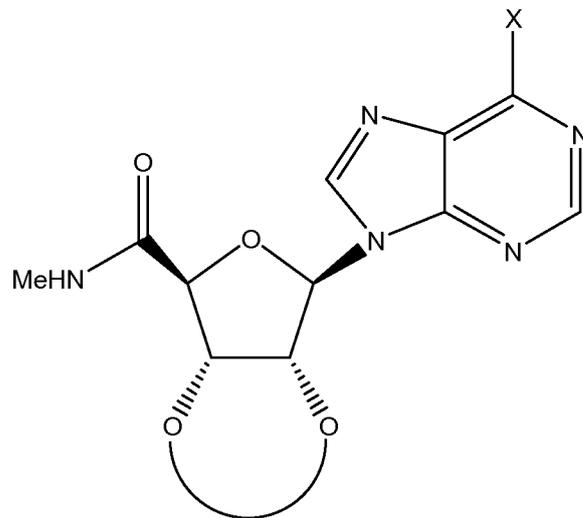


en la que dicho reactivo protector de diol comprende un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado;  
 (ii) oxidar el alcohol primario en dicha 6-halopurina protegida con diol de fórmula (III) al correspondiente derivado de ácido carboxílico de fórmula (IV):



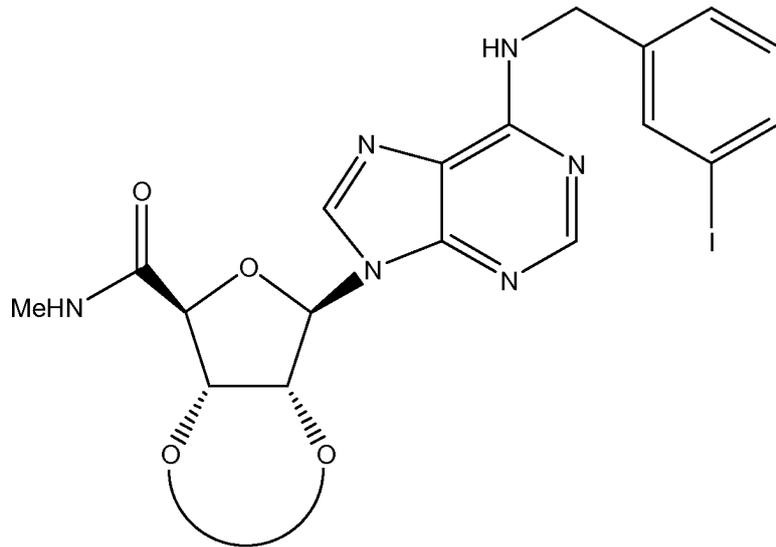
(IV)

5 (iii) hacer reaccionar el grupo ácido carboxílico del derivado de la fórmula (IV), con una dietilamina para obtener el correspondiente derivado de metilamida de la 6-halopurina protegida con diol (III), teniendo el derivado de metilamida la fórmula (V):



(V)

10 (iv) sustituir el grupo halógeno de dicho derivado de metilamida (V) con 3-yodobencilamina para formar un IB-MECA protegido con diol que tiene la fórmula (VI);



(VI)

(v) eliminar la protección con diol para obtener dicho IB-MECA de fórmula (I).

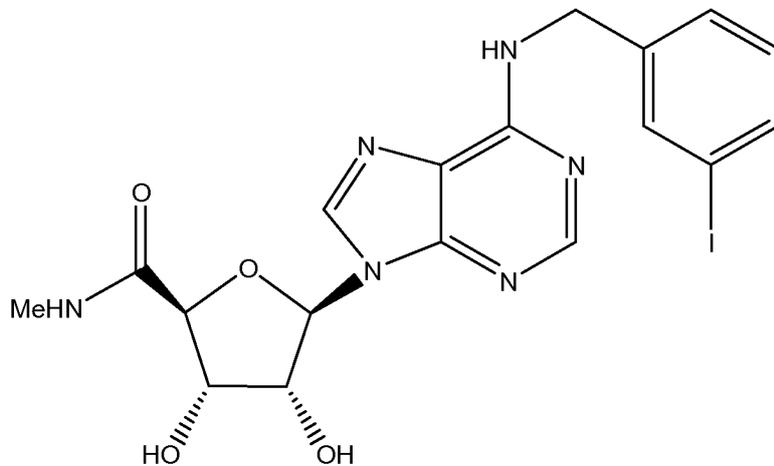
Se divulga también en el presente documento un IB-MECA sintetizado químicamente siempre que obtenga por el procedimiento de la invención así como composiciones farmacéuticas que comprenden el mencionado IB-MECA sintetizado químicamente.

5

**Descripción detallada de algunas realizaciones ilustrativas**

La presente invención se basa en el desarrollo de un procedimiento eficaz para la síntesis de IB-MECA, y el hallazgo de que este procedimiento es también adecuado para las buenas prácticas de fabricación actuales (cGMP) de IB-MECA. Se señala que IB-MECA se denomina a veces por el término CF101.

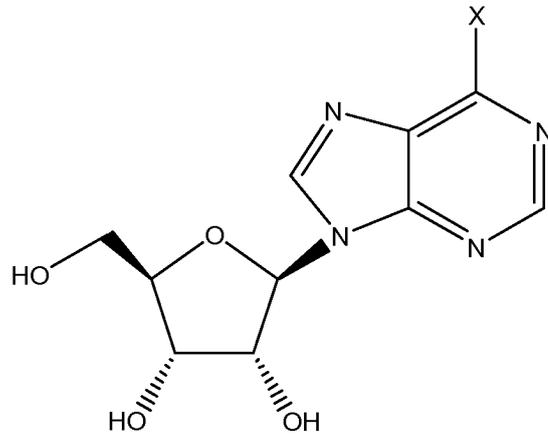
10 De este modo, se divulga en el presente documento un procedimiento para la síntesis química de IB-MECA, que tiene la siguiente fórmula (I):



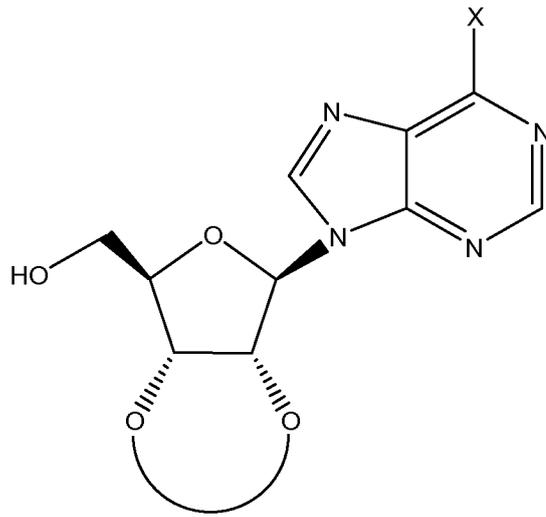
(I)

comprendiendo el procedimiento:

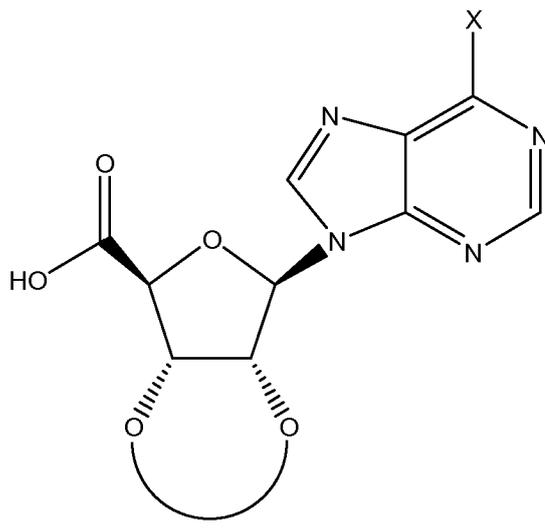
(i) hacer reaccionar 6-halopurina-9-ribósido de la siguiente fórmula (II):



en la que X es un halógeno seleccionado entre Cl, I o Br;  
 con un reactivo protector de diol para obtener una 6-halopurina protegida con diol de la siguiente fórmula (III):

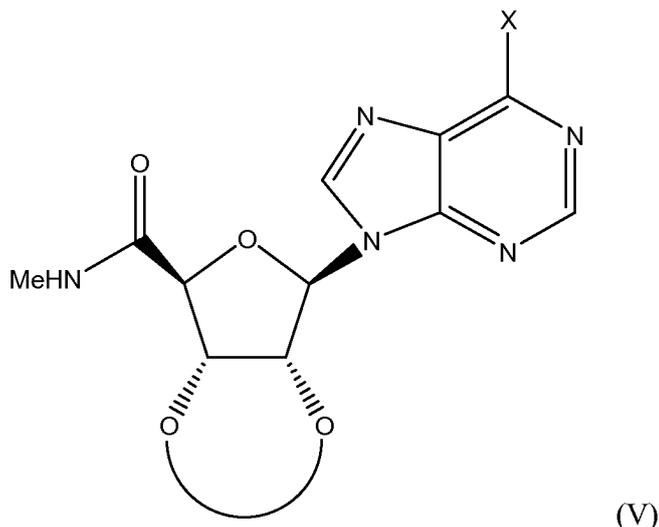


- 5 en la que dicho reactivo protector de diol comprende un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado;  
 (ii) oxidar el alcohol primario en dicha 6-halopurina protegida con diol de fórmula (III) al correspondiente derivado de carboxilo de fórmula (IV):

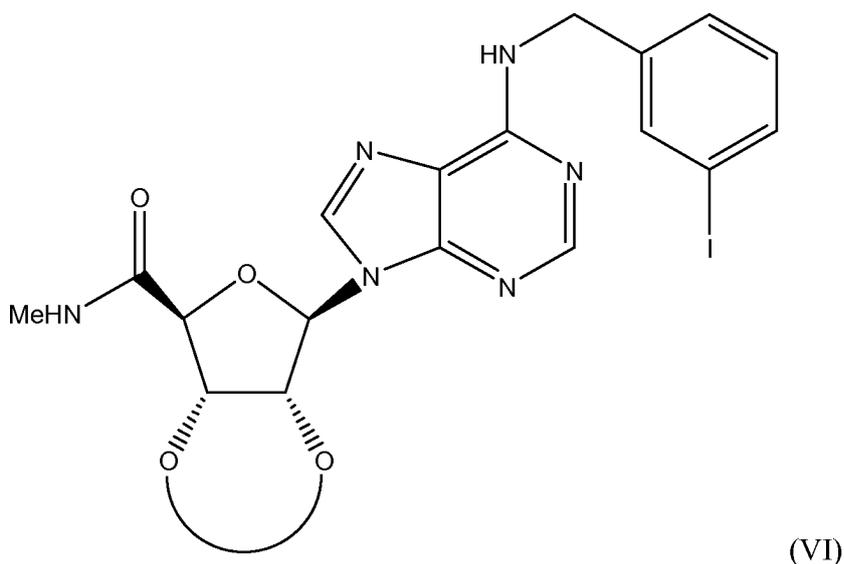


- 10 (iii) hacer reaccionar el grupo ácido carboxílico del derivado de fórmula (IV) con una metilamina para obtener el correspondiente derivado de metilamida de la 6-halopurina protegida con diol (III), teniendo el derivado de

metilamida la fórmula (V):



(iv) sustituir el grupo halógeno del derivado de metilamida (V) con 3-yodobenilamina para formar un IB-MECA protegido con diol que tiene la fórmula (VI); y



5

(v) eliminar la protección de diol para obtener dicho IB-MECA de fórmula (I).

10

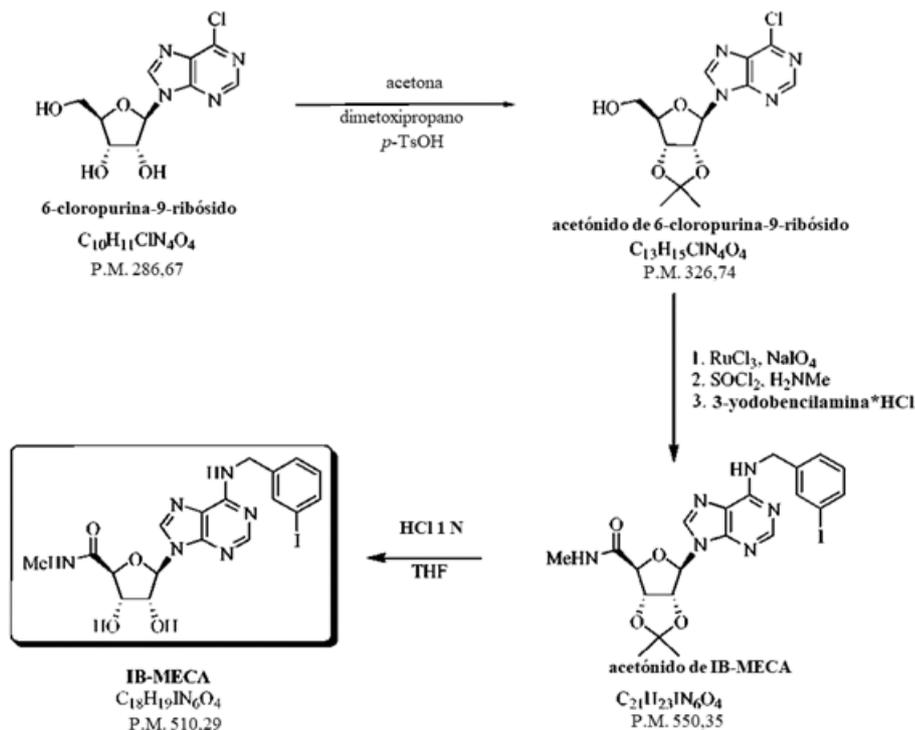
15

En la presente divulgación, el término "*reactivo protector*" se usa para denotar cualquier resto químico que se introduce en una molécula mediante modificación química de un grupo funcional para obtener quimioselectividad en una reacción química posterior. Las personas versadas en la técnica de la química orgánica conocen una variedad de reactivos protectores. Tal como se usa en el presente documento, el reactivo protector reacciona con un(os) grupo(s) funcional(es) de una molécula sustrato para formar un sustrato protegido. Este sustrato protegido es estable a las condiciones de reacción a las cuales se someterá el sustrato protegido después de lo cual se elimina de un sustrato protegido para liberar el(los) grupo(s) funcional(es) en condiciones que son compatibles con otra funcionalidad presente en el sustrato. Los grupos hidroxilo de 1,2 dioles pueden estar individualmente protegidos o se pueden proteger conjuntamente con un grupo protector de diol cíclico. Los ejemplos de grupos protectores de hidroxilo y los grupos protectores de diol adecuados pueden encontrarse en T.W. Greene y col. "Protective Groups in Organic Synthesis", 3ª Ed., John Wiley and Sons Inc., NY (1999).

20

De acuerdo con la presente divulgación, el reactivo protector comprende un resto alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. En una realización divulgada en el presente documento, la protección del grupo funcional diol se consigue haciendo reaccionar una molécula que comprende dicho grupo diol con un reactivo protector, por ejemplo, y sin quedar limitado a lo anterior, con dialquiloalcano C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, formando de esta forma un resto acetal cíclico protector sobre una molécula de sustrato, eliminándose fácilmente con las condiciones de reacción adecuadas conocidas en la técnica. Preferentemente, el dialquiloalcano es dimetoxipropano.

- En otra realización, la protección de diol se consigue en presencia de un ácido fuerte y un disolvente orgánico polar. El ácido fuerte puede seleccionarse de, sin quedar limitado a lo anterior, p-TsOH, ácido metanosulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido fórmico, ácido dordhídrico, ácido sulfúrico. El disolvente orgánico polar puede ser, de acuerdo con otra realización, un disolvente miscible en agua. Un ejemplo no limitante del disolvente orgánico polar es acetona. Otros pueden incluir acetato de etilo, metiletil cetona, cloroforno, etanol, metanol y otros.
- El término "*grupo funcional*" se usa en el presente documento para denotar átomos o grupos de átomos dentro de moléculas que son responsables de las características físicas y químicas de la molécula con respecto a sus propiedades físicas y las posibles reacciones que puede experimentar con otros reactivos. Se conocen una variedad de grupos funcionales con respecto a compuestos químicos. De acuerdo con una realización, el grupo funcional es un grupo diol presente en el anillo de furano. En una realización divulgada en el presente documento, el grupo "*diol*" funcional se refiere a los dos grupos hidroxilo (grupos -OH) unidos a átomos de carbono adyacentes.
- El término "*agente oxidante*" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier sustancia en la reacción que gana electrones y cuyo número de oxidación disminuye. En una reacción típica, el agente oxidante transfiere fácilmente átomos de oxígeno a un reactivo, por ejemplo, la 6-halopurina protegida con diol de fórmula (III), aumentando de esta forma su contenido de átomos de oxígeno.
- En el contexto de la presente divulgación los términos "*sustitución*" y "*que sustituye*", o "*que reemplaza*", que se pueden usar indistintamente, denotan cualquier sustitución de un átomo, un resto, un grupo funcional, o un sustituyente en una molécula de reactivo, mediante independientemente, otro átomo, un resto, un grupo funcional, o un sustituyente en una molécula de reactivo.
- En el contexto de la presente divulgación, el término "*sustitución nucleófila*" se refiere a una reacción en la que un reactivo rico en electrones, que tiene bien un par de electrones no compartidos o bien un resto cargado negativamente, denominados como "*reactivos nucleófilos*" ataca un resto positivo o parcialmente positivo de una molécula sustrato (por ejemplo, el carbono carboxílico de un cloruro de acilo) y sustituye un grupo o un átomo (denominado también "grupo saliente", por ejemplo, el anión cloruro del sustrato de cloruro de acilo unido).
- En una realización adicional divulgada en el presente documento, la oxidación del alcohol primario en la 6-halopurina protegida con diol de fórmula (III) del derivado de ácido carboxílico correspondiente se realiza en presencia de una cantidad catalítica de un agente oxidante.
- Una lista no limitante de agentes oxidantes que puede ser adecuada para la oxidación de los alcoholes primarios a los correspondientes ácidos carboxílicos, comprende rutenio metálico (Ru), cloruro de rutenio, trióxido de cromo, peryodato de sodio, dicromato potásico, permanganato potásico, óxido de plata, ácido nítrico, óxido de platino/oxígeno, 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO), cloruro sódico y cualquiera de sus combinaciones. Preferentemente, dicha oxidación se realiza en presencia de una cantidad catalítica de RuCl<sub>3</sub> y peryodato de sodio.
- La conversión del derivado de ácido carboxílico de fórmula (IV) al correspondiente derivado de metilamida de fórmula (V) se realiza mediante sustitución nucleófila en presencia de un agente halogenante y posteriormente introduciendo el reactivo nucleófilo seleccionado, por ejemplo, metilamina.
- El término "agentes halogenantes" como se denominan en el presente contexto de la divulgación, se refiere a un agente capaz de sustituir un grupo o resto en una molécula con un átomo de halógeno. En el contexto de la presente divulgación, el agente halogenante sustituye el grupo hidroxilo en el resto de ácido carboxílico, haciéndolo por tanto más propenso a la reacción de sustitución nucleófila con el nucleófilo de metilamina, debido a que el grupo sustituido sería un anión halógeno, conocido por ser una base de Lewis débil, es decir, fácilmente sustituida por el nucleófilo. Los ejemplos no limitantes de agentes halogenantes incluyen cloruro de tionilo (SOCl<sub>2</sub>), pentacloruro de fósforo (PCl<sub>5</sub>). Preferentemente, el agente halogenante es cloruro de tionilo.
- Finalmente, se elimina el grupo protector en el resto diol del anillo de furano. Normalmente y sin quedar vinculado a teoría alguna, la eliminación de los grupos protectores es una reacción de escisión reductora, llevada a cabo en presencia de ácidos fuertes. La eliminación del grupo protector de diol puede llevarse a cabo en presencia de un ácido fuerte y un disolvente polar no prótico. De acuerdo con una realización, el ácido fuerte es HCl y el disolvente es tetrahidrofurano (THF). En esta etapa del proceso de reacción, se pueden emplear también otros disolventes polares no próticos conocidos en la materia incluyendo, aunque no de forma limitativa, dimetil sulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dioxanos y hexametilfosforotriamida (HMPA).
- De acuerdo con la presente divulgación, el procedimiento de producir IB-MECA se obtiene de acuerdo con el siguiente esquema:



Una ventaja del procedimiento de la invención es que es aplicable también a la producción a gran escala de IB-MECA.

5 En el contexto de la presente divulgación, la producción a gran escala se refiere a cantidades de decenas de gramos a kilogramos de material de producto final. Como se muestra en los ejemplos específicos, no existe necesidad de procedimientos intermedios de purificación. Como apreciarán los expertos en la materia, las etapas de purificación intermedias conducen a menores rendimientos del producto final y por tanto no suelen ser normalmente adecuadas para las producciones a gran escala. Se ha descubierto que el procedimiento de la invención era adecuado para la producción de IB-MECA tanto a pequeña escala como a gran escala.

10 Además, se ha establecido que el procedimiento de la invención es adecuado para las *buenas prácticas de fabricación* (GMP) de IB-MECA. Se sabe bien que las GMP denotan el conjunto de normativas, códigos, y directrices para la fabricación de sustancias farmacológicas (conocidas también como principios activos farmacéuticos (API)) y productos farmacológicos (conocidos como productos medicinales en Europa), productos sanitarios, productos para diagnóstico *in vivo* e *in vitro*, y alimentos. En Estados Unidos, las GMP se denominan como "cGMP" o "*buenas prácticas de fabricación actuales*". Este término se reconoce en todo el mundo para el control y la gestión de la fabricación y la prueba del control de calidad de los productos farmacológicos.

En otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un IB-MECA sintetizado químicamente de fórmula (I), siempre que se obtenga mediante el procedimiento de la invención.

20 En una realización adicional de la presente divulgación se proporciona una composición farmacológica que comprende el IB-MECA sintetizado químicamente siempre que se obtenga mediante el procedimiento de la invención.

25 Las composiciones farmacológicas divulgadas en el presente documento pueden utilizarse para el tratamiento o la prevención de diversas enfermedades. El término "*tratamiento*" y similares se usan en el presente documento para referirse a la obtención de un efecto farmacológico y fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de evitar o evitar parcialmente una enfermedad, sus síntomas o dolencias y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad, dolencia, síntoma o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "*tratamiento*", tal como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) evitar que se produzca la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que no se ha diagnosticado todavía que la tiene, es decir, conseguir que no se desarrollen los síntomas clínicos de la enfermedad en un sujeto que pueda estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha experimentado o mostrado síntomas de la enfermedad; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas clínicos; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, producir la regresión de la enfermedad y/o de sus síntomas o dolencias.

Una lista no limitante de enfermedades que se pueden tratar mediante la composición divulgada en el presente documento comprende la inflamación, como se describe generalmente en los documentos WO 2004/045627; WO 2005/063246; WO/2005/111053 y en el documento WO 2006/059328; cáncer, como se describe generalmente en el documento WO2000/040251, y en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 60/838.863; sequedad ocular, como se describe generalmente en la solicitud de patente PCT n.º IL2006/000130; el documento WO2006/011130 y en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/604.905; replicación vírica, como se describe generalmente en el documento WO02/055085; osteoartritis, como se describe generalmente en la solicitud PCT n.º IL2006/001374; así como la resorción acelerada del hueso, como se describe generalmente en el documento WO 2006/048884.

## 10 Ejemplos

### Materiales

- 6-Cloropurina-9-ribosa (obtenida de Wilshire Technologies)
- p*-TsOH H<sub>2</sub>O (obtenido de Aldrich)
- 2,2-dimetoxipropano (obtenido de Aldrich)
- 15 Cloruro de rutenio (III) hidratado (obtenido de Aldrich)
- clorhidrato de 3-yodobendilamina (obtenido de Apollo)
- TBAI (obtenido de Aldrich)
- CH<sub>3</sub>CN (obtenido de Fisher)
- H<sub>2</sub>NCH<sub>3</sub> (obtenido de Aldrich)
- 20 SOCl<sub>2</sub> (obtenido de Aldrich)
- NaIO<sub>4</sub> (obtenido de Aldrich)

### Procedimientos

#### **Ejemplo 1: Síntesis de IB-MECA**

##### **1. Preparación del acetónido (III)**

###### 25 1.1 El procedimiento de síntesis

Se preparó acetónido de 6-cloropurina-9-ribosa (III) a partir de la 6-cloropurina-9-ribosa (II) comercialmente disponible mediante tratamiento con 2,2-dimetoxipropano en presencia de ácido *p*-toluenosulfónico catalítico.

La conversión del ribósido (II) en el acetónido (III) requirió aproximadamente 48 horas para alcanzar la finalización a 20-25°C. El procedimiento de elaboración utilizado se *detalla* a continuación e implicó la inactivación rápida con una solución acuosa de hidróxido de sodio, la concentración de la mezcla hasta sequedad seguido por una elaboración extractiva acuosa en cloruro de metileno. A continuación se aisló el acetónido (III) mediante secado con sulfato de magnesio, filtración para eliminar el agente desecante, intercambio de disolventes en acetonitrilo para precipitar el producto, recogida mediante filtración y secado al vacío. Se obtuvo una segunda cosecha del acetónido (III) mediante concentración de los licores madre y aislamiento de la suspensión en acetonitrilo. El rendimiento combinado (dos cosechas) del acetónido (III) a partir de la 6-cloropurina-9-ribosa (II) fue del 85,7%.

A continuación se presenta un *Detalle* de la etapa de síntesis llevada a cabo para la elaboración del acetónido (III) (todos los reactivos, están indicados en peso y volumen equivalentes con respecto a la entrada de la 6-cloro-9-ribósido (II)):

- 40 - Se añadió el ribósido de fórmula (II) (1 equivalente en peso) a acetona (23 vol) y se inició la agitación de la mezcla de reacción.
- A continuación se añadieron TsOH (0,05 equiv) y 2,2-dimetoxipropano (3,5 equiv) a la mezcla de reacción.
- La mezcla de reacción se agitó a 20°C-25°C durante 48-96 horas durante las cuales se tomaron muestras para determinar la finalización de la reacción mediante HPLC. Se determinó la condición de finalización cuando no queda más de un 2% del ribósido (II) (NMT).
- 45 - A continuación la reacción se inactivó rápidamente mediante la adición de NaOH 1 N (0,052 equiv) y agitación durante 1 hora.
- A continuación se secó la mezcla resultante usando evaporación rotatoria a 30°C-40°C.
- A continuación, el residuo resultante se repartió entre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 vol) y agua (10 vol), se agitó durante 15 minutos y se dejó sedimentar.
- 50 - Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 3 vol).
- Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron con MgSO<sub>4</sub> (2,5 equiv en peso).
- La mezcla de extractos se filtró a través de un lecho de tierra de diatomeas y la torta se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,5 vol).
- El filtrado se concentró hasta sequedad mediante evaporación rotatoria a 30°C-40°C.
- 55 - El residuo se suspendió en CH<sub>3</sub>CN (2 vol) a 55°C-65°C durante una hora.
- La suspensión se enfrió a 0°C-10°C, a continuación se envejeció a 0°C-10°C durante al menos una hora.
- A continuación, el producto se recogió mediante filtración y se lavó la torta resultante con CH<sub>3</sub>CN frío (0,5 vol).

- Se secó el producto (la torta) a 25°-35°C para dar el acetónido de fórmula III (primera cosecha). El rendimiento esperado fue del 59-76%; la pureza fue del 96,6 al 99,5%.
- Para aumentar el rendimiento, se recuperó el licor madre para la segunda cosecha:
- Se concentró el filtrado procedente de la segunda cosecha hasta sequedad.
- 5 - Se suspendió el residuo en CH<sub>3</sub>CN (0,15 vol) de 55°C a 65°C durante al menos 30 minutos.
- Se enfrió el producto a 0°C-10°C y se envejeció a 0°C durante al menos una hora.
- Se recogió el producto (la torta) mediante filtración y se lavó con CH<sub>3</sub>CN frío (0,03 vol).
- Se secó el producto a 25°C-35°C para dar el acetónido de fórmula III (segunda cosecha). El rendimiento esperado fue del 9-14%; la pureza fue del 96,2 al 97,8%. El rendimiento esperado de las dos cosechas fue del
- 10 73-85%.

### 1.1 Optimización del proceso para la elaboración del acetónido (III)

Se hizo reaccionar el ribósido de fórmula (II) (30 g) con 2,2-dimetoxipropano, utilizando las condiciones establecidas (Etapas 1-3, en el *Detalle* anterior), para dar el acetónido (III) como una solución en acetona. La mezcla se inactivó rápidamente con una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 N (Etapa 4, en el *Detalle* anterior), y se dividió en

15 porciones.

#### 1.2 Aislamiento del acetónido (III) a partir de agua

La solución de acetona anterior se concentró, mediante evaporación rotatoria a presión reducida, hasta nueve volúmenes, a continuación se diluyó con agua (27 vol) y se agitó mecánicamente durante 20 minutos. La temperatura del lote aumento de 23 a 28°C y se observó alguna precipitación. La mezcla se enfrió a 4°C y se envejeció a 3-5°C durante una hora. Se observó la precipitación del material como un sólido cristalino fino. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua-acetona (2:1, 1,5 vol) y se secó al vacío (30 pulgadas de Hg; [0,106 MPa]) a temperatura ambiente para dar como resultado el acetónido (III) como un sólido de color amarillo pálido con un rendimiento del 68% y una pureza del 98,8% (ABC, HPLC).

20

Para aumentar el rendimiento del acetónido (III), se llevó a cabo su aislamiento a partir de una mezcla de acetona/agua más concentrada. Por lo tanto, la solución de acetona se concentró hasta nueve volúmenes, como anteriormente, a continuación se diluyó con agua (9 vol) y se agitó durante 10 minutos. La mezcla se concentró adicionalmente hasta 12,5 volúmenes (la relación acetona-agua estimada era de 2,6:1) y el producto precipitó como un material cristalino fino. La mezcla se enfrió con agitación a 5°C, se envejeció durante 30 minutos; a continuación, el producto se recogió mediante filtración, se lavó con agua-acetona (2:1, 1,5 vol) y se secó al vacío a temperatura ambiente para dar como resultado el acetónido (III) como un sólido de color amarillo pálido con un rendimiento del 80% y un 99,3% de pureza (ABC, HPLC). El rendimiento y la pureza del acetónido (III) se aumentaron utilizando este procedimiento.

25

30

#### 1.3 Aislamiento del acetónido (III) a partir de acetonitrilo

La solución de acetona se concentró hasta seis volúmenes, a presión reducida, y el producto precipitó a partir de la mezcla de reacción inactivada rápidamente. Se necesitó acetonitrilo (15 vol) para solubilizar el volumen de los sólidos. Se clarificó la mezcla y el filtrado se concentró mediante evaporación rotatoria a presión reducida hasta tres volúmenes. La suspensión resultante se agitó a 60°C (temperatura del baño) durante una hora, a continuación se enfrió a 5°C y se envejeció a durante una hora. El producto se recogió mediante filtración, se lavó con agua-acetona (2:1, 1,5 vol) y se secó al vacío a temperatura ambiente para dar como resultado el acetónido 2 como un sólido de color amarillo pálido con un rendimiento del 65% y un 98,5% de pureza (ABC, HPLC).

35

40

Resultó evidente a partir de estos experimentos que el acetónido (III) era relativamente insoluble tanto en agua como en acetonitrilo en comparación con acetona. Se han obtenido los mejores resultados mediante el aislamiento del acetónido (III) en agua/acetona. Se repitió la reacción y se preparó el acetónido (III) con un rendimiento del 79% (27,1 g) y una pureza del 99,54% (ABC, HPLC) a partir del ribósido (II) (30 g) utilizando las modificaciones descritas anteriormente. Las condiciones optimizadas permitieron la eliminación de la etapa de extracción líquido-líquido, dos evaporaciones hasta sequedad y la necesidad de aislar una segunda cosecha del acetónido (III). La eficacia mejorada del procedimiento de elaboración redujo significativamente el ciclo temporal para el aislamiento del acetónido (III).

45

## 2. Proceso para la elaboración de ácido carboxílico (IV)

### 2.1 El procedimiento de síntesis

50

El acetónido (III) se convirtió en el ácido carboxílico (IV) mediante oxidación utilizando un sistema de tricloruro de rutenio/perodato de sodio en una solución acuosa de acetonitrilo. La reacción es exotérmica, calentando de forma relativamente rápida de 5°C a 31°C tras la adición de perodato de sodio.

A continuación se presenta un *Detalle* de las etapas sintéticas para la preparación del ácido carboxílico (IV):

- 55 1. El acetónido de fórmula (III) (1 equiv en peso) y acetonitrilo (14,9 vol) se introdujeron en un reactor.

2. Además, se añadió al reactor  $\text{RuCl}_3$  (0,01% en peso, 1,6% en moles) y a continuación agua (4 vol).
3. A continuación, se añadió yoduro de tetrabutamonio (TBAI) al reactor (0,01% en peso, 1 % en moles).
4. La mezcla resultante se enfrió a  $<5^\circ\text{C}$ .
5. A la mezcla de reacción enfriada se añadió  $\text{NaIO}_4$  (1,5% en peso, 2 equiv), en porciones, manteniendo la temperatura de la mezcla a  $<30^\circ\text{C}$ .
6. Se agitó la mezcla a  $15^\circ\text{C}$ - $30^\circ\text{C}$  y se controló mediante TLC para determinar la finalización de la reacción.
7. El producto de la reacción se filtró para eliminar los componentes inorgánicos y la torta filtrada se enjuagó con acetonitrilo (6 vol).
8. El filtrado se concentró en un rotavapor hasta sequedad a  $30^\circ\text{C}$ - $40^\circ\text{C}$  (temperatura del baño). En esta etapa, el producto se decoloró por la evaporación del  $\text{RuO}_4$  volátil.
9. El residuo se suspendió en THF (1,67 vol) a  $15^\circ\text{C}$ - $25^\circ\text{C}$  y se transfirió desde el bulbo del rotavapor a un reactor limpio.
10. Se añadió THF (18,5 vol) al reactor limpio y se agitó durante 30 minutos.
11. El producto de la etapa 10 se filtró a continuación a través de un lecho DE y la torta se enjuagó con THF (0,66 vol).
12. El filtrado se concentró hasta sequedad mediante evaporación rotatoria a  $30^\circ\text{C}$ - $40^\circ\text{C}$ .
13. El residuo se suspendió en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (2,33 vol) a  $30$ - $40^\circ\text{C}$  hasta que fue completamente móvil.
14. El producto de la etapa 13 se concentró a continuación hasta sequedad mediante evaporación rotatoria a  $30^\circ\text{C}$ - $40^\circ\text{C}$ .
15. Se añadió IPAc (acetato de isopropilo) (17,5 vol) en porciones al reactor mediante el bulbo del rotavapor, y el producto de reacción se transfirió al reactor.
16. Se añadió también agua (5 vol) al reactor y la mezcla del reactor se agitó durante dos horas.
17. Se separaron las fases y la fase orgánica se lavó con agua (5 vol).
18. Las fases acuosas se combinaron, y se volvieron a extraer con IPAc (3 vol).
19. Las fases orgánicas se combinaron y se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (1,67 equiv en peso) durante una hora.
20. El producto se filtró para eliminar el agente desecante y el filtrado (la torta) se enjuagó con IPAc (2 vol).
21. A continuación se recogió el filtrado a sequedad mediante evaporación rotatoria ( $30^\circ\text{C}$ - $40^\circ\text{C}$ ).
22. A continuación se secó el residuo en un homo al vacío a  $30^\circ\text{C}$ - $40^\circ\text{C}$  hasta peso constante. El sólido se trituró y se continuó con el secado hasta que se consiguió un peso constante. El rendimiento esperado fue del 85%, la pureza esperada fue del 92-93% (HPLC).

### 2.1 Optimización de la elaboración del ácido carboxílico (IV)

Se retiró una muestra del lote y se enfrió a  $6^\circ\text{C}$  y se formó una suspensión muy espesa. Se añadió acetonitrilo (4 vol), que disolvió la mayoría del material sólido, y la mezcla se concentró de nuevo a cuatro volúmenes. Tras enfriar a  $6^\circ\text{C}$ , y mantener durante una hora, la muestra formó una suspensión bien formada. El producto se recogió mediante filtración, se lavó con agua y se secó para dar el compuesto de fórmula (IV) como un sólido blanquecino con una pureza del 95,3% (ABC, HPLC).

El resto de la mezcla de reacción se elaboró como se ha descrito en el procedimiento anterior para dar el ácido carboxílico (IV) con un rendimiento del 77% que contiene un 7,0% en peso de IPAc. Esto se compara con el resultado de cGMP previo para la elaboración del acetónido (III) con un rendimiento del 85% que contiene 7,4% en peso (IPAc).

La reacción de oxidación se repitió y se aisló el ácido carboxílico (IV) mediante cristalización en agua/acetonitrilo como se ha descrito para la muestra anterior. En esta ocasión, la mezcla de reacción no se decolora en la franja inicial de acetonitrilo/agua (Etapa 8 del *Detalle* anterior) y se aisló el ácido carboxílico (IV) como un sólido gris con un rendimiento del 78% y una pureza del 97,9% (ABC, HPLC). Dicho comportamiento "sin decoloración", inicialmente atribuido a realizar la reacción de oxidación a  $<25^\circ\text{C}$ , se observó durante la elaboración de un lote de cGMP previo de IB-MECA y no afecta a la calidad del API producido. El análisis de Karl Fischer indicó que el lote contenía un 0,19% de agua.

### 2.2 Control de la exotermia retrasada durante la elaboración de ácido carboxílico (IV)

La oxidación del acetónido (III) estuvo acompañada por una exotermia retrasada, tras la adición de peryodato de sodio. La interrupción del enfriamiento activo da como resultado un rápido calentamiento del lote desde  $5$  a  $30^\circ\text{C}$ . Esto supone un riesgo de seguridad significativo, particularmente tras escalado a un equipo de fabricación fijo.

Para controlar mejor la exotermia, se llevó a cabo una adición inversa del sustrato (acetónido (III)) a la mezcla de tricloruro de rutenio y peryodato de sodio. Se añadió el acetónido (III) (5 g) en forma de solución en acetonitrilo-agua a la mezcla oxidante en agua a  $30$ - $35^\circ\text{C}$  durante dos horas. La reacción se completó después de 16 horas como se observó regularmente para el modo usual de adición. Utilizando las condiciones de elaboración mejoradas pero enfriando a  $20^\circ\text{C}$  en vez de a  $5^\circ\text{C}$ , se obtuvo el compuesto de fórmula (IV) como un sólido blanco con un rendimiento del 62% y una pureza del 99,3% (ABC, HPLC). Se aisló una segunda cosecha de material mediante filtración de los licores madre, donde se había producido una cristalización adicional, se lavó con agua y se secó para dar el compuesto de fórmula (IV) como un sólido de color crema con un rendimiento del 19% y una pureza del 98,2% (ABC, HPLC). El rendimiento combinado de las dos cosechas del compuesto de fórmula (IV) fue del 81%. Ambas

cosechas fueron adecuadas para su uso en la siguiente etapa (es decir, la preparación del acetónido de IB-MECA (VI)).

### 2.3 Optimización de las condiciones para el ácido carboxílico (IV)

5 El acetónido (III) (25 g) se convirtió en ácido carboxílico (IV) empleando la adición inversa del sustrato a la mezcla oxidante. Cuando se completó la oxidación, el lote se filtró para eliminar las impurezas orgánicas y la torta del filtro se lavó con acetonitrilo (6 vol). El filtrado se diluyó con más agua (3 vol) para dar una solución de ácido carboxílico (IV) en acetonitrilo (aproximadamente 21 vol) y agua (aproximadamente 7 vol). El lote se concentró mediante destilación a vacío a 26-36°C hasta ocho volúmenes. La relación acetonitrilo-agua estimada en este punto fue de 40:60 respectivamente. El lote se enfrió a 5 -10 °C para inducir la cristalización y se envejeció durante una hora. El producto se recogió mediante filtración, se lavó con agua y se secó para dar el compuesto de fórmula (IV) como un sólido de color blanco con un rendimiento del 75% y una pureza del 99,75% (ABC, HPLC).

15 Este proceso optimizado eliminó la necesidad de una elaboración extractiva, el uso de THF e IPAc, una filtración y cuatro evaporaciones hasta sequedad. El ciclo temporal para el aislamiento del ácido carboxílico (IV) se redujo significativamente y el producto se aisló de una forma fácilmente manejable. Cuando se corrigieron para el contenido de IPAc, los rendimientos de los procedimientos existentes y los desarrollados recientemente fueron comparables (77 frente a 75% respectivamente) y se aisló el ácido carboxílico (IV) con una pureza mayor mediante cristalización en acetonitrilo-agua (97,9-99,7%).

### 3. Proceso para la preparación del acetónido de IB-MECA (VI)

20 El ácido carboxílico (IV) se convirtió en el acetónido de IB-MECA (VI) en tres etapas, como se detalla a continuación. El ácido carboxílico (IV) se convirtió en cloruro de ácido mediante tratamiento con cloruro de tionilo en acetonitrilo, a continuación en la amida (V) mediante reacción con metilamina en presencia de diisopropiletilamina (DIPEA). El acoplamiento de la amida (V) con clorhidrato de 3-yodobencilamina proporciona el acetónido de IB-MECA (VI). Los intermedios del cloruro ácido y la amida (V) no se aíslan.

#### 3.1 Purificación del clorhidrato de 3-yodobencilamina

25 La calidad del clorhidrato de 3-yodobencilamina tuvo un impacto significativo sobre el resultado de la síntesis. En particular, el clorhidrato de 3-bromobencilo, una impureza presente en el clorhidrato de 3-yodobencilamina, era conocido por persistir durante el procesamiento posterior que inducía el API. Se estableció un límite superior de ≤0,5% para el clorhidrato de 3-bromobencilamina en clorhidrato de 3-yodobencilamina para una preparación satisfactoria de IB-MECA. Como no estuvo disponible para el trabajo de optimización un suministro comercial de clorhidrato de 3-yodobencilamina, se investigaron los procedimientos de purificación.

35 Se llevó a cabo un estudio de solubilidad sobre clorhidrato de 3-yodobencilamina utilizando los disolventes empleados en la síntesis de IB-MECA, cuyos resultados se detallan en la Tabla 1 siguiente. El clorhidrato de 3-yodobencilamina recristalizó en disolventes apróticos, pero fue insoluble en disolventes orgánicos apróticos. No se observó aumento de pureza durante las suspensiones calientes (temperatura de reflujo) en disolventes orgánicos apróticos.

**Tabla 1 - Estudio de solubilidad sobre clorhidrato de 3-yodobencilamina**

	<b>Disolvente</b>	<b>Volúmenes de disolvente</b>	<b>Comportamiento a 21°C</b>	<b>Comportamiento a reflujo</b>	<b>Comentarios</b>
1	MeOH	1	Insoluble	Soluble	Recristalizado, sin aumento de pureza
2	MeCN	5	Insoluble	Insoluble	La suspensión caliente no aumenta la pureza
3	IPAc	10	Insoluble	Insoluble	La suspensión caliente no aumenta la pureza
4	IPA	10	Insoluble	Soluble	Recristalizado, sin aumento de pureza
5	THF	10	Insoluble	Insoluble	La suspensión caliente no aumenta la pureza

40 La recristalización en agua (4 vol) reduce el nivel del clorhidrato de 3-bromobencilamina en clorhidrato de 3-yodobencilamina hasta niveles comprendidos en los aceptables. Para generar un suministro para usar en la prueba de concepto del clorhidrato de 3-yodobencilamina (150 g, de Apin) se recristalizó en agua con un rendimiento del 78,6%. La concentración de clorhidrato de 3-bromobencilamina se redujo del 0,92% al 0,38%.

Un lote de ácido carboxílico (IV), preparado utilizando las condiciones modificadas, se convirtió en el acetónido de IB-MECA (VI) utilizando el procedimiento *detailed* a continuación. Todos los reactivos, se indican en equivalentes en peso y volumen con respecto a la entrada de ácido carboxílico (IV).

1. El derivado de ácido carboxílico de fórmula IV (1 equiv en peso) se mezcló con acetonitrilo (10 vol) que formó

una suspensión pesada y la suspensión pesada se agitó a 20°C-25°C;

2. A la suspensión agitada se añadió un agente halogenante, a saber, cloruro de tionilo (1,6 equiv) y se agitó la mezcla durante al menos una hora para formar una solución;

3. La reacción se controló para controlar su finalización mediante TLC eluyendo con IPAc-MeOH (10:1).

5 4. La solución de reacción se concentró hasta un aceite (para eliminar el cloruro de tionilo) mediante evaporación rotatoria a 20°C (temperatura del baño).

- Se añadió acetonitrilo (0,5 vol) y la mezcla se concentró hasta un aceite una vez más. Este aceite comprendía cloruro ácido concentrado.

5. El cloruro de ácido se volvió a disolver en acetonitrilo (10,4 vol) y se enfrió a <2°C agitando a la vez.

10 6. Se añadió metilamina (solución 2 M en THF, 1,05 equiv) y la temperatura de la mezcla se mantuvo a <5°C. Se observó un precipitado de color blanco (posiblemente, clorhidrato de metilamina) en el reactor.

7. El producto se agitó a <5°C durante al menos 15 minutos.

8. A continuación se añadió DIPEA (1,5 equiv) y la temperatura del sistema se mantuvo a <5°C.

15 9. Se interrumpió el enfriamiento activo y se dejó calentar la mezcla de reacción a 20°C durante aproximadamente dos horas.

10. La reacción se controló para controlar su finalización mediante TLC eluyendo con IPAc-MeOH (10:1). Tras completarse, se obtuvo una solución de amida (V) en MeCN/THF.

11. A la solución de la amida (V) se añadió clorhidrato de 3-yodobencilamina (1,35 equiv) seguido por DIPEA (5,0 equiv).

20 12. Se calentó la mezcla a 70°C y se controló para determinar la finalización de la reacción mediante HPLC. El tiempo de reacción esperado era de 14-16 horas y la condición de agotamiento era 0,7% de la amida (V) restante.

13. Cuando se completó, el producto se enfrió a <40°C y se concentró hasta un aceite mediante evaporación rotatoria, el espumado en este punto se evitó especialmente.

25 14. A continuación se disolvió el residuo en iPAC (8 vol).

15. Se añadió al residuo disuelto una solución saturada acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (7 vol) y la mezcla se agitó durante al menos 30 minutos.

16. A continuación se detuvo la agitación para permitir la sedimentación, y la separación de fases.

17. La fase orgánica se lavó con agua (4 vol).

30 18. Las fases acuosas combinadas se extrajeron de nuevo con IPAc (2 x 3,4 vol).

19. Los extractos orgánicos se combinaron y concentraron hasta un residuo mediante evaporación rotatoria.

20. El producto se suspendió a continuación en MeOH (4 vol) y después se concentró hasta conseguir un residuo mediante evaporación rotatoria.

35 21. A continuación se añadió MeOH (4 vol) al producto de la etapa 20 y se calentó hasta disolución (aproximadamente 65°C) con agitación.

22. A continuación se enfrió el producto de la etapa 21 a <30°C para inducir la cristalización.

23. A continuación se recogió el producto cristalizado mediante filtración y la torta del filtro se lavó con MeOH (1,8 vol) enfriado (13°C).

24. La torta se secó a 30°C-40°C al vacío para dar el acetónido de IB-MCA (VI).

40 25. La recrystalización en MeOH y el secado se repitieron según necesidad para obtener el acetónido de IB-MECA (VI) comprendido en las especificaciones de liberación. El rendimiento esperado fue del 48%.

El acetónido de IB-MECA (VI) se asiló en forma de un sólido de color blanco con un rendimiento del 80% y una pureza del 99,52% (ABC, HPLC) después de una única recrystalización a partir de metanol. La impureza derivada del clorhidrato de 3-bromobencilamina se observó a una concentración de 0,21% (especificación: ≤0,5%) y el resto de impurezas fueron <0,1%. Estos resultados demostraron que las modificaciones utilizadas para preparar el acetónido

45

(III) y el ácido carboxílico (IV) produjeron un material que era adecuado para su uso en la elaboración del acetónido de IB-MECA (VI). Ello implicó también el uso de un compuesto de mayor calidad de fórmula (IV) (pureza del 98,2-99,3%, anteriormente 92-93%) que permitió la elaboración del acetónido de IB-MECA (VI) con una pureza muy alta sin la necesidad de múltiples recristalizaciones. Los datos de HPLC indicaron también que la amida (V) puede purgarse satisfactoriamente a partir de una concentración de IPC de hasta 2,3% durante el aislamiento del acetónido de IB-MECA (VI).

#### 4. Proceso para la preparación de IB-MECA (I)

Se preparó IB-MECA (I) mediante desprotección del acetónido de IB-MECA (VI) utilizando una solución acuosa de ácido clorhídrico.

10 Se desprotegió el lote del acetónido de IB-MECA (VI) anterior, utilizando las etapas del procedimiento detalladas a continuación (Etapas 1-10), para dar IB-MCA (I) como un sólido de color blanco con un rendimiento del 90% y una pureza del 99,67% (ABC, HPLC). La concentración de la impureza derivada del clorhidrato de 3-bromobencilamina fue del 0,18% y ninguna otra impureza fue >0,1%.

1. Se añadieron el acetónido de IB-MECA (VI) (1 equiv en peso) y THF (5 vol) a un reactor.

15 2. Se inició la agitación seguida por la adición de ácido clorhídrico 1 N (5 vol). Se calentó la mezcla de 16°C a 25°C.

3. A continuación, se calentó la mezcla activamente a 50°C y se controló la finalización de la reacción mediante HPLC. Condición de agotamiento: ≤1,5% de acetónido restante. El tiempo de reacción esperado era de ocho horas. Si no se había completado después de ocho horas, se disminuyó la temperatura del lote a 40°C para evitar la formación de impurezas.

20 4. El producto se filtró a 40°C.

5. A continuación se enfrió el producto filtrado a al menos 15°C, posteriormente se inactivó rápidamente en una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (15 vol) manteniendo la temperatura a 10°C - 25°C. El producto precipitó en contacto con la base.

25 6. La mezcla se agitó a 10°C-25°C durante al menos 12 horas.

7. Los sólidos se recogieron mediante filtración y la torta filtrada se enjuagó con H<sub>2</sub>O (5 x 0,95 vol).

8. El producto lavado se suspendió a continuación en metanol-agua (9:1, 9,9 vol) a 50°C durante al menos 30 minutos y se enfrió a continuación a 15°C - 25°C.

9. El producto se recogió mediante filtración y la torta del filtro se lavó con metanol-agua (9:1, 0,27 vol).

30 10. El producto se secó a 30°C-40°C al vacío para dar la IB-MCA (I), el rendimiento esperado fue del 81 %.

11. El producto se volvió a suspender en agua (4,14 vol) de 35°C a 45°C durante al menos 3 horas.

12. El producto resuspendido se enfrió a continuación a 25°C y después se recogió mediante filtración.

13. La torta filtrada se lavó con agua (2 x 1 vol).

35 14. La torta lavada se secó a continuación a 55°C-65°C para dar IB-MCA (I). La recuperación esperada fue del 78%.

#### Ejemplo 2: Prueba de concepto para la síntesis a gran escala de IB-MECA (I)

Para demostrar las condiciones optimizadas desarrolladas para la síntesis de IB-MECA (I) a partir de 6-cloropurina-9-ribósido (II), los procedimientos anteriores se realizaron para la elaboración de 50 g de IB-MECA (I). De este modo, 6-cloropurina-9-ribósido (II) se convirtió en el acetónido (III) utilizando el procedimiento descrito a continuación. Todos los reactivos, se indican en equivalentes en peso y volumen con respecto a la entrada de ribósido

##### Procedimiento optimizado para la elaboración del acetónido (III)

1. El ribósido (II) (1 equiv en peso) se añadió a un reactor seguido por la adición de acetona (23 vol) y agitación.

2. A continuación se añadió al reactor TsOH (0,05 equiv) seguido por 2,2-dimetoxipropano (3,5 equiv).

45 3. La mezcla se agitó a 20°C - 25°C durante 48-96 horas y se comprobó la finalización de la reacción mediante HPLC. Condición de finalización: ribósido NMT al 2%.

4. La reacción se inactivó rápidamente mediante la adición de NaOH 1 N (0,052 equiv) y agitación durante una hora.

5. El producto se concentró mediante evaporación rotatoria (30°C - 40 °C) hasta nueve volúmenes.

6. A continuación se añadió agua (9 vol).
7. A continuación se concentró el producto mediante evaporación rotatoria (30°C - 40 °C) hasta 12,5 volúmenes.
8. La mezcla se enfrió a 0°C- 5°C; y se mantuvo a 0°C - 5°C durante al menos una hora.
9. Se recogió el producto mediante filtración por succión, seguido por enjuagado con H<sub>2</sub>O/acetona fría (0°C - 5°C) (2:1, 1,5 vol).
10. A continuación se secó el producto a 40°C para dar el acetónido (III). El rendimiento esperado fue del 79%.

Se aisló el acetónido (III) como un sólido de color blanco con cristales de color amarillo pálido con un rendimiento del 82,2% (153,1 g) a partir de 6-cloropurina-9-ribósido (II) (163,3 g) con una pureza del 99,58% (ABC, HPLC). La reacción se completó después de 63 horas (Etapa 3 del *Detalle* anterior) y se mantuvo durante la noche (14 horas) al final de la Etapa 7. La temperatura del lote inmediatamente antes de la filtración en la Etapa 9 (del *Detalle* anterior) fue de 2°C y el tiempo de secado fue de 17 horas. No se encontraron problemas de procesamiento en el análisis del lote. El acetónido (III) (147,2 g) se llevó a la siguiente etapa y se convirtió en un compuesto de fórmula (IV) utilizando el procedimiento descrito a continuación. Todos los reactivos, se indican en equivalentes en peso y volumen con respecto a la entrada del acetónido (III).

#### 15 *Procedimiento optimizado para la elaboración de ácido carboxílico (IV)*

1. NaIO<sub>4</sub> (2,30 equiv), TBAI (1 % en moles ) y agua (2 vol) se añadieron a un reactor, y se agitó para formar una suspensión.
2. Se añadió RuCl<sub>3</sub> (1,6 % en moles) y el recipiente pesado se enjuagó con agua (1 vol).
3. La mezcla del reactor se calentó a 30°C con agitación.
4. Se introdujeron el acetónido (III), como una solución en acetonitrilo (12 vol), y agua (1 vol) a la mezcla de reacción y se mantuvo la temperatura a 30°C-35°C. Se esperaba que la adición tardase dos horas hasta completarse. Cuando se completó la adición, el recipiente que contenía la solución del acetónido (III) con acetonitrilo (3 vol) se enjuagó y añadió al producto.
5. La mezcla se enfrió a 30°C - 35 °C y se controló para determinar la finalización de la reacción mediante TLC. El tiempo de reacción esperado es de 16 horas.
6. El producto se enfrió a 20°C - 25 °C y se filtró para eliminar las impurezas orgánicas.
7. El reactor y la torta del filtro se enjuagaron con acetonitrilo (6 vol) y los filtrados se diluyeron con agua (3 vol).
8. Los filtrados se concentraron hasta ocho volúmenes mediante evaporación rotatoria a 25°C-35 °C. En esta etapa, el producto se decoloró mediante evaporación del RuO<sub>4</sub> volátil.
9. El producto se enfrió a 5°C - 10 °C para inducir la cristalización y se envejeció durante al menos una hora.
10. A continuación se recogió el producto mediante filtración y la torta del filtro se lavó con agua (3 x 3 vol).
11. El producto se secó a 35°C-45°C al vacío para dar el ácido (IV). El rendimiento esperado es del 75%.

Se introdujeron el acetónido (III) en la mezcla de reacción durante tres horas y alcanzó una temperatura del lote máxima de 36°C. La oxidación se completó después de 14 horas (análisis TLC). Tras el enfriamiento a 20°C - 25 °C (Etapa 6 del *Detalle* anterior), el lote se oscureció de forma inesperada, cambiando de color naranja a verde, indicando un cambio en el estado de oxidación de las especies de rutenio desde Ru<sup>VI</sup> a Ru<sup>III</sup>. Asimismo, el lote no se decoloró durante la concentración para reducir la concentración de acetonitrilo. El ácido (IV) se aisló finalmente como un sólido de color verde oscuro con un rendimiento del 63% (96,2 g) y una pureza del 98,9% (ABC, HPLC). Como los estudios previos habían mostrado que las impurezas productoras de color se habían purgado durante el procesamiento posterior, el producto se llevó al siguiente paso sin purificación adicional. El ácido carboxílico (IV) (75 g) se convirtió en el acetónido de IB-MECA (VI) utilizando el procedimiento descrito del Ejemplo 1.

La reacción de cloración, para preparar el doruro de ácido, se completó después de 70 minutos (Etapa 3 del *Detalle* del Ejemplo 1) y el lote espumó considerablemente durante la concentración (Etapas 4 y 5 del Ejemplo 1). Se añadió metilamina (solución 2 M en THF) a la solución de doruro de ácido durante 16 minutos y la temperatura máxima del lote fue de 5°C. La conversión del doruro de ácido en amida (V) se completó después de dos horas. tiempo durante el cual el lote se calentó desde 5°C a 17°C (Etapas 10 y 11 del Ejemplo 1). El acoplamiento del dordrato de 3-yodobencilamina con la amida (V) requirió 16 horas para alcanzar la finalización (Etapa 13 del Ejemplo 1). Durante la elaboración extractiva, se observó una cantidad significativa de material sólido. En la Etapa 17 (del Ejemplo 1) el NaHCO<sub>4</sub> en exceso precipitó de la mezcla y se pudo superar por la adición de más cantidad de agua. Durante la Etapa 18 (del Ejemplo 1) el producto precipitó y requirió la adición de agua (5 vol) e IPAC (5 vol) para redissolver el acetónido de IB-MECA (VI). El análisis por HPLC de la capa acuosa al final de la Etapa 18 (del Ejemplo 1) indicó que el acetónido de IB-MECA (VI) no estaba presente en una concentración significativa. De esta forma, se omitieron las extracciones posteriores de la fase acuosa con IPAC (Etapa 19 del Ejemplo 1). Se aisló finalmente el acetónido de IB-MECA (VI) como un sólido de color verde pálido con un rendimiento del 75,2% (91,6 g) y una pureza del 99,79%. La "bromoimpureza", presente en el clorhidrato de 3-yodobencilamina en un 0,38%, se observó a una concentración relativa de 0,21%. El lote se decoloró significativa pero no completamente (el color del ácido carboxílico (IV) inicial era verde oscuro) al final del procedimiento de aislamiento.

Se desprotegió el lote del acetónido de IB-MECA (VI) (85 g), utilizando el procedimiento indicado en el Ejemplo 1, para dar IB-MCA (I) como un sólido de color blanco con un rendimiento del 84,5% (67 g) y una pureza del 99,83%. La escisión del acetónido se completó después de 9,5 horas (Etapa 3 del Ejemplo 1) y el producto se decoloró durante la extracción después de la suspensión en metanol-agua (Etapa 9 del Ejemplo 1). Después de la suspensión

en agua para eliminar el metanol residual, el producto se filtró muy lentamente y se transfirió al secador con una gran dificultad. La pureza de IB-MECA no cambió entre su aislamiento inicial del metanol-agua y tras la resuspensión de agua.

### Ejemplo 3: producción de IB-MECA (I) con cGMP

#### 5 *Fabricación con cGMP a partir del acetónido de 6-Cloropurina-9-ribósido*

En un reactor de 200 l con agitación moderada se introdujeron acetona (115 l, 23 vol) y 6-cloropurina-9-ribósido (5,0 kg, 17,4 mol, 1,0% peso/1,0 vol). Posteriormente, se añadieron p-TsOH·H<sub>2</sub>O (166 g, 0,88 mol, 0,05 equiv, 0,033 peso) y 2,2-dimetoxipropano (7,6 l, 62 mol, 3,54 equiv, 1,52 vol) y la suspensión de color amarillo resultante se agitó a temperatura ambiente. Después de 45 h, se tomó una muestra de la solución de color verde amarillento resultante y el análisis mediante HPLC desveló que el material de partida estaba presente en un 0,42% en conversión (pureza global, 96,9 % de área). El lote se neutralizó mediante la adición de NaOH 1 N (900 ml, 0,90 mol, 0,05 equiv, 0,18 vol). Esta adición tardó aproximadamente 2 min; el pH final fue pH 7. Se dejó agitar el lote durante 1 h. La mezcla de color amarillo turbio resultante se concentró a presión reducida a 35 ± 5 °C en el evaporador rotatorio durante un periodo de 8 h, hasta que se consiguió un volumen de 45 l (9,0 vol). El concentrado se almacenó bajo N<sub>2</sub> a 2-8 °C.

15 El concentrado se transfirió a un reactor de 200 l y comenzó la agitación. Se añadió agua (45 l, 9,0 vol) y la suspensión diluida resultante se agitó durante 55 min. El lote se transfirió en porciones a un reactor de 72 l montado en una manta calefactora equipada para destilación al vacío. La destilación a 35 ± 5 °C comenzó y continuó hasta que se alcanzó un volumen de lote de 62 l (12,4 vol) (La destilación se llevó a cabo durante un periodo de dos días, e incluyó 15 horas de envejecimiento a ≤30 °C una vez que se completó). El lote se transfirió a un reactor de 72 l montado en un baño de enfriamiento. El lote se enfrió durante un periodo de 4½ h hasta que la temperatura alcanzó ≤5 °C y se agitó durante 1 h más. Los sólidos se filtraron usando un papel de filtro Sharkskin y la torta se enjuagó con agua/acetona 2:1 enfiada (7,5 l, 1,5 vol) (el tiempo de filtración total fue aproximadamente de 1 hora 40 minutos e incluyó arrastrar N<sub>2</sub> a través de la torta a fin de ayudar a secarla). Los sólidos húmedos (5,99 kg) se transfirieron a seis bandejas de secado de vidrio y se secaron al vacío en un homo a 40 ± 5 °C. Tras secar durante 47 h, el lote se envasó en LDPE de 4 milésimas (bolsas dobles) con N<sub>2</sub> y se almacenó en un tambor de fibra. Esto dio como resultado el acetónido de 6-cloropurina-9-ribósido (4505 g, 79%).

#### *Fabricación del acetónido de IB-MECA con cGMP*

En un reactor de 72 l soportado en un baño de enfriamiento, se introdujo CH<sub>3</sub>CN (37 l, 14,8 vol). La agitación comenzó a temperatura ambiente. A este se añadió el acetónido de 6-cloropurina (2234 g y 266 g, total = 2500 g = 1,0 peso = 1,0 vol, 7,65 mol), cloruro de rutenio (III) hidratado (25 g, 0,121 mol, 0,016 equiv, 0,010% en peso), agua (10 l, 4,0 vol), y TBAI (25 g, 0,068 mol, 0,009 equiv, 0,010 peso). La mezcla resultante se enfrió a 5°C durante 1 h empleando un baño de enfriamiento de agua con hielo, y NaIO<sub>4</sub> (3750 g, 17,5 mol, 2,3 equiv, 1,5 peso) se añadió durante 2 min manteniendo a la vez la temperatura interna del lote <10 °C. El baño del hielo/disolvente se vació después de 50 min y el lote se dejó calentar a temperatura ambiente (La temperatura del lote alcanzó un máximo de 33°C durante un periodo de dos horas. Se aplicó un baño de agua fría para evitar que la temperatura del lote superara esta temperatura). La suspensión espesa de color marrón naranja resultante se agitó a 15-30 °C durante 21 h. El análisis mediante TLC (IPAc, detección UV) mostró la desaparición del acetónido de 6-cloropurina-9-ribósido. La suspensión de color amarillo (21°C) se filtró durante un periodo de 30 min hasta que cesó el goteo; se empleó CH<sub>3</sub>CN (15 l, 6,0 vol) como enjuague del reactor y la torta. El filtrado se concentró en tres porciones en el evaporador rotatorio con el baño de agua ajustado a 40±5°C durante un periodo de 11 h.

En un reactor de 72 l se introdujeron el residuo resultante (7,7 kg) y agua purificada (22,5 l, 9 vol). Se comenzó la agitación a temperatura ambiente. Después de 1 h, se filtró el lote (23°C), y el reactor y la torta se enjuagaron con agua purificada (7,5 l, 3 vol). La torta húmeda (4,7 kg) se transfirió a seis bandejas de secado y se secó en un homo al vacío ajustado a 40°C durante seis días. El IPC KF (especificación ajustada a <0,6%) y la RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) mostraron un material aceptable. Esto dio como resultado el ácido de 6-cloropurina (2145 g, 82%) que se almacenó bajo N<sub>2</sub> en jarras de vidrio color ámbar con tapas revestidas de teflón.

#### *Procedimiento típico para la fabricación del acetónido de IB-MECA bruto*

En un reactor de 72 l, se introdujo ácido de 6-cloropurina [2600 g, 7,63 mol, 1,0 peso =1,0 vol] utilizando CH<sub>3</sub>CN (31,7 l, 12,2 vol) para efectuar la transferencia, y comenzó la agitación. Se añadió cloruro de tionilo (889 ml, 12,2 mol, 1,60 equiv, 0,342 vol) a la suspensión gris espesa y la mezcla se agitó a <30°C durante 4h. Aproximadamente 0,5 ml de la solución oscura resultante se añadieron a MeOH (2 ml, calidad HPLC, Fisher), y el análisis mediante TLC (detección UV, IPAc/MeOH, 10:1) mostró la desaparición del material de partida. Durante un periodo de 6,5 h, la solución del lote se concentró al vacío en un evaporador rotatorio hasta que cesó la destilación (el baño de agua se ajustó inicialmente a 25 ± 5 °C y aumentó gradualmente a 35 ± 5 °C para esto); Se utilizó CH<sub>3</sub>CN (825 ml, 0,32 vol) para enjuagar el reactor. La fuente de calor del baño de agua se apagó y se añadió CH<sub>3</sub>CN (7.6 l, 2,9 vol) al residuo del bulbo. Sin vacío, el bulbo se hizo girar hasta que el lote se convirtió en completamente móvil y a continuación se transfirió a un reactor de 72 l situado en una bañera de acero. Se comenzó la agitación y se añadió más CH<sub>3</sub>CN (25,5 l, 9,8 vol). El lote se enfrió utilizando un baño de disolvente/agua helada hasta que la temperatura interna del

lote fue  $<2^{\circ}\text{C}$  (esto tardó 1 h); a continuación se añadió metilamina 2 M en THF (4004 ml, 8,01 mol, 1,05 equiv, 1,54 vol) mediante un embudo de adición de 5 l durante un periodo de 52 min manteniendo a la vez la temperatura interna del lote  $<7^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se añadió DIPEA (1976 ml, 11,3 mol, 1,5 equiv, 0,76 vol) mediante un embudo de adición de 5 l durante 1 h; la agitación se continuó a  $<7^{\circ}\text{C}$  durante un mínimo de 1 h, el baño de enfriamiento se drenó, y la agitación continuó durante 11 h a la vez que se dejó calentar el lote a temperatura ambiente (el pH del lote era 9). Normalmente, la temperatura mínima del lote para estas operaciones era  $0^{\circ}\text{C}$ . El análisis mediante TLC (detección UV, IPAc/MeOH, 10:1) mostró la desaparición del ácido de 6-cloropurina/cloruro de acilo y la formación de un producto principal con mayor rendimiento. El lote se transfirió a otro reactor de 72 l instalado en una manta calefactora, equipado con un condensador enfriado con agua; se utilizó  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1,3 l, 0,5 vol) para ayudar en la transferencia. Se comenzó la agitación y se añadió dordrato de 3-yodobencilamina (2777 g, 10,30 mol, 1,35 equiv, 1,068% en peso). Posteriormente, se añadió DIPEA (6656 ml, 38 mol, 5,0 equiv, 2,56 vol) y se calentó la mezcla a  $70 \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 25 h. El análisis mediante HPLC mostró el 0,70% de la 6-cloropurina amida restante en conversión, cumpliendo exactamente de esta manera el  $\leq 0,70\%$  de la especificación. Se apagó la fuente de calor y el lote se dejó enfriar durante la noche. Durante un periodo de 8 h, el lote se concentró al vacío en el evaporador rotatorio a  $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$  hasta que cesó la destilación; Se utilizó  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1650 ml, 0,63 vol) para enjuagar el reactor. Con la ayuda de IPAc (5.36 l, 2,1 vol), el residuo se transfirió a un reactor de 72 l. Se añadió más IPAc (20,4 l, 7,85 vol) al reactor y se inició la agitación. A esto se añadió una disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (22,2 l, 8,5 vol). Después de 30 min de agitación, el sistema bifásico se dejó sedimentar durante 10 min y se recogió la fase acuosa inferior (se añadió agua adicional (5 l) para disolver una cantidad poco importante de sólidos restantes en la mezcla bifásica). La fase orgánica restante se lavó con agua (12,7 l, 4,9 vol) con un tiempo de agitación de 25 min y un tiempo de sedimentación de 38 min. La fase orgánica combinada se concentró al vacío en el evaporador rotatorio a  $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$  hasta que cesó la destilación (durante un periodo de 6 h). Se enjuagó la garrafa con IPAc (825 ml, 0,32 vol). Por etapas, el residuo resultante se suspendió en el bulbo del evaporador rotatorio con MeOH (12,7 l, 4,9 vol) y se concentró hasta que cesó la destilación (4,5 h). Esto dio como resultado el acetónido de IB-MECA bruto (7,2 kg) como un sólido de color beige húmedo que se almacenó para procesamiento adicional y combinación de lotes. El análisis mediante HPLC mostró el acetónido de IB-MECA con un área de pureza del 91,3%.

#### *Purificación del acetónido de IB-MECA bruto*

El acetónido de IB-MECA humedecido con MeOH bruto (15 kg, área del 91%) se recrystalizó en MeOH (34 l) a  $60-65^{\circ}\text{C}$ . La torta del filtro resultante se enjuagó con MeOH enfriado (15,3 l) y se transfirió a ocho bandejas de secado (peso del lote 10 kg). El análisis mediante HPLC mostró el acetónido de IB-MECA con un área de pureza del 65% presente en el filtrado. Se estimó a partir de la altura del pico que 1 kg de este material desapareció en esta operación. El lote se secó en un horno al vacío ajustado a  $40^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 22 h (7945 g). El análisis mediante HPLC mostró un área de pureza del producto deseado del 99,0% contaminado con dos impurezas significativas a RRT 0,64 (área del 0,32%) y RRT 1,30 (área del 0,58%). Los espectros de masas de estos picos son:

35 RRT= 0,64  
PM= 424,19  
m/e: 424,19 (100%), 425,19 (23,9%), 426,19 (4,0%), 425,18 (2,2%)  
C, 59,42; H, 5,70; N, 19,80; O, 15,08.

40 RRT 1,30  
PM=752,34 g/mol  
m/e: 752,01 (100,0%), 753,01 (32,4%), 754,02 (4,5%), 754,01 (1,5%)  
C, 43,10; H, 3,48; I, 33,74; N 11,17; O 8,51

45 Este material se recrystalizó de nuevo en MeOH (23,8 l) a  $60-65^{\circ}\text{C}$ . La torta del filtro resultante se enjuagó con MeOH enfriado (2 x 8 l). El tiempo total de filtración fue de 85 minutos. La torta se almaceno bajo una corriente de  $\text{N}_2$ . El análisis de la torta mediante HPLC mostró un área de pureza del producto deseado del 99,77%, contaminado con dos impurezas significativas a RRT 0,64 (área del 0,07%) y RRT 1,30 (área del 0,16%). El lote se transfirió a seis bandejas de secado (peso del lote 7,4 kg) en lugar de realizar la tercera recrystalización opcional. El lote se secó en un horno al vacío ajustado a  $40^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 60 h. Esto dio como resultado el acetónido de IB-MECA (7097 g) como un sólido de color blanco tras envasarse en cuatro jarras de vidrio color ámbar; el almacenamiento fue a temperatura ambiente.

#### *Fabricación de IB-MECA con cGMP*

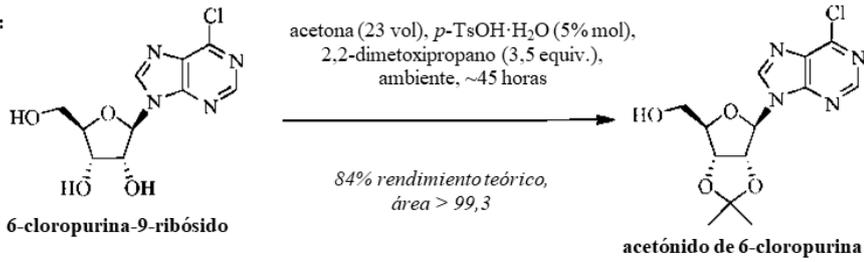
55 En un reactor de 72 l se introdujeron THF (18,1 l, 5,1 vol), acetónido de IB-MECA (3,55 kg, 6,45 mol, 1,0 peso/1,0 vol), y solución acuosa de HCl 1 N (17,8 l, 17,8 mol, 2,76 equiv, 5,0 vol). La suspensión en agitación de color verde pálido resultante se calentó a  $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 8 h, en cuyo momento, el análisis por HPLC mostró un 1,16% del acetónido de IB-MECA restante (cumpliendo de esta manera la especificación  $\leq 1,5\%$ ). El lote se dejó enfriar a aproximadamente  $40^{\circ}\text{C}$  y a continuación se filtró a través de un filtro en línea mediante una bomba de transferencia. Se vació el reactor y se enjuagó la línea de transferencia con THF (600 ml, 0,17 vol). El filtrado resultante se almacenó en la sala fría ( $2-8^{\circ}\text{C}$ ) durante la noche. A un reactor de 200 l se añadió una solución saturada acuosa de  $\text{NaHCO}_3$  enfriada (53,6 l, 15 vol,  $16^{\circ}\text{C}$ ) a través de un filtro en línea y comenzó la agitación. El filtrado rico en IB-MECA ( $15^{\circ}\text{C}$ ) se añadió durante 30 min. al reactor de 200 l mediante una bomba de transferencia equipada con un filtro en línea. El precipitado de color blanco resultante se agitó durante la noche para envejecer

(hubo una pequeña fluctuación de temperatura durante la precipitación, que se produjo a  $20 \pm 2$  °C, no se aplicó enfriamiento, y se produjo una espumación poco importante. El pH de la suspensión era pH 7,5). El lote se filtró utilizando un paño filtrante de nylon; se vació el reactor y la torta se enjuagó con agua (5 x 3,4 l, 4,8 vol). La torta se combinó bajo un caudal de N<sub>2</sub> (el tiempo total de filtración fue de 5,5 h), se envasó para procesamiento adicional, y se almacenó en la sala fría. Se mostró que este lote (9,2 kg de peso en húmedo) tenía un área de pureza del 99,5% sin impurezas individuales con un área >0,20%, según el HPLC.

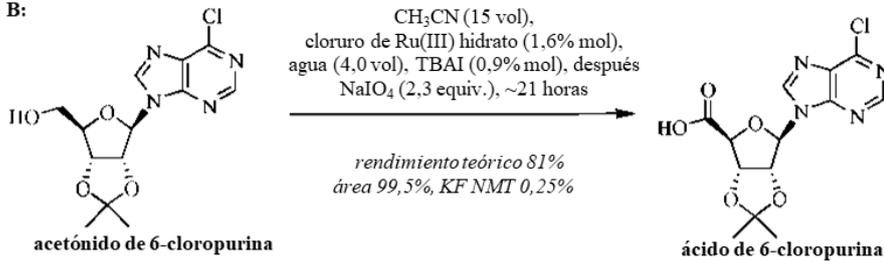
#### **Ejemplo 4: Procesos de producción comparativos a escala kilo de IB-MECA con CGMP**

- El *Esquema 1* representa los procedimientos empleados para una preparación a escala kilo de IB-MECA de acuerdo con la presente divulgación y como se define en las reivindicaciones adjuntas (se muestran los rendimientos típicos y las purezas de HPLC). Las etapas de producción representadas en el Esquema 1 son similares a los procesos de producción para la preparación de IB-MECA detallados en el Ejemplo 1 anterior. Un único lote de producción de IB-MECA utilizando este proceso tenía como máximo 6 kg (pureza del 99,5% de área según HPLC, sin impurezas individuales >0,18%). La producción con cGMP comenzó con la 6-cloropurina-9-ribósido comercialmente disponible (10 kg) y dio como resultado IB-MECA (6 kg, 34% de rendimiento teórico global (60 % en peso)).
- El *Esquema 2* representa una variación en el proceso de producción de IB-MECA (se muestran también los rendimientos típicos y las purezas de HPLC). La diferencia reside en las elaboraciones, el orden de las reacciones, los equivalentes de reactivos cargados, los disolventes empleados, y los rendimientos consiguientes. Los procedimientos del Esquema 2 emplearon tanto la cromatografía en columna de gel de sílice como la purificación Biotage en fase inversa. El proceso del Esquema 2 se llevó a cabo a escalas de 350 g y 2 kg y dio como resultado IB-MECA (32 g, 9 % en peso) y (414 g, 21 % en peso), respectivamente.

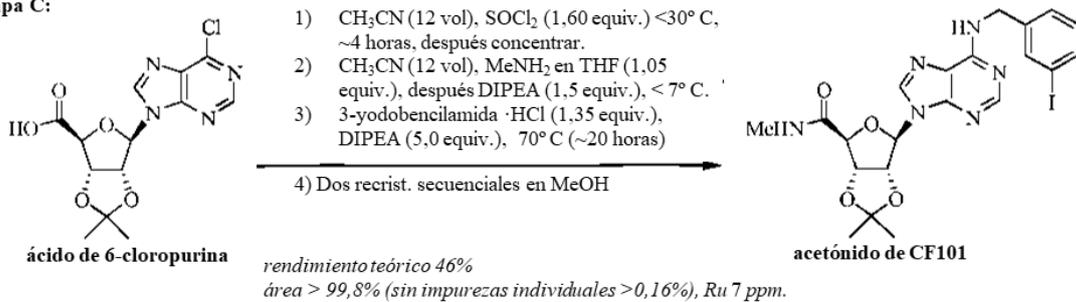
**Etapa A:**



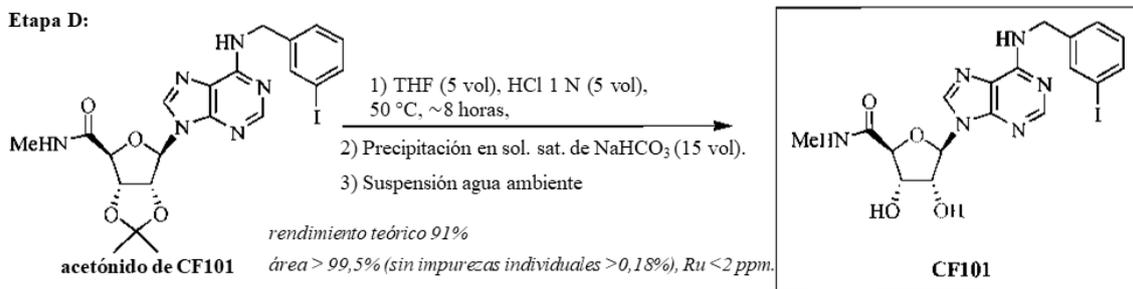
**Etapa B:**



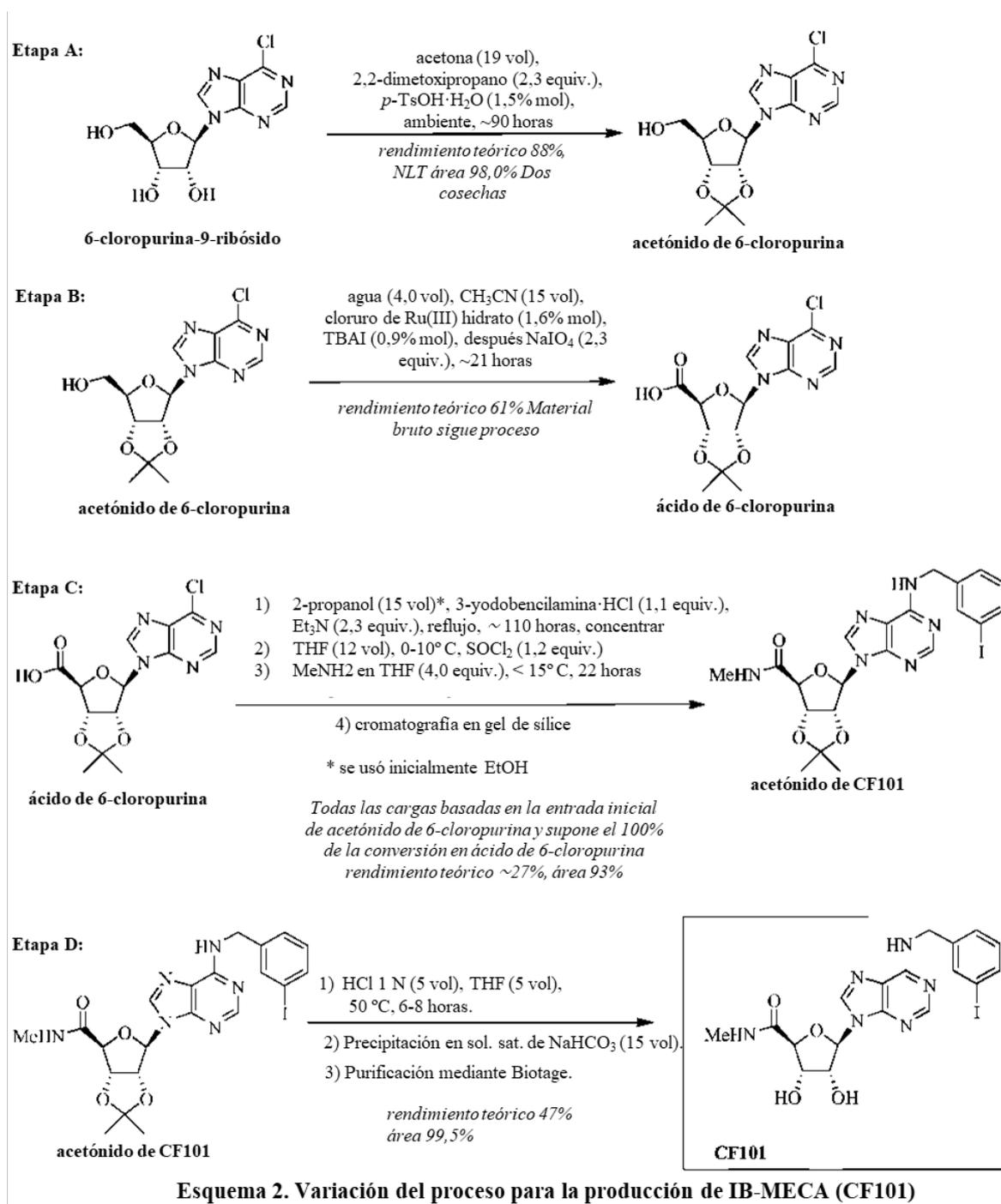
**Etapa C:**



**Etapa D:**



**Esquema I. Proceso para la producción de IB-MECA (CF101)**



Se indican numerosas diferencias claves entre las etapas de proceso del Esquema 1 y las etapas de procesos del Esquema 2 empleadas para la producción de IB-MECA con cGMP, como se establece a continuación:

**Etapa A Preparación del acetónido de 6-cloropurina:**

- 5 En el proceso de acuerdo con el Esquema 2, se aumentaron las cantidades añadidas de *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O y 2,2-dimetoxipropano para aumentar la velocidad de reacción sin afectar de forma adversa el rendimiento y la calidad. Esto acortó el costoso tiempo de residencia en el recipiente a la mitad de la escala, el procedimiento inicial fue inconsistente y condujo a una reacción incompleta. Para impulsar la reacción hasta la finalización tuvieron que añadirse reactivos adicionales en porciones durante un periodo de hasta tres semanas, y dio como resultado un significativo aumento en el volumen global de reacción. Estas cargas se optimizaron también de manera que los posibles productos secundarios se mantuvieron en un mínimo.
- 10

El proceso de acuerdo con el Esquema 1, que es también el sujeto de las reivindicaciones adjuntas, dio como resultado un material de alta calidad en *una sola cosecha* con un rendimiento similar al alcanzado para el proceso

del Esquema 2.

*Etapa B Preparación del ácido de 6-cloropurina:*

5 De acuerdo con el proceso detallado en el Esquema 1, las adiciones posteriores de reactivo y disolvente para producir el acetónido de IB-MECA se basaron en el peso aislado del ácido. Sin embargo, de acuerdo con el proceso del Esquema 2, la adición de reactivos y disolventes se realizó con respecto al peso del precursor intermedio aislado (acetónido de 6-doropurina). De este modo, una suspensión, una elaboración de IPAc/H<sub>2</sub>O extractiva, y una operación de secado de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se eliminaron del proceso del Esquema 1.

10 El ácido del Esquema 1 se aisló del agua en una forma fácil de manipular, que puede ser secado en un horno para cumplir una especificación del contenido de agua residual (la formación posterior de doruro de acilo es sensible al agua). Se determinó que el límite superior tolerable para el agua residual en el ácido era <0,6% en peso. Esto se cumplió de forma consistente mediante un mero secado en horno al vacío, sin sacrificar la calidad. La recuperación se potenció aumentando los volúmenes de lavado de la torta del filtro, y eliminando el procesamiento redundante anteriormente mencionado.

*Etapa C Preparación del acetónido de IB-MECA:*

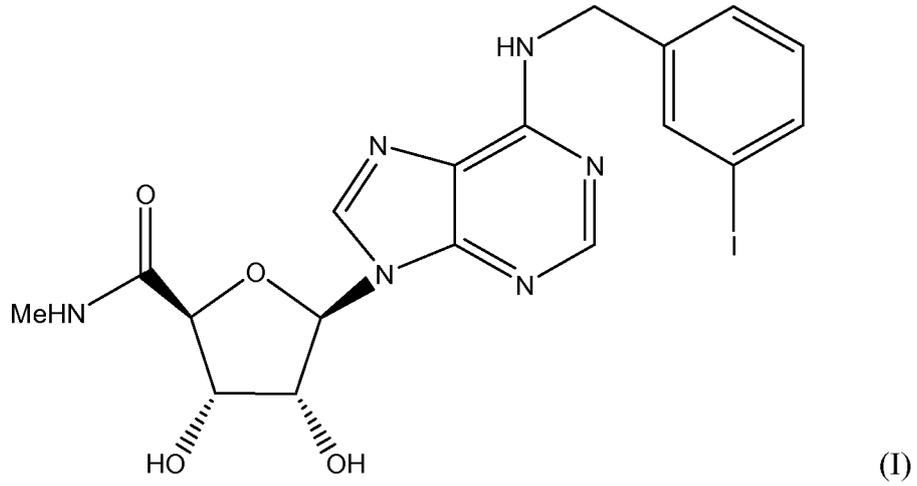
15 Existe una significativa diferencia en el orden de las tres transformaciones sintéticas (reacción con 3-yodobencilamina, a continuación formación de cloruro de acilo, y finalmente, formación de amida con MeNH<sub>2</sub>) entre los dos Esquemas. Las adiciones de los reactivos 01828011\44-01 se optimizaron con respecto a la entrada de ácido de 6-doropurina (véase la etapa B anterior). Se utilizó un único disolvente de reacción (CH<sub>3</sub>CN) en el Esquema 1, para estas reacciones. Este eliminó la formación de la impureza de éster encontrada cuando se  
20 emplean los procesos del Esquema 2 (no se muestran). Adicionalmente, de acuerdo con la secuencia de procesos de esta etapa en el Esquema 1, se empleó el material más costoso (3-yodobencilamina) en la última etapa de la síntesis. La necesidad de purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice en el proceso del Esquema 2, se sustituyó por recristalizaciones en MeOH (Esquema 1). En este momento se identificaron algunas otras impurezas potenciales del proceso (no se muestran).

25 *Etapa D Preparación de IB-MECA:*

La purificación mediante Biotage empleada en el proceso del Esquema 2 no requirió demasiado tiempo, ya que la pureza del precursor del acetónido de IB-MECA mejoró en el Esquema 1, mediante recristalizaciones en MeOH. Se determinó que se producía una descomposición térmica durante la desprotección del acetónido (condiciones ácidas)  
30 en ambos Esquemas, de esta forma, el tiempo de reacción se limitó a 8 horas (sin afectar adversamente el rendimiento).

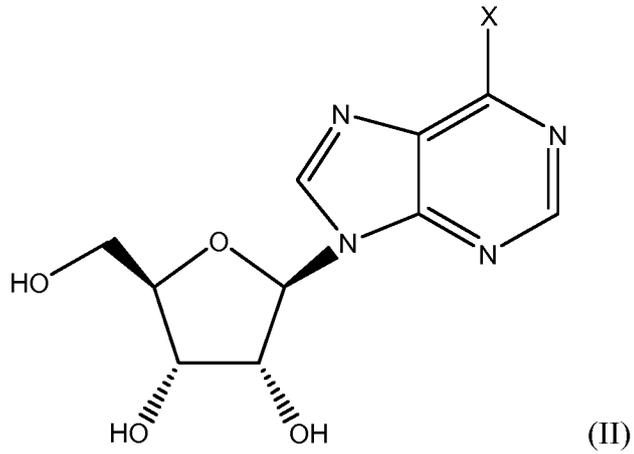
REVINDICACIONES

1. Un procedimiento de síntesis química de IB-MECA, que tiene la siguiente fórmula (I):

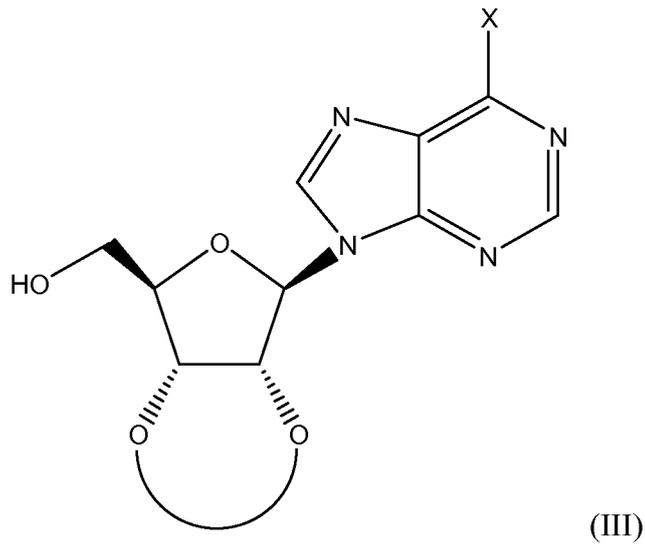


comprendiendo el procedimiento:

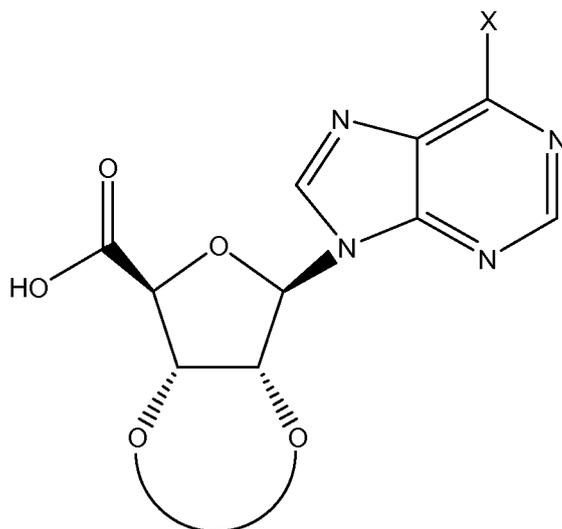
5 (i) hacer reaccionar 6-halopurina-9-ribósido de la siguiente fórmula (II):



en la que X es un halógeno seleccionado del grupo que consiste en Cl, I y Br; con un reactivo protector de diol para obtener una 6-halopurina protegida con diol de la siguiente fórmula (III):



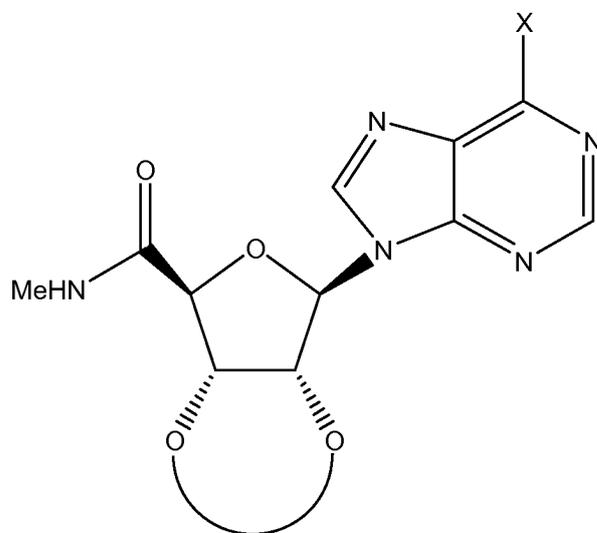
en la que dicho reactivo protector de diol comprende un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado;  
 (ii) oxidar el alcohol primario en dicha 6-halopurina protegida con diol de fórmula (III) mediante la adición de una cantidad catalítica de un agente oxidante que consiste en peryodato de sodio y tricloruro de rutenio (RuCl<sub>3</sub>) para obtener un respectivo derivado de ácido carboxílico de fórmula (IV):



(IV)

aislar dicho derivado mediante cristalización en agua-acetonitrilo;

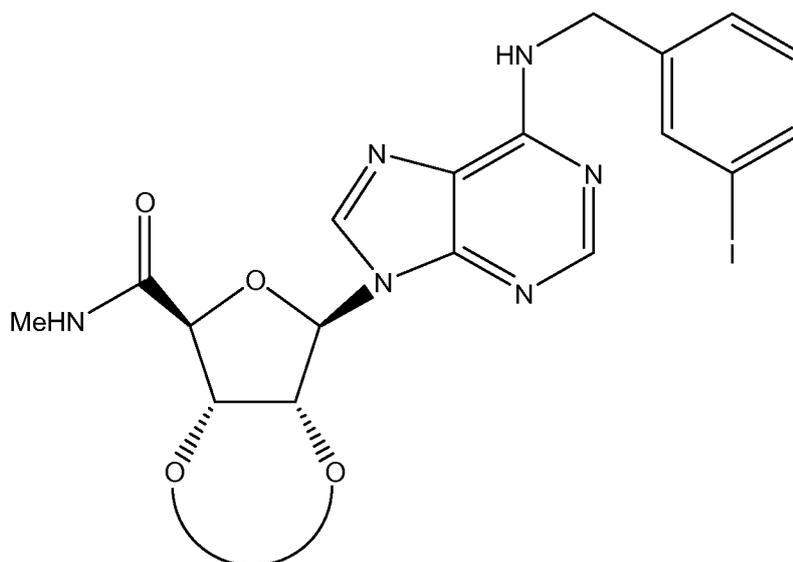
(iii) hacer reaccionar el grupo ácido carboxílico del derivado de fórmula (IV), con un agente halogenante SOCl<sub>2</sub> en acetonitrilo para obtener un cloruro de ácido seguido por reacción con metilamina en presencia de diisopropiletilamina (DIPEA) para obtener el respectivo derivado de metilamida de la 6-halopurina protegida con diol (III), teniendo el derivado de metilamida la fórmula (V):



(V)

sustituir el grupo halógeno del derivado de metilamida (V) con 3-yodobencilamina que tiene  $\leq 0,5\%$  de clorhidrato de 3 bromobencilamina, en presencia de DIPEA, la mezcla de reacción se calienta a 70°C.

(iv) formar un IB-MECA protegido con diol que tiene la fórmula (VI);



(VI)

y dejar que el IB-MECA protegido con diol de fórmula (VI) recrystalice en MeOH;

(v) retirar la protección de diol en presencia de ácido clorhídrico acuoso para obtener dicho IB-MECA de fórmula (I) a un nivel de pureza del 99,67% y un rendimiento del 90%.

- 5 2. El procedimiento de la Reivindicación 1, en el que dicho halógeno es cloruro.
3. El procedimiento de la Reivindicación 1 o 2, en el que dicho grupo protector es dialquiloalcano C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>.
4. El procedimiento de la Reivindicación 3, en el que dicho dialquiloalcano es 2,2-dimetoxipropano.
5. El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha protección de diol se consigue en presencia de un ácido fuerte y un disolvente orgánico polar.
- 10 6. El procedimiento de la Reivindicación 5, en el que dicho ácido fuerte se selecciona entre p-TsOH, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido fórmico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico.
7. El procedimiento de la Reivindicación 5, en el que dicho disolvente orgánico polar es un disolvente miscible en agua.
8. El procedimiento de la Reivindicación 7, en el que dicho disolvente orgánico polar es acetona.
- 15 9. El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha oxidación se realiza en presencia de una cantidad catalítica de una mezcla de RuCl<sub>3</sub> y peryodato de sodio.
10. El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho clorhidrato de 3-yodobencilamina se proporciona tras recrystalización en un disolvente prótico.
- 20 11. El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 10, en la que la retirada del grupo protector de diol se lleva a cabo en presencia de un ácido fuerte y un disolvente polar no prótico.
12. El procedimiento de la Reivindicación 11, en el que dicho ácido fuerte es HCl y dicho disolvente es tetrahidrofurano (THF).