

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 064**

51 Int. Cl.:

C12P 19/40 (2006.01)

C12P 17/18 (2006.01)

C07H 19/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2015 PCT/EP2015/058713**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15162175**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2015 E 15717892 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 3134537**

54 Título: **Método para la síntesis de clofarabina**

30 Prioridad:

23.04.2014 EP 14165627

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

21.11.2017

73 Titular/es:

**SYNBIAS PHARMA AG (100.0%)
Pestalozzistrasse 2
8200 Schaffhausen, CH**

72 Inventor/es:

**ZABUDKIN, ALEXANDER;
MATVIENKO, VICTOR;
MATVIIENKO, IAROSLAV y
SYPCHENKO, VOLODYMYR**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 643 064 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

Método para la síntesis de clofarabina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para la producción de clofarabina con alto rendimiento y sin formación de estereoisómeros α -N9 no deseados.

Antecedentes de la invención

La clofarabina (nombre sistemático IUPAC: 5-(6-amino-2-cloro-purin-9-il)-4-fluoro-2-(hidroxilmetil)oxolan-3-ol) es un antimetabolito de nucleótido de purina usado para el tratamiento de diversos tipos de leucemias, en particular leucemia linfoblástica aguda.

10 Actualmente se establecen en la técnica varios métodos para la producción de clofarabina. Las rutas de síntesis se basan por lo general en una reacción de acoplamiento entre los derivados de purina y un fragmento de arabinofuranosilo. Dependiendo del método de introducción del átomo de flúor, estos esquemas de síntesis se pueden dividir en dos grupos: (i) métodos en los que un átomo de flúor está incluido en un fragmento de ribofuranosa e introducido en la molécula en la etapa de acoplamiento; (ii) métodos en los que se introduce un átomo de flúor después de la etapa de acoplamiento mediante transformaciones químicas del nucleósido obtenido previamente.

15 La Patente de los Estados Unidos 5,034,518 describe el esquema de síntesis original para producir clofarabina desarrollado por Montgomery y colaboradores. La ruta de síntesis se ilustra en la figura 1. En resumen, un 1-bromo-2-fluoro-azúcar 1 se acopla con 2,6-dicloropurina 2, seguido por las etapas de aminación y desprotección. Esta etapa de acoplamiento da como resultado la formación de una mezcla de anómeros α y β del producto 3. Después de la separación cromatográfica, es posible aislar el anómero β deseado con un rendimiento de sólo 32%. Los inconvenientes principales de este método son, de hecho, el bajo rendimiento global del producto deseado (13% con respecto a 1), una baja estabilidad del bromuro de partida 1 y una purificación desafiante del producto de reacción de copulación 3 debido a la presencia de isómero α .

25 La Patente de los Estados Unidos 6,949,640 describe una modificación de la ruta de síntesis anterior que implica (i) el uso de sales formadas por tratamiento de 2-cloro-6-sustituída-purina con bases fuertes (tales como NaH) en lugar de las formas NH- de purinas, y (ii) el uso de bromuro de 2-desoxi-2-fluoro-3,5-di-O-benzoil- α -D-arabinofuranosilo 4 en lugar del derivado de O-acetilo 1 (esta ruta de síntesis se ilustra en la figura 2). Estas modificaciones permitieron aumentar el rendimiento total de clofarabina hasta aproximadamente 40% basado en el compuesto 4. Sin embargo, el esquema de síntesis se ve obstaculizado por la baja estabilidad del bromuro 4, que es difícil de producir, y la formación de una mezcla de anómeros en la etapa de acoplamiento, que requiere cromatografía en columna desafiante para la separación del producto deseado.

35 La modificación adicional del método de Montgomery y colaboradores de trabajo se describe en La Patente de los Estados Unidos 6,680,382 y se ilustra adicionalmente en la figura 3. Esta modificación implica el uso de la sal potásica de 2-cloroadenina 5 obtenida por tratamiento de 2-cloroadenina con t-BuOK en lugar de la sal sódica de 2,6-dicloropurina, el uso de una mezcla ternaria de solventes (por ejemplo, alcohol tert-amílico, CH₂Cl₂, CH₃CN) y adición de CaH₂ para la eliminación completa de agua de solventes. El uso de solventes de baja polaridad en la etapa de acoplamiento permitió conseguir un procedimiento estereoselectivo de la reacción (con una proporción de anómero β a α de hasta 15:1). Además, la presencia de un grupo amino en el material de partida 2-cloroadenina hizo posible evitar una etapa de aminación del producto de reacción de acoplamiento. Como resultado, el rendimiento total de clofarabina purificada a base de azúcar fluorado 4 es de aproximadamente 32%. Sin embargo, el azúcar fluorado 4 (obtenido en cuatro etapas a partir de 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosa) es difícil de producir y tiene una baja estabilidad, dos inconvenientes todavía existentes de este método.

45 El método descrito en la Publicación de la Patente de los Estados Unidos 2012/0010397 se refiere al segundo grupo de métodos de preparación de clofarabina anteriormente mencionado. Se ilustra en la figura 4. La 2',3',5'-Tri-O-benzoil-2-cloroadenosina 8 se obtiene en la primera etapa por acoplamiento de azúcar 6 y 2-cloroadenina protegida con TMS 7. La desbenzoilación adicional con hidrato de hidrazina da como resultado la formación de una mezcla de derivados 3',5'- y 2',5"-di-O-benzoilo. Después de la isomerización del derivado 2',5'-di-O-benzoilo en el derivado 3', 5' 9, el triflato 10 se obtiene por tratamiento del compuesto 9 con anhídrido trifílico. El triflato 10, después de su fluoración y desprotección, da como resultado el producto final clofarabina. Sin embargo, las desventajas de este método son el gran número de isómeros (que son difíciles de separar) formados en la etapa de acoplamiento entre 6 y 7 (isómeros β -N9, α -N7, β -N7), el uso de hidrato de hidrazina altamente tóxico, siendo el rendimiento global de clofarabina purificada solamente del 15%.

- 5 Fateev et al. (Fateev, I.V. et al. (2014) Beilstein J. Org. Chem. 10, 1657-1669) describen un procedimiento enzimático para producir clofarabina con alto rendimiento por condensación de 2-desoxi-2-fluoro- α -D-arabinofuranosa-1-fosfato con 2-cloroadenina, catalizada por purina nucleósido fosforilasa de *E. coli* recombinante. Además, Burns et al. (Burns, C.L. et al. (1993) J. Med. Chem. 36, 378-384) describe la síntesis enzimática de 6-alcoxi-2,3-didesoxinucleósidos usando fosforilas de *E. coli*.

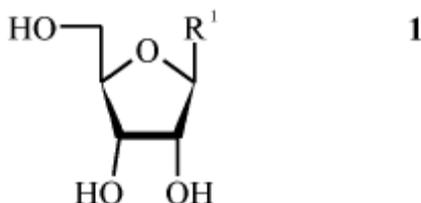
Por lo tanto, todavía existe una necesidad continua de métodos mejorados para la síntesis de clofarabina que superen las limitaciones de los esquemas de síntesis establecidos. En particular, existe la necesidad de un esquema de síntesis que da como resultado un alto rendimiento del producto y no implica la formación de estereoisómeros no deseados.

- 10 De acuerdo con lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar dicho método para la producción de clofarabina.

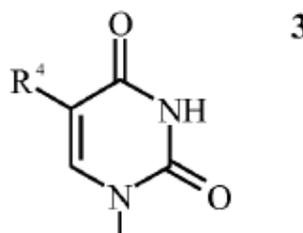
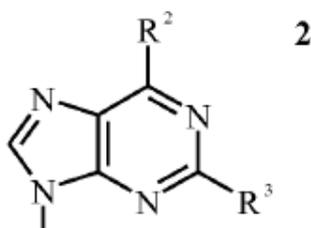
Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la producción de clofarabina, que comprende:

- 15 (a) preparar 2-cloroadenosina mediante transglicosilación enzimática entre 2-cloroadenina y un compuesto de fórmula 1,

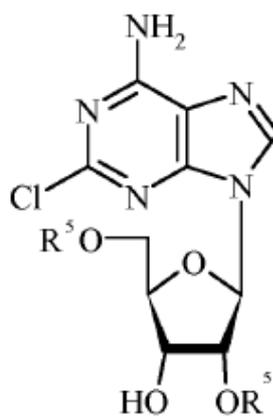
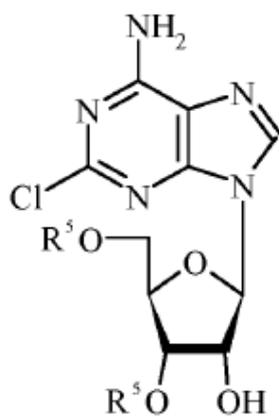


en la que R¹ es purina o base de pirimidina de fórmula 2 o fórmula 3, respectivamente,



- 20 en la que R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -NH₂, -OH y -CH₃; y R⁴ se selecciona del grupo que consiste en -H y -CH₃;

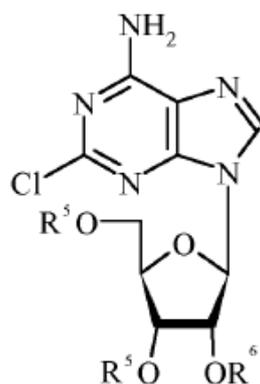
(b) proteger parcialmente los grupos hidroxilo de 2-cloroadenosina para obtener una mezcla de un compuesto de fórmula 4 y un compuesto de fórmula 5,



en la que R⁵ es independientemente un grupo protector de hidroxilo;

(c) isomerizar el compuesto de fórmula 4 en el compuesto de fórmula 5;

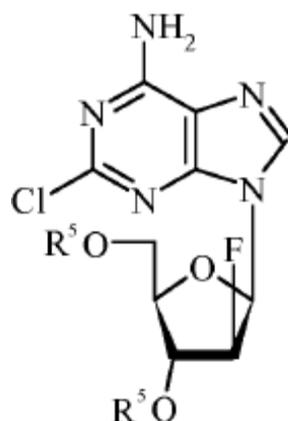
(d) preparar un compuesto de fórmula 6 a partir del compuesto de fórmula 5,



5

en la que OR⁶ es un grupo saliente;

(e) fluoración del compuesto de fórmula 6 a un compuesto de fórmula 7; y



(f) desproteger el compuesto de fórmula 7 para obtener la clofarabina.

En realizaciones preferidas, la transglicosilación en la etapa (a) se lleva a cabo usando purina nucleósido fosforilasa o una combinación de purina nucleósido fosforilasa y uridina fosforilasa.

5 En otras realizaciones preferidas, la fluoración en la etapa (e) se lleva a cabo usando un agente de fluoración. Preferiblemente, el agente de fluoración se selecciona del grupo que consiste en ácido fluorhídrico y una mezcla de ácido fluorhídrico y una base de Lewis orgánica. Particularmente preferible, la base de Lewis orgánica (usada mezclada con ácido fluorhídrico) es una amina.

En aún otras realizaciones preferidas, el sustituyente R¹ es una base de pirimidina que representa uridina; y/o el sustituyente R⁵ es un grupo protector de hidroxilo que representa benzoilo; y/o el sustituyente OR⁶ es un grupo saliente que representa trifluorometanosulfonato.

10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra el esquema de síntesis para la producción de clofarabina como se describe en la Patente de los Estados Unidos 5,034,518.

La figura 2 ilustra el esquema de síntesis para la producción de clofarabina como se describe en la Patente de los Estados Unidos 6,949,640.

15 La figura 3 ilustra el esquema de síntesis para la producción de clofarabina como se describe en la Patente de los Estados Unidos 6,680,382.

La figura 4 ilustra el esquema de síntesis para la producción de clofarabina como se describe en la publicación de patente US 2012/0010397.

La figura 5 ilustra el esquema de síntesis para la producción de clofarabina de acuerdo con la presente invención.

20 Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el hallazgo inesperado de que, a partir de 2-cloroadenosina, la realización de una cascada de reacción que comprende etapas de transglicosilación enzimática, benzoilación, isomerización, formación de ésteres de sulfonato (esto es, sulfonilación), fluoración y desprotección, da como resultado la producción de alto rendimiento de clofarabina sin la formación concomitante de estereoisómeros no deseados, evitando así desventajas mayores de los métodos establecidos y proporcionando un esquema de síntesis más eficiente y menos laborioso.

25 La presente invención se describirá a continuación con respecto a realizaciones particulares y con referencia a ciertos dibujos, pero la invención debe ser entendida como no limitada a la misma, sino sólo por las reivindicaciones adjuntas. Los dibujos descritos son sólo esquemáticos y representativos y se deben considerar no limitativos.

30 Cuando se utiliza el término "que comprende" en la presente descripción y en las reivindicaciones, no excluye otros elementos o etapas. Para los propósitos de la presente invención, se considera que el término "que consiste en" es una realización preferida del término "que comprende". Si en lo que sigue se define un grupo como comprendiendo al menos un cierto número de realizaciones, también se debe entender que describe un grupo, que preferiblemente consiste únicamente en estas realizaciones.

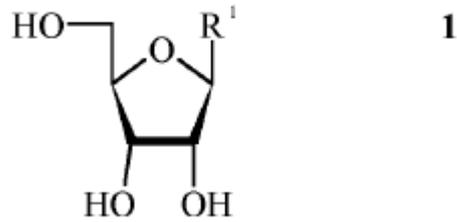
35 Cuando se usa un artículo indefinido o definido cuando se hace referencia a un sustantivo singular, por ejemplo, "un", "uno" o "el", esto incluye un plural de ese sustantivo, a menos que se especifique lo contrario.

En el caso de que se indiquen valores numéricos en el contexto de la presente invención, el experto entenderá que el efecto técnico de la característica en cuestión está asegurado dentro de un intervalo de precisión que por lo general abarca una desviación del valor numérico dado de $\pm 10\%$, y preferiblemente de $\pm 5\%$.

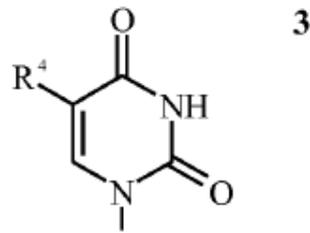
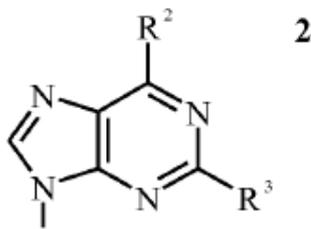
40 Además, los términos primero, segundo, tercero, (a), (b), (c), y similares en la descripción y en las reivindicaciones, se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir una secuencia u orden cronológico. Se debe entender que los términos así utilizados son intercambiables bajo circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en este documento son capaces de funcionar en otras secuencias que las descritas o ilustradas en la presente memoria.

45 Otras definiciones del término se darán a continuación en el contexto del cual se usan los términos. Los siguientes términos o definiciones se proporcionan únicamente para ayudar en la comprensión de la invención. Estas definiciones no deben interpretarse que tengan un alcance menor de lo que comprende un experto en el arte. La presente invención se refiere a un método para la producción de clofarabina, que comprende:

(a) preparar 2-cloroadenosina mediante transglucosilación enzimática entre 2-cloroadenina y un compuesto de fórmula 1,



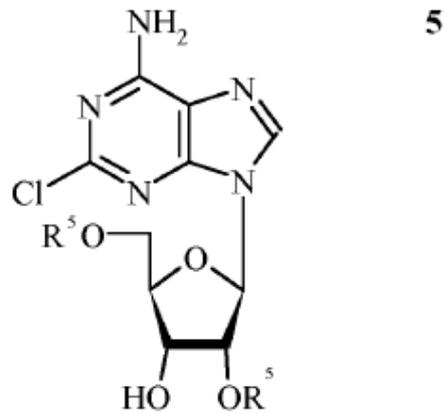
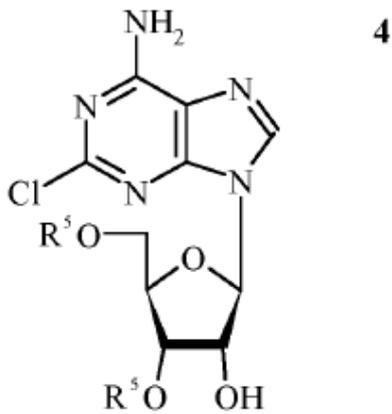
en la que R¹ es purina o base de pirimidina de fórmula 2 o fórmula 3, respectivamente,



5

en la que R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -NH₂, -OH y -CH₃; y R⁴ se selecciona del grupo que consiste en -H y -CH₃;

(b) proteger parcialmente los grupos hidroxilo de 2-cloroadenosina para obtener una mezcla de un compuesto de fórmula 4 y un compuesto de fórmula 5,

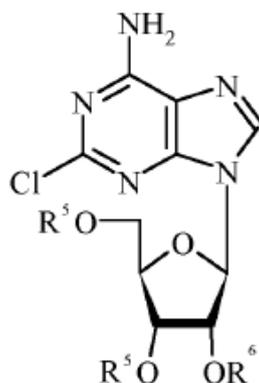


10

en la que R⁵ es independientemente un grupo protector de hidroxilo;

(c) isomerizar el compuesto de fórmula 4 en el compuesto de fórmula 5;

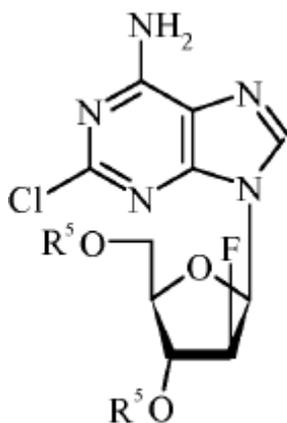
(d) preparar un compuesto de fórmula 6 a partir del compuesto de fórmula 5,



6

en la que OR⁶ es un grupo saliente;

(e) fluoración del compuesto de fórmula 6 a un compuesto de fórmula 7; y



7

5 (f) desproteger el compuesto de fórmula 7 para obtener la clofarabina.

El método según la presente invención se resume esquemáticamente en la figura 5. A continuación, la numeración de los compuestos corresponde a la nomenclatura utilizada en la figura 5. La 2-cloroadenosina (III) se obtiene mediante una reacción de transglicosilación enzimática entre la 2-cloroadenina (II) y cualquier nucleósido que contenga ribosa, preferiblemente uridina (I) (ya que es fácilmente soluble y fácilmente accesible) usando enzimas tales como preferiblemente purina nucleósido fosforilasa (PNP) y uridina fosforilasa (UP). Esta reacción es reversible. Para desplazar el equilibrio hacia el producto (III), se usa un exceso de uridina de 1.5 a 5 equivalentes, preferiblemente 3.3. La reacción se puede llevar a cabo a una temperatura de 40 a 70°C, preferiblemente a una temperatura de 58 a 61°C.

Debido a la estereoespecificidad de la transglicosilación enzimática, el único producto de la glicosilación es el anómero β (III). La 2-cloroadenosina se puede purificar a partir de los reactivos de partida (I), (II) y uracilo (subproducto), por ejemplo, usando cromatografía preparativa a baja presión. Por lo general, se eligieron las condiciones que permitían retener 2-cloroadenosina por el sorbente, mientras que la gran mayoría de impurezas no se retenían en la columna. Esto permitió simplificar el procedimiento de purificación, comprendiendo sólo etapas de "aplicación" y "lavado".

La 2-cloroadenosina obtenida es preferiblemente benzoilada con cloruro de benzoilo en presencia de piridina. En esta reacción, el cloruro de benzoilo se puede emplear en una cantidad que varía desde 1.8 a 2.5 equivalentes, preferiblemente 2.3 equivalentes, en base al compuesto de triol de fórmula (III). La reacción se puede llevar a cabo a una temperatura de -10 a 20°C, preferiblemente a una temperatura de 0 a 5°C.

Como subproducto, se puede formar hasta un 35% de 2',3',5'-tri-O-benzoil-2-cloroadenosina (IV). Sin embargo, la presencia de este subproducto no interfiere con la posterior etapa de isomerización y tampoco se puede separar

fácilmente durante la cristalización del derivado 3',5'-di-O-benzoilo. De este modo, casi la cantidad total del compuesto de partida 2-cloroadenosina finalmente da como resultado la formación del derivado 3',5'-di-O-benzoilo.

- 5 Posteriormente, se lleva a cabo una isomerización del isómero 2',5'-di-O-benzoilo (V) al isómero 3',5'-di-O-benzoilo (VI). La migración del grupo benzoílo preferido de la posición 2' a la posición 3' en los nucleósidos establecidos en la técnica (véase, entre otros, Maruyama, T. et al. (1999) Chem. Pharm. Bull. 47, 966-970). Preferiblemente, la reacción de isomerización se lleva a cabo por ebullición en metanol durante 40-45 horas con agitación vigorosa. Los cristales resultantes obtenidos después de una filtración en caliente de la mezcla de reacción tienen una pureza > 98% (HPLC), mientras que casi todas las impurezas permanecen en el licor madre, a partir de las cuales se puede aislar la 2-cloroadenosina después de la repetición del procedimiento.
- 10 La sulfonilación posterior del compuesto de fórmula VI se realiza por tratamiento con Tf₂O usando piridina como una base. En esta reacción, el anhídrido trifílico se puede emplear en una cantidad que varía desde 1.3 a 2.0 equivalentes, preferiblemente 1.6 equivalentes, con respecto al compuesto de fórmula (VI). El solvente puede ser un solvente orgánico, tal como acetonitrilo, tetrahidrofurano, diclorometano, cloroformo, preferiblemente diclorometano. La reacción se puede llevar a cabo a una temperatura de -20 a 30°C, preferiblemente a una temperatura de -10 a 0°C.

- 15 En la etapa siguiente, el fluoroderivado (VIII) se puede obtener por tratamiento del triflato (VII) con agentes de fluoración, tales como NEt₃*3HF, TBAF o TBAF*(*t*-BuOH)₄, preferiblemente NEt₃*3HF, por ejemplo, usando diisopropiletilamina como base. El solvente puede ser, por ejemplo, acetato de etilo, tetraclorometano, tolueno, acetonitrilo, preferiblemente tolueno. La reacción se puede llevar a cabo a una temperatura de 0 a 100°C, preferiblemente a una temperatura de 35 a 40°C. La clofarabina protegida obtenida se puede cristalizar a partir de una mezcla de acetato de etilo y metanol. Bajo las condiciones anteriores, el rendimiento del producto de reacción después de la cristalización es de aproximadamente el 60%.

- 20 Finalmente, la clofarabina protegida se desprotege bajo condiciones suaves. Estas condiciones suaves (30 min a 30°C) permiten llevar a cabo la reacción sin reacciones secundarias. El benzoato de metilo formado se separa por extracción con cloruro de metileno, y la clofarabina, contenida en la fase acuosa, se purifica usando cromatografía preparativa a baja presión seguida de cristalización. La clofarabina obtenida tiene una alta pureza sin cantidades detectables de impurezas. El rendimiento global de clofarabina es de aproximadamente 30-40%.

- 25 La invención se describe adicionalmente mediante las figuras y los siguientes ejemplos, que son únicamente con el propósito de ilustrar realizaciones específicas de esta invención, y no deben interpretarse como limitantes del tema reivindicado de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1a: Preparación de 2-cloroadenosina (III) a partir de 2-cloroadenina y uridina

- 35 Se disolvieron 400 g de uridina y 150 g de KH₂PO₄ con agitación en una mezcla de agua (52 l) y DMSO (1.8 l) a 58-61°C. A la solución resultante se le adicionó una primera porción (0.75 l) de una solución preparada a partir de 2-cloroadenina (85 g), agua (7 l) y KOH (120 g). El pH de la mezcla resultante se ajustó a 7.1-7.2 con solución acuosa de KOH. Se adicionaron soluciones de uridina fosforilasa y purina nucleósido fosforilasa con agitación a 58-61°C. La segunda porción restante de la solución de 2-cloroadenina se adicionó sucesivamente con agitación durante un período de 3 horas a la mezcla de reacción a 58-61°C manteniendo el pH en el intervalo de 7.1-7.2 con solución acuosa de HCl. Después, la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 58-61°C, y se adicionó NaOH para ajustar el pH 11.

La solución resultante que contiene 2-cloroadenosina se purificó por medio de cromatografía preparativa, seguido por aislamiento del producto que implicaba cristalización en agua, produciendo 120 g del compuesto base. La pureza típica de 2-cloroadenosina fue > 99%, y el rendimiento sobre la base de 2-cloroadenina fue > 85%.

Ejemplo 1b: Preparación de 2-cloroadenosina (III) a partir de 2-cloroadenina y guanósina

- 45 Se disolvieron 229 g de guanósina y 75 g de KH₂PO₄ con agitación en una mezcla de agua (52 l) y DMSO (1.8 l) a 58-61°C. A la solución resultante, se le adicionó una primera porción (0.75 l) de una solución preparada a partir de 2-cloroadenina (42 g), agua (7 l) y KOH (60 g). El pH de la mezcla resultante se ajustó a 7.1-7.2 con solución acuosa de KOH. Se adicionó una solución de purina nucleósido fosforilasa con agitación a la mezcla de reacción a 58-61°C. La segunda porción restante de la solución de 2-cloroadenina se adicionó sucesivamente con agitación durante un período de 3 horas a la mezcla de reacción a 58-61°C manteniendo el pH en el intervalo de 7.1-7.2 con solución acuosa de HCl. Después, la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 58-61°C, y se adicionó NaOH para ajustar el pH 11.

La solución resultante que contiene 2-cloroadenosina se purificó mediante cromatografía en columna de fase reversa de baja presión, seguido por aislamiento del producto que implicaba cristalización en agua, produciendo 53 g del compuesto base. La pureza típica de 2-cloroadenosina fue > 99%, y el rendimiento sobre la base de 2-cloroadenosina fue > 70%.

5 Ejemplo 2: Benzoilación de 2-cloroadenosina

Se enfrió una solución de 2-cloroadenosina (750 g) en piridina (7.5 l) a -5-0°C. Después, se adicionó lentamente a la mezcla de reacción una solución de cloruro de benzoilo (720 g) en acetonitrilo (1440 ml) con agitación y enfriamiento. Por consiguiente, la temperatura interna de la mezcla de reacción no debe ser superior a 5°C. La mezcla se incubó durante 30 min en las mismas condiciones. A continuación, los solventes se evaporaron a presión reducida a una temperatura de 60°C. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ y se lavó sucesivamente con solución acuosa de H₂SO₄ 1 M, solución acuosa saturada de NaHCO₃, y agua. La fase orgánica se evaporó a presión reducida para obtener una mezcla de 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina y 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (ambos juntos aproximadamente 65% en total por HPLC), así como 2',3',5'-tri-O-benzoil-2-cloroadenosina (aproximadamente 30% por HPLC).

15 Ejemplo 3: Isomerización de 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (V) a 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (VI).

La mezcla de 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina y 2',3',5'-tri-O-benzoil-2-cloroadenosina como se prepara en el ejemplo 2 a 25 l de MeOH. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 40-45 horas con agitación vigorosa. Después, la mezcla se filtró en caliente a vacío y la torta de filtración se lavó con MeOH. El filtrado que contiene 2',3',5'-tri-O-benzoil-2-cloroadenosina y 2-cloro-9-(2',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina se condujo a la repetición del procedimiento con el fin de obtener 2-cloroadenosina por hidrólisis. El sólido se secó a vacío a 50°C para obtener 880 g de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina con una pureza por HPLC > 98%.

Ejemplo 4: Preparación de 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-2'-O-trifluorometilsulfonyl-β-D-ribofuranosil)-adenina (VII)

Se suspendió 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-adenina (880 g) en una mezcla de piridina (0.8 l) y CH₂Cl₂ (8 l). En atmósfera de N₂, la solución de anhídrido trifílico (455 ml) en CH₂Cl₂ (1500 ml) se adicionó lentamente a la mezcla de reacción con agitación y enfriamiento a -10-0°C. La mezcla de reacción se incubó durante 30 min en las mismas condiciones. A continuación, se adicionó solución acuosa saturada de NaHCO₃ con agitación hasta que el pH de la mezcla resultante se ajustó a 7. La fase orgánica se separó, se lavó con agua y se evaporó a presión reducida para producir 1000 g (rendimiento del 95%) del producto base, que tiene una pureza por HPLC > 95%.

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

Se suspendió 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-2'-O-trifluorometilsulfonyl-β-D-ribofuranosil)-adenina como se preparó en el ejemplo 4 en 5 litros de tolueno. Se adicionaron sucesivamente N, N-diisopropiletilamina (350 ml) y trihidrofluoruro de trietilamina (1.2 l) con agitación. La mezcla de reacción se agitó durante 48 horas a 35-40°C y se evaporó a presión reducida. El residuo se trató con acetato de etilo y se filtró. Se adicionó solución acuosa saturada de NaHCO₃ al filtrado con agitación hasta que el pH de la mezcla resultante se ajustó a 7. La fase orgánica se separó, se lavó con agua y se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en metanol (1.5 l) mientras se agitaba a 60°C. La solución obtenida se mantuvo a 2-6°C durante 2-3 horas hasta precipitación completa. El precipitado formado se filtró, se lavó con metanol y se secó para producir 540 g (60% de rendimiento) del producto base, con una pureza por HPLC de > 95%.

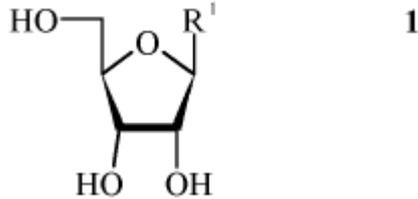
Ejemplo 6: Preparación de 2-cloro-9-(2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-adenina (esto es, clofarabina)

Se suspendió 2-cloro-9-(3',5'-di-O-benzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-adenina como se preparó en el ejemplo 5 en 1.5 l de metanol. Se adicionaron 30 ml de una solución metanólica de MeONa al 10% y la mezcla de reacción se agitó durante 30 min a 30°C. Después, se adicionaron agua (1.5 l) y CH₂Cl₂ (1.5 l) a la mezcla de reacción. Después de agitar durante 10 minutos, la fase acuosa se separó y se evaporó bajo presión reducida hasta un volumen de aproximadamente 1.5 l. La solución resultante que contenía clofarabina se purificó por medio de cromatografía en columna preparativa a baja presión, seguido por aislamiento del producto que implicaba cristalización en una mezcla agua/acetona, produciendo 260 g del compuesto base. La pureza típica de la clofarabina fue > 99.9%, y el rendimiento global (después de 6 etapas) fue del 32%.

REIVINDICACIONES

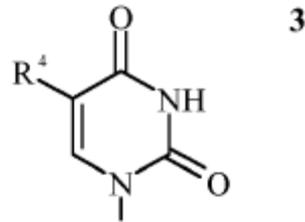
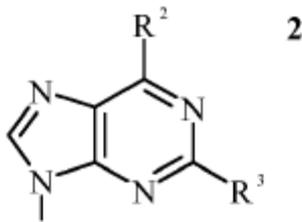
1. Método para la producción de clofarabina, que comprende:

(a) preparar 2-cloroadenosina mediante transglicosilación enzimática entre 2-cloroadenina y un compuesto de fórmula 1,



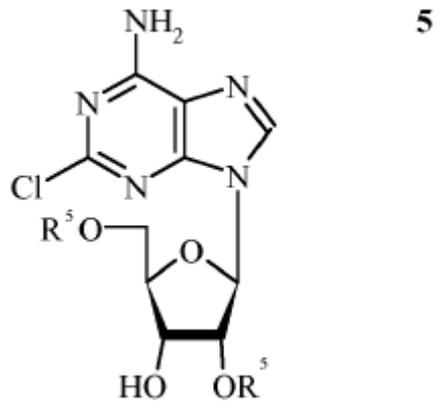
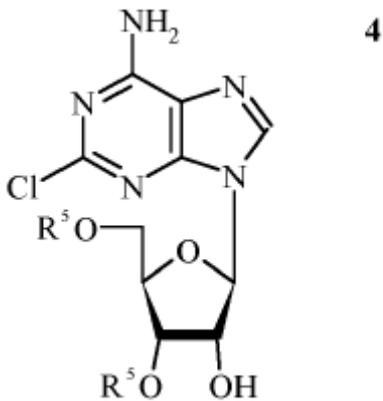
5

en la que R¹ es purina o base de pirimidina de fórmula 2 o fórmula 3, respectivamente,



en la que R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -H, -NH₂, -OH, y -CH₃; y R⁴ se selecciona del grupo que consiste en -H y -CH₃;

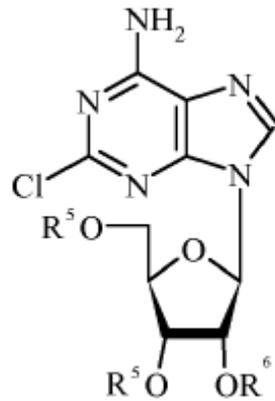
10 (b) proteger parcialmente los grupos hidroxilo de 2-cloroadenosina para obtener una mezcla de un compuesto de fórmula 4 y un compuesto de fórmula 5,



en la que R⁵ es independientemente un grupo protector de hidroxilo;

(c) isomerizar el compuesto de fórmula 4 en el compuesto de fórmula 5;

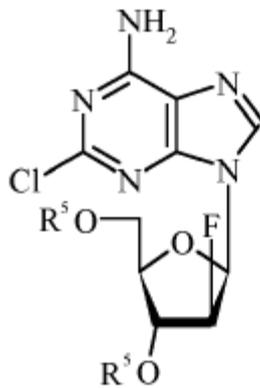
15 (d) preparar un compuesto de fórmula 6 a partir del compuesto de fórmula 5,



6

en la que OR⁶ es un grupo saliente;

(e) fluoración del compuesto de fórmula 6 a un compuesto de fórmula 7; y



7

- 5 (f) desproteger el compuesto de fórmula 7 para obtener la clofarabina.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la transglicosilación en la etapa (a) se lleva a cabo usando purina nucleósido fosforilasa o una combinación de purina nucleósido fosforilasa y uridina fosforilasa.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la fluoración en la etapa (e) se lleva a cabo usando un agente de fluoración.
- 10 4. El método de la reivindicación 3, en el que el agente de fluoración se selecciona del grupo que consiste en ácido fluorhídrico y una mezcla de ácido fluorhídrico y una base de Lewis orgánica.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la base de Lewis orgánica es una amina.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que R¹ es una base de pirimidina que representa uridina.
- 15 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R⁵ es un grupo protector de hidroxilo que representa benzoílo.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que OR⁶ es un grupo saliente que representa trifluorometanosulfonato.

FIGURA 1

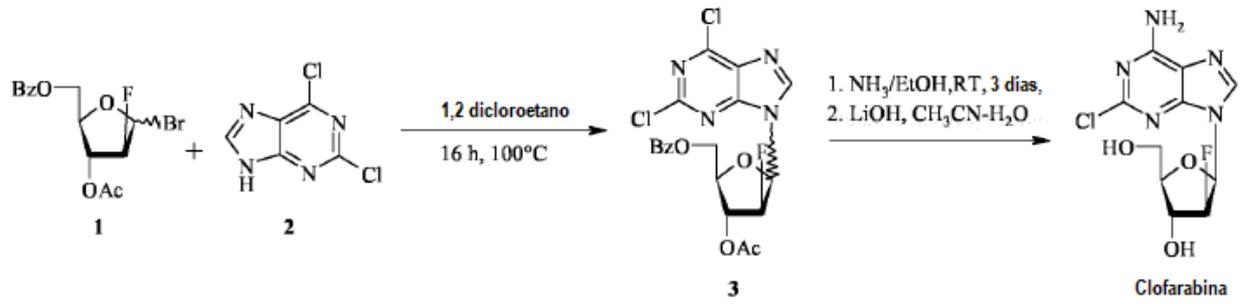


FIGURA 2

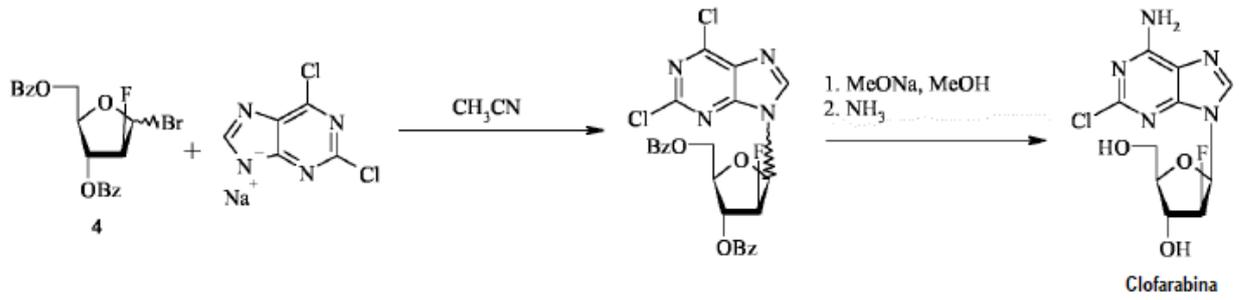


FIGURA 3

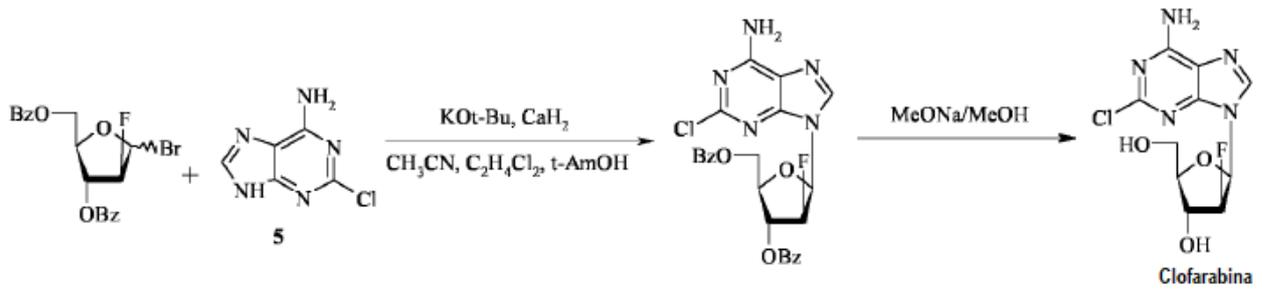


FIGURA 4

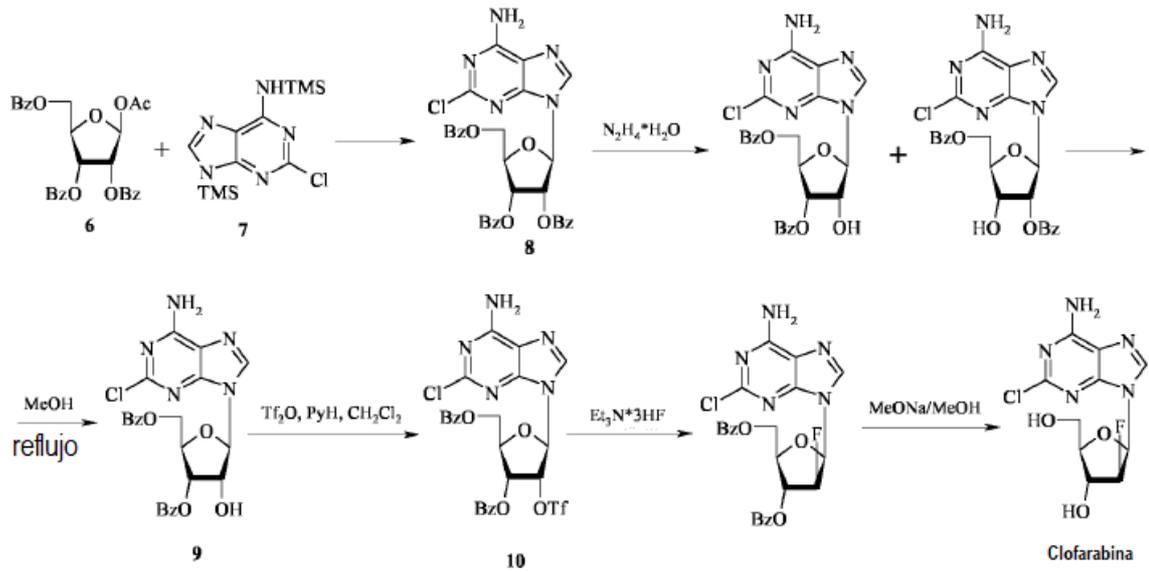


FIGURA 5

