

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 951**

51 Int. Cl.:  
**C07D 498/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2014 PCT/US2014/012398**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14116611**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2014 E 14743372 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2948460**

54 Título: **Síntesis a baja temperatura de derivados de rapamicina**

30 Prioridad:  
**22.01.2013 US 201361755388 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.12.2017**

73 Titular/es:  
**BIOSENSORS INTERNATIONAL GROUP, LTD.  
(100.0%)  
Clarendon House, 2 Church Street  
Hamilton HM 11, BM**

72 Inventor/es:  
**KAYO, MARGARET W.;  
FORNICOLA, RICHARD S. y  
KOVACIK, IVAN**

74 Agente/Representante:  
**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 645 951 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

Síntesis a baja temperatura de derivados de rapamicina

## 5 REFERENCIAS CRUZADAS A APLICACIONES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica prioridad a la Solicitud Provisional de la No. 61 / 755,388 de EE.UU. presentada el 22 de enero de 2013.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

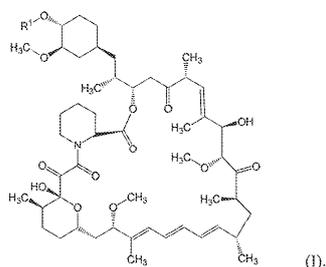
[0004] Biolimus A9<sup>®</sup> (también conocido como BA9) es un ingrediente farmacéutico activo desarrollado como un recubrimiento de fármaco para stents coronarios para prevenir la proliferación y la reestenosis de las células del músculo liso. BA9 está estructuralmente relacionado con la rapamicina (también conocida como sirolimus, CAS [53123-88-9]), un producto natural macrólido disponible en el mercado sintetizado por *Streptomyces hygroscopicus*. Otros miembros de la familia de 'limus' incluyen everolimus (CAS [159351-69-6]), zotarolimus (CAS [221877-54-9]) y temsirolimus (CAS [162635-04-03]). Se sabe que los miembros de la familia poseen actividad inmunosupresora, antifúngica antitumoral y/o antiinflamatoria *in vivo* y son útiles en el tratamiento del rechazo de trasplantes, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes y afecciones caracterizadas por una excesiva proliferación celular. La estructura química de BA9 consiste en una lactona de macrólido de trieno de 31 miembros que conserva la estructura del anillo de rapamicina central y difiere solo en la adición de una cadena lateral en la posición 40 en la que el grupo hidroxilo de la rapamicina se ha alquilado con un grupo etoxietilo.

[0005] La estructura química de BA9 en comparación con sirolimus y otros derivados de sirolimus se proporciona en la Figura 1. La estructura consiste en el anillo lactona de macrólido trieno marcado con rapamicina 31 con etoxietilación en la posición 40, BA9, como sirolimus, se une a la proteína de inmunofilina intracelular FKBP12. Se cree que el complejo macrólido resultante/FKBP-12 se une, de manera similar a sirolimus, a mTOR, una proteína crítica para la progresión del ciclo celular. La inactivación de mTOR resulta en la supresión de varias vías específicas de transducción de señales y detención de la célula Ciclo en la fase G1 a S.

[0006] Dado el valor terapéutico de BA9 y otros derivados de rapamicina, se necesitan procesos mejorados para la preparación de esta familia de agentes activos. La presente invención aborda esta y otras necesidades.

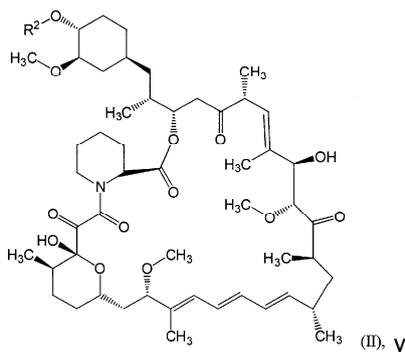
## BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0007] La presente invención proporciona un método para obtener un compuesto con la estructura de la Fórmula I:

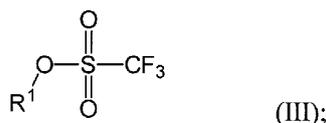


El método incluye:

40 a) combinar en una mezcla de reacción un solvente orgánico, un compuesto de base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno, un compuesto con la estructura de Fórmula II



un compuesto con la estructura de Fórmula III



- 5            b)        manteniendo la mezcla de reacción a una temperatura de 25° C a 55° C; y  
               c)        separando de la mezcla de reacción un compuesto con la estructura de Fórmula I;  
                   donde

$R^1$  is  $(CH_2)_e-O-(CH_2)_f-H$ , en donde e es un número entero seleccionado de 1-5, y f es un número entero seleccionado de 1-5; y;

- 10             $R^2$  es hidrógeno; y de esa manera se obtiene un compuesto con la estructura de Fórmula I.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 15            **[0008]** La **Figura 1** muestra la estructura química de sirolimus, Biolimus A9, y derivados relacionados.  
               **[0009]** La **Figura 2** muestra un esquema sintético para la preparación de derivados de rapamicina de acuerdo con los métodos de la invención  
               **[0010]** La **Figura 3A** muestra el análisis HPLC de crudo BA9 sintetizado a 50-55 °C.  
               **Figura 3B** muestra el análisis HPLC de crudo BA9 sintetizado a 40 °C.

#### 20            DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

##### I.        General

- 25            **[0011]** La presente invención proporciona métodos mejorados para obtener derivados de rapamicina que incluyen Biolimus A9 (BA9). En la Figura 2 se muestra un esquema general para la derivatización de rapamicina a fin de obtener compuestos de Fórmula I. El proceso incluye la reacción de rapamicina con un triflato adecuado a una temperatura controlada, seguido de tratamiento y aislamiento de los productos. En este documento se describen los diversos pasos del proceso.

- 30            **[0012]** Los métodos descritos previamente para sintetizar 40-O-derivados de rapamicina se determinaron para producir subproductos no deseados con modificaciones en grupos de hidroxilo reactivos. Estos subproductos, con propiedades no polares similares a los derivados deseados, reducen significativamente el rendimiento y complican la purificación. Sorprendentemente, se ha encontrado que mediante el control de la temperatura de síntesis, se pueden lograr drásticas reducciones en la producción de subproductos. Pequeños cambios en las condiciones de reacción conducen a ganancias sorprendentemente altas en el rendimiento y pureza del producto. A continuación se describen en detalle estas ventajas inesperadas.

##### 35        II.        Definiciones

- [0013]** "Combinación en una mezcla de reacción" se refiere al proceso de poner en contacto al menos dos especies distintas de manera que se mezclen entre sí y puedan reaccionar, ya sea modificando uno de los reactivos iniciales o formando una tercera especie distinta, un producto. Sin embargo, se debe apreciar que el producto de la reacción resultante puede producirse directamente a partir de una reacción entre los reactivos

añadidos o de un producto intermedio de uno o más de los reactivos añadidos que pueden producirse en la mezcla de reacción.

5 **[0014]** "Solvente orgánico" se refiere a una sustancia que contiene carbono que es líquida a presión y temperatura ambiente y está sustancialmente libre de agua. Los ejemplos de solventes orgánicos incluyen, pero no se limitan a, tolueno, cloruro de metileno, acetato de etilo, acetonitrilo, tetrahidrofurano, benceno, cloroformo, dietiléter, dimetilformamida, dimetilsulfóxido y éter de petróleo.

10 **[0015]** "Compuesto de base orgánica" se refiere a una molécula a base de carbono capaz de aceptar un protón (es decir, catión de hidrógeno) para formar un ácido conjugado de la base. En general, los compuestos de base orgánica usados en los métodos de la invención incluyen al menos un heteroátomo de nitrógeno. Los ejemplos de compuestos de base orgánica incluyen, pero no se limitan a, la base de Huenig (es decir, N, N-diisopropiletilamina), lutidinas que incluyen 2,6-lutidina (es decir, 2,6-dimetilpiridina), trietilamina y piridina.

15 **[0016]** "Separar" se refiere al proceso de aislar al menos una porción de un compuesto de una mezcla que contiene el compuesto y al menos otra sustancia. El compuesto aislado está sustancialmente libre de al menos una de las otras sustancias presentes en la mezcla.

20 **[0017]** "Alquilo" se refiere a un radical alifático saturado, lineal o ramificado con el número de átomos de carbono indicado. El alquilo puede incluir cualquier número de carbonos, como C<sub>1-2</sub>, C<sub>1-3</sub>, C<sub>1-4</sub>, C<sub>1-5</sub>, C<sub>1-6</sub>, C<sub>1-7</sub>, C<sub>1-8</sub>, C<sub>1-9</sub>, C<sub>1-10</sub>, C<sub>2-3</sub>, C<sub>2-4</sub>, C<sub>2-5</sub>, C<sub>2-6</sub>, C<sub>3-4</sub>, C<sub>3-5</sub>, C<sub>3-6</sub>, C<sub>4-5</sub>, C<sub>4-6</sub>, y C<sub>5-6</sub>. Por ejemplo, C<sub>1-6</sub> alquilo incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, hexilo, etc. El alquilo también puede referirse a grupos alquilo que tienen hasta 20 átomos de carbono, tales como, pero sin limitación, heptilo, octilo, nonilo, decilo, etc.

25 **[0018]** "Alquileno" se refiere a un radical alifático saturado, lineal o ramificado con el número de átomos de carbono indicado y que liga al menos otros dos grupos, es decir, un radical de hidrocarburo divalente. Las dos fracciones unidas al quileno pueden unirse al mismo átomo o a diferentes átomos del grupo alquilo. Por ejemplo, un alquileno de cadena lineal puede ser el radical bivalente de  $-(CH_2)_n-$  donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Los grupos de alquilo representativos incluyen, pero no se limitan a, metileno, etileno, propileno, isopropileno, butileno, isobutileno, seobutileno, pentileno y hexileno.

30 **[0019]** "Alquenilo" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene al menos 2 átomos de carbono y al menos un doble enlace. El alquenilo puede incluir cualquier cantidad de carbonos, como C<sub>2</sub>, C<sub>2-3</sub>, C<sub>2-4</sub>, C<sub>2-5</sub>, C<sub>2-6</sub>, C<sub>2-7</sub>, C<sub>2-8</sub>, C<sub>2-9</sub>, C<sub>2-10</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>3-4</sub>, C<sub>3-5</sub>, C<sub>3-6</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>4-5</sub>, C<sub>4-6</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>5-6</sub> y C<sub>6</sub>. Los grupos de alquenilo pueden tener cualquier cantidad adecuada de enlaces dobles, que incluyen, pero no se limitan a, 1, 2, 3, 4, 5 o más. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, pero no se limitan a, vinilo (etenilo), propenilo, isopropenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, butadienilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, isopentenilo, pentadienilo, 1,4-pentadienilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 1,3-hexadienilo, hexadienilo, 1,5-hexadienilo, 2,4-hexadienilo y 1,3,5-hexatrienilo.

35 **[0020]** "Alquinilo" se refiere a bien un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene al menos 2 átomos de carbono y al menos un triple enlace. El alquinilo puede incluir cualquier cantidad de carbonos, como C<sub>2</sub>, C<sub>2-3</sub>, C<sub>2-4</sub>, C<sub>2-5</sub>, C<sub>2-6</sub>, C<sub>2-7</sub>, C<sub>2-8</sub>, C<sub>2-9</sub>, C<sub>2-10</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>3-4</sub>, C<sub>3-5</sub>, C<sub>3-6</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>4-5</sub>, C<sub>4-6</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>5-6</sub> y C<sub>6</sub>. Ejemplos de grupos alquinilo incluyen, pero no se limitan a, acetilenilo, propinilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, seobutenilo, butadinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, isopentinilo, 1,3-pentadienilo, 1,4-pentadienilo, 1-hexinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 1,3-hexadienilo, 1,4-hexadienilo, 1,5-hexadienilo, 2,4-hexadienilo y 1,3,5-hexatrienilo.

40 **[0021]** "Ariilo" se refiere a un sistema de anillo aromático que tenga cualquier número adecuado de átomos del anillo y cualquier número adecuado de anillos. Los grupos de ariilo pueden incluir cualquier número adecuado de átomos del anillo, tales como, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 átomos del anillo, así como de 6 a 10, 6 a 12, o de 6 a 14 elementos del anillo. Los grupos ariilo pueden ser monocíclicos, fusionados para formar grupos bicíclicos o tricíclicos, o unidos mediante un enlace para formar un grupo biarilo. Los grupos de ariilo representativos incluyen fenilo, naftilo y bifenilo. Otros grupos de ariilo incluyen bencilo, con un grupo de enlace de metileno. Algunos grupos de ariilo tienen de 6 a 12 elementos del anillo, como fenilo, naftilo o bifenilo.

45 **[0022]** "Alcoxi" se refiere a un grupo alquilo con un átomo de oxígeno que conecta el grupo alquilo al punto de unión: alquil-O-. En cuanto al grupo alquilo, los grupos alcoxi pueden tener cualquier cantidad adecuada de átomos de carbono, tales como C<sub>1-6</sub>. Los grupos alcoxi incluyen, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, 2-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, pentoxi, hexoxi, etc.

**[0023]** "Carbonilo" se refiere a una fracción que consiste en un doble enlace carbono-oxígeno (es decir, -C(O)-).

**[0024]** "Acilo" se refiere a una fracción que incluye un grupo carbonilo, como se describe aquí, unido a un grupo alquilo, un grupo alquenilo o un grupo alquinilo, como se describe en este documento.

55 **[0025]** La "relación molar" se refiere a la relación de la cantidad de moles de una primera especie a la cantidad de moles de una segunda especie o de cualquier otra especie adicional.

**[0026]** "Cromatografía" se refiere al proceso de separar un compuesto de uno o más de otros compuestos en una mezcla aplicando la mezcla a una fase estacionaria y eluyendo los compuestos de la fase estacionaria usando una fase móvil. Los ejemplos de cromatografía incluyen cromatografía de gases, cromatografía de gel de

sílice, cromatografía de fase inversa y cromatografía de afinidad. La cromatografía se puede realizar, por ejemplo, para analizar el progreso de una reacción química o para purificar una sustancia después de la síntesis química. Las cantidades de material que varían desde microgramos hasta kilogramos se usan típicamente para separaciones cromatográficas, aunque también se pueden usar otras cantidades.

5 **[0027]** "Solidificación" se refiere al proceso de hacer que un compuesto en una solución se fusione en una forma sólida de la sustancia. La totalidad de un compuesto en una solución, o cualquier fracción de la misma, puede hacer que solidifique. La forma sólida puede ser una sustancia amorfa o cristalina. "Precipitar" se refiere a la solidificación de una sustancia en una forma amorfa.

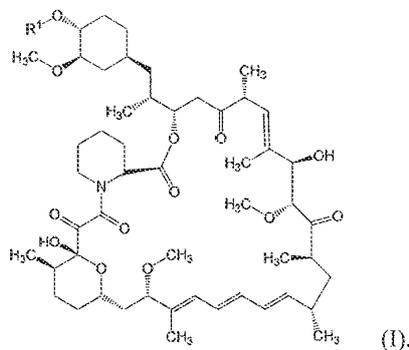
10 **[0028]** "Solubilizar" se refiere al proceso de disolver una forma sólida de una sustancia en un solvente para formar una solución. La totalidad de una sustancia sólida, o cualquier fracción de la misma, puede hacer que se disuelva. El material no disuelto puede estar presente en el solvente en la forma de una suspensión.

15 **[0029]** El término "aproximadamente", como se usa aquí para modificar un valor numérico, indica un rango cercano alrededor de ese valor explícito. Si "X" fuera el valor, "alrededor de X" indicaría un valor de 0,9X a 1,1X, y más preferiblemente, un valor de 0,95X a 1,05X. Cualquier referencia a "alrededor de X" indica específicamente al menos los valores X, 0,95X, 0,96X, 0,97X, 0,98X, 0,99X, 1,01X, 1,02X, 1,03X, 1,04X y 1,05X. Por lo tanto, "alrededor de X" pretende enseñar y proporcionar el soporte de descripción por escrito para una limitación de reivindicación, por ejemplo, "0,98X".

20 **III. Realizaciones de la invención**

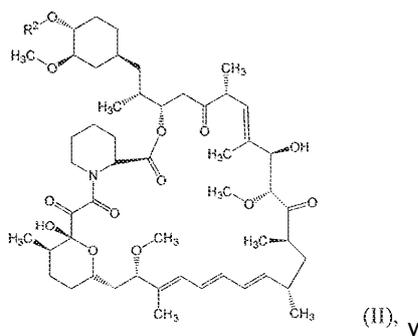
**[0030]** Los métodos de la presente invención se pueden usar para preparar una serie de derivados de macrólidos. Los macrólidos, incluyendo los que tienen estructuras de acuerdo con las Fórmulas I y II, son productos naturales de poliquétido y análogos sintéticos caracterizados por un anillo de lactona macrocíclica. Los métodos de la invención son particularmente útiles para la preparación de derivados de rapamicina Biolimus A9 (B A9), everolimus, zotanolimus y temsirolimus. Otros derivados de macrólidos también se pueden preparar usando los métodos de la invención.

**[0031]** Por consiguiente, algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un método para obtener un compuesto con la estructura de Fórmula I:



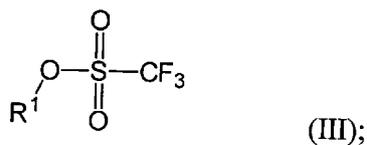
30 El método incluye:

- a) combinar en una mezcla de reacción un solvente orgánico, un compuesto de base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno, un compuesto con la estructura de Fórmula II



35

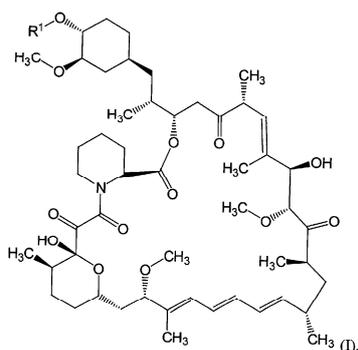
un compuesto con la estructura de Fórmula III



- 5            b)        manteniendo la mezcla de reacción a una temperatura de 25°C a 55 °C; y  
               c)        separando de la mezcla de reacción un compuesto con la estructura de Fórmula I;  
               donde

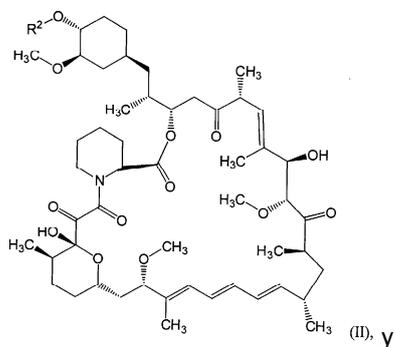
10            R<sup>1</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-H, en donde e es un número entero seleccionado de 1-5, y f es un número entero seleccionado de 1-5; y R es hidrógeno; y de ese modo se obtiene un compuesto con la estructura de la Fórmula I.

15            **[0032]** En algunas realizaciones, las mezclas de la reacción son incoloras. En algunas realizaciones, los productos de las reacciones son incoloros. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para obtener un compuesto con la estructura de la Fórmula I:

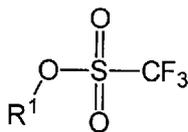


en donde el método incluye:

- 20            a) combinar en una mezcla de reacción un solvente orgánico, un compuesto de base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno, un compuesto con la estructura de Fórmula II



un compuesto con la estructura de Fórmula III



(III);

b) manteniendo la mezcla de reacción a una temperatura de 25 °C a 55 °C para dar una mezcla de reacción incolora; y

c) separando de la mezcla de reacción incolora un compuesto con la estructura de Fórmula I;

5 donde

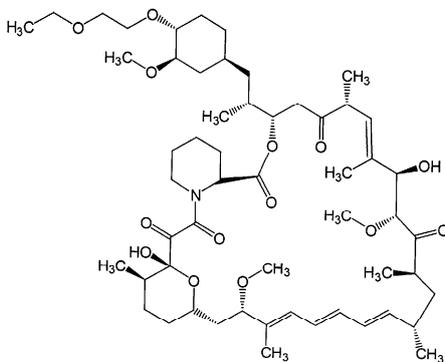
R<sup>1</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-H, en donde e es un número entero seleccionado de 1-5, y f es un número entero seleccionado de 1-5; y;

R<sup>2</sup> es hidrógeno; y

de esa manera se obtiene un compuesto con la estructura de Fórmula I.

10

**[0033]** En algunas realizaciones, el compuesto con la estructura de Fórmula I es



15

**[0034]** En algunas realizaciones, el compuesto con la estructura de Fórmula II es rapamicina. R<sup>1</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-H, e es un número entero seleccionado de 1-5, y f es un número entero seleccionado de 1-5. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> (es decir, 2-etoxietil). En algunas realizaciones, la suma de e y f no es superior a 7.

20

**[0035]** En algunas realizaciones, el compuesto de la Fórmula I es Biolimus A9, también conocido como: BA9; A9; 40-O- (2-etoxietil) -rapamicina; 42-O- (2-etoxietil) -rapamicina; umirolimus; (3S, 6R, 7E, 9R, 10R, 12R, 14S, 15E, 17E, 19E, 21S, 23S, 26R, 27R, 34aS) -9,10,12,13,14,21,22,23,24, 25,26,27,32,33,34,34a-Hexadecahidro-9,27-dihidroxi-3 - [(1R) -2 - [(1S, 3R, 4R) -4- (2-etoxietoxi) -3- metoxiciclohexil] -1-metiletil] -10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-23,27-epoxi-3Hpirido [2,1-c] [1,4] oxazaciclohentriacontina-1 , 5,11,28,29 (4H, 6H, 31H) -pentona; y (1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28E, 30S, 32S, 35R) -1,18-Dihidroxi-12 - [(1R) -2 - [(1S, 3R, 4R) -4- (2-etoxietoxi) -3-metoxiciclohexil] -1-metiletil] -19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,3 5-hexametil-11,36- dioxo-4-azatriciclo [30.3.1.04.9] hexatriaconta-16,24,26,28-tetraeno-2,3,10,14,20-pentaona. El Biolimus A9 también es conocido por el CAS No. 851536-75-9.

25

30

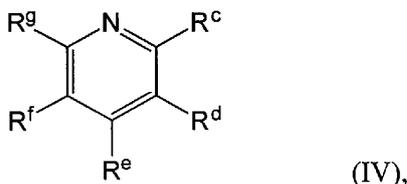
**[0036]** Cualquier compuesto de triflato idóneo para formar compuestos de la Fórmula I se puede usar en los métodos de la invención. En general, un triflato usado en los métodos de la invención tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula III. Los triflatos con una estructura R<sup>1</sup>OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (es decir, Fórmula III) pueden prepararse por medio de la reacción de los alcoholes correspondientes (R<sup>1</sup>OH) con ácido trifluorometanosulfónico, cloruro de trifluorometanosulfonilo, anhídrido trifluorometanosulfónico y similares. Aunque los triflatos son particularmente útiles para preparar compuestos de Fórmula I, también se pueden usar otros derivados de alcoholes R<sup>1</sup>OH (incluidos tosilatos, mesilatos y brosilatos) en los métodos de la invención.

35

**[0037]** Cualquier base orgánica idónea se puede usar en los métodos de la invención. En general, se usan bases que tienen un heteroátomo de nitrógeno. Ejemplos de bases adecuadas incluyen la base de Huenig (es decir, N,N-diisopropiletilamina), lutidinas que incluyen 2,6-lutidina (es decir, 2,6-dimetilpiridina), trietilamina, tributilamina, piridina, 2,6-di-tert-butilpiridina, 1,8-diazabicycloundec-7-eno (DBU), 1,5,7-triazabicyclo (4,4,0) dec-5-eno (TBD), 7-metil-1, 5,7-triazabicyclo (4,4,0) dec-5-eno (MTBD), 1,5-diazabicyclo [4,3,0] no-5-eno (DBN) , 1,1,3,3-tetrametilguanidina (TMG), 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TMP), pempidina (PMP), 1,4-diazabicyclo [2,2,2] octano (TED), quinuclidina y las collidinas. Se pueden usar combinaciones de dos o más bases. Otras bases también pueden ser idóneas en los métodos de la invención.

40

**[0038]** En algunas realizaciones, el compuesto de base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula IV



5

en donde R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup>, R<sup>f</sup>, y R<sup>g</sup> se seleccionan del grupo de manera independiente formado por H, C<sub>1-5</sub> alquilo, OH y NH<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, el compuesto de la base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno se selecciona de 2.6-lutidina y la base de Huenig. En algunas realizaciones, el compuesto de la base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno es 2.6-lutidina.

10

**[0039]** Se puede mantener una mezcla de reacción que contenga un compuesto de Fórmula II, un compuesto de Fórmula III, y una base orgánica a una temperatura de 25°C a 55°C durante cualquier período de tiempo suficiente para formar un compuesto de Fórmula I. En general, la mezcla de reacción se mantiene a una temperatura de 25 °C a 55 °C para cualquier lugar entre unos minutos y 24 horas. El mantenimiento de la mezcla de reacción puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 18 horas, o de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 12 horas, o de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 10 horas, o desde aproximadamente 4 horas hasta aproximadamente 6 horas. El mantenimiento de la mezcla de reacción puede ser aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 horas. En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para obtener un compuesto con la estructura de la Fórmula I como se describe anteriormente, en el que el mantenimiento en la parte (b) es de aproximadamente 2-10 horas.

15

20

**[0040]** Se pueden mantener una mezcla de reacción que contenga un compuesto de Fórmula II, un compuesto de Fórmula III y una base orgánica a cualquier temperatura suficiente para formar un compuesto de Fórmula I desde 25°C a 55°C. La mezcla de reacción se puede mantener en una temperatura de 25 °C a 55 °C, o de aproximadamente 30 °C a 55 °C, de aproximadamente 35 °C a 55 °C, o de aproximadamente 40 °C a 55 °C, o de aproximadamente 45 °C a 55 °C, o de aproximadamente 50 °C a 55 °C, o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C, o de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 45 °C. La mezcla de reacción se puede mantener a 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 °C. En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para obtener un compuesto con la estructura de Fórmula I como se describe anteriormente, en el que la temperatura mantenida en la parte (b) es de 25 a aproximadamente 40°C. Se encontró que pequeños cambios en la temperatura de reacción conducen a una reducción sorprendente en la formación de subproductos no deseados, como se analiza en detalle a continuación

25

30

**[0041]** En algunas realizaciones, las mezclas de la reacción de esta invención son incoloras. En algunas realizaciones, los productos de las reacciones son incoloros. "Mezcla de reacción incolora" significa que la mezcla de reacción tiene una densidad óptica de menos de 0,5 a una longitud de onda entre 560-600 nm. La densidad óptica puede ser, por ejemplo, menor que 0,5 o menor que 0,4 o inferior a 0,3 o inferior a 0,2 o inferior a 0,1 o inferior a 0,05. La densidad óptica está definida por

35

$$A_{\lambda} = \log_{10}(I_0/I_1),$$

40

donde A<sub>λ</sub> es la absorción a cierta longitud de onda de luz (λ), I<sub>1</sub> es la intensidad de la radiación (luz) que ha atravesado el material (radiación transmitida), y I<sub>0</sub> es la intensidad de la radiación antes de atravesar el material (radiación incidental). La densidad óptica se puede medir usando una mezcla de reacción no diluida, o usando una muestra de la mezcla de reacción que se diluye con un solvente adecuado, tal como tolueno y similares. "Producto incoloro" significa que una solución del producto en un solvente adecuado, tal como tolueno y similares, tiene una densidad óptica de menos de 0,5 a una longitud de onda entre 560-600 nm.

45

**[0042]** Cualquier solvente orgánico idóneo se puede usar en los métodos de la invención. Los solventes orgánicos incluyen, pero no se limitan a, tolueno, cloruro de metileno, acetato de etilo, acetonitrilo, tetrahidrofurano, benceno, cloroformo, dietiléter, dimetilformamida, dimetilsulfóxido y éter de petróleo y sus mezclas. En algunas realizaciones, el solvente orgánico es tolueno o cloruro de metileno. La cantidad de solvente no es crítica, siempre que sea suficiente para convertir un compuesto de Fórmula II en un compuesto de Fórmula I. En general, la relación del solvente al compuesto de Fórmula II es de aproximadamente 1:1 a

50

aproximadamente 1000: 1 en peso. La relación del solvente al compuesto para la Fórmula II puede ser, por ejemplo, aproximadamente 100: 1 o aproximadamente 10: 1 en peso.

5 **[0043]** Cualquier cantidad de un compuesto de la Fórmula III suficiente para formar un compuesto de la Fórmula I se puede usar en los métodos de la invención. En general, una mezcla de reacción formada en los métodos de la invención incluye hasta aproximadamente 60 equivalentes molares de un compuesto de Fórmula III para cada equivalente de un compuesto de Fórmula II. La relación molar del compuesto con la estructura de Fórmula III al compuesto con la estructura de Fórmula II puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 30 a 1 a aproximadamente 60 a 1. La relación molar del compuesto con la estructura de Fórmula III al compuesto con la estructura de Fórmula II puede ser aproximadamente 30 a 1 o aproximadamente 35 a 1 o aproximadamente 40 a 1 o aproximadamente 45 a 1 o aproximadamente 50 a 1, o aproximadamente 55 a 1, o aproximadamente 60 a 1. En algunas realizaciones, la relación molar del compuesto con la estructura de Fórmula III al compuesto con la estructura de Fórmula II es de aproximadamente 30 a 1 a aproximadamente 60 a 1. Otras relaciones molares pueden ser adecuadas en los métodos de la invención

15 **[0044]** Cualquier cantidad de base orgánica suficiente para formar un compuesto de la Fórmula I puede usarse en los métodos de la invención. En general, una mezcla de reacción formada en los métodos de la invención incluye hasta aproximadamente 120 equivalentes molares de una base orgánica para cada equivalente de un compuesto de Fórmula II. La relación molar del compuesto de base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno al compuesto con la estructura de Fórmula II puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 80 a 1 a aproximadamente 120 a 1. La relación molar del compuesto de base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno al compuesto con la estructura de Fórmula II puede ser de aproximadamente 80 a 1 o aproximadamente 85 a 1 o de aproximadamente 90 a 1 o de aproximadamente 95 a 1 o de aproximadamente 100 a 1, o aproximadamente 105 a 1, o aproximadamente 110 a 1, o aproximadamente 115 a 1, o aproximadamente 120 a 1. En algunas realizaciones, la relación molar del compuesto de base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno al compuesto con la estructura de Fórmula II es de aproximadamente 80-120 a 1. En algunas realizaciones, la relación es de 104 a 1. Otras relaciones molares pueden ser adecuadas en los métodos de la invención. El compuesto de base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno se puede agregar en una porción, o en dos o más porciones separadas. En algunas realizaciones, el compuesto de la base b orgánica con un heteroátomo de nitrógeno se agrega en dos porciones separadas.

30 **[0045]** Los métodos de la invención generalmente incluyen la separación de un compuesto de Fórmula I de la mezcla de reacción. El compuesto de Fórmula I se puede separar de uno o más compuestos tales como un solvente, un compuesto de base orgánica, un compuesto de Fórmula II o un compuesto de Fórmula III. Se puede usar cualquier técnica de separación adecuada para separar el compuesto de Fórmula I. Las técnicas de separación adecuadas incluyen, pero no se limitan a, filtración de un compuesto solidificado de Fórmula I, centrifugación de un compuesto solidificado de Fórmula I, destilación, extracción de líquido, sublimación, y técnicas cromatográficas. Los ejemplos de técnicas cromatográficas incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de columna de fase normal, cromatografía de columna de fase inversa y cromatografía de capa fina. Se pueden llevar a cabo dos o más técnicas de separación en combinación para separar el compuesto de Fórmula I. En algunas realizaciones, la separación del compuesto con la estructura de Fórmula I comprende el uso de cromatografía para separar el compuesto con la estructura de Fórmula I. En algunas realizaciones, la cromatografía se selecciona del grupo que consiste en cromatografía en columna, cromatografía en columna de gel de sílice, cromatografía líquida a alta presión y cromatografía en capa fina. En algunas realizaciones, la cromatografía es cromatografía en columna de gel de sílice, y la cromatografía se lleva a cabo utilizando una fase móvil que comprende uno o más solventes seleccionados del grupo que consiste en acetato de etilo, hexano y heptano. En algunas realizaciones, la cromatografía es cromatografía en gel de sílice con hexano y acetato de etilo.

45 **[0046]** En algunas realizaciones, el método incluye opcionalmente solidificar el compuesto con la estructura de Fórmula I. En algunas realizaciones, la solidificación del compuesto con la estructura de Fórmula I incluye a) solubilizando el compuesto con la estructura de Fórmula I en metanol, y b) precipitando el compuesto con la estructura de Fórmula I en agua, solidificando así el compuesto con la estructura de Fórmula I. Pueden usarse otros solventes para solubilizar el compuesto con la estructura de Fórmula I antes de la precipitación del agua.

#### IV. Ejemplos

##### Ejemplo 1: Preparación de triflato de 2-etoxietilo

55 **[0047]** El triflato de 2-etoxi-etilo se sintetizó de acuerdo con el método de la Patente de EE.UU. Núm. 7,812,155. Se transfirió cloruro de metileno (558 g) a un matraz de fondo redondo seco previamente purgado con nitrógeno. Esto fue seguido por la adición de 2-etoxietanol (75,0 g) y 2,6-lutidina (89,9 g). La mezcla de reacción se agitó durante 20 minutos mientras se enfriaba la mezcla a entre 0 y -10 °C. Se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico gota a gota (282,4 g) *mediante* un embudo de adición a la mezcla de reacción. Luego se añadió agua a la mezcla de reacción agitada, y la mezcla bifásica resultante se agitó durante 5 minutos adicionales. La capa de diclorometano se lavó, se separó y se recogió. La solución de cloruro de metileno se

secó sobre sulfato de sodio, el sulfato de sodio se eliminó por filtración y el solvente se eliminó a presión reducida a 30 °C.

5 **[0048]** La síntesis también se realizó en una escala de 505 g del 2-etoxietanol de inicio. La síntesis seguida por la purificación mediante destilación al vacío de este lote generó 1060 g (rendimiento 86%) de triflato de 2-etoxietilo. El triflato también se puede preparar *mediante* los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 7,220,755 y la Patente de Estados Unidos N° 7,193,078.

Ejemplo 2: Preparación de Biolimus A9 a 55°C.

10 **[0049]** El acoplamiento de triflato de 2-etoxietilo (44,3 equivalentes) y rapamicina (1,0 equivalente) en tolueno con 2,6-lutidina (49,1 equivalentes) se realizó a 55 °C (temperatura externa de baño de agua) durante 90 minutos. En este proceso (en una escala de 2,0 g de rapamicina), se añadió el triflato de 2-etoxietilo a una mezcla de reacción precalentada (55 °C) en una porción. Después de calentar durante 90 minutos, se apagó el calentamiento externo seguido por la adición de la segunda porción de 2,6-lutidina (54,9 equivalentes). Después de la adición de la segunda porción de lutidina, la mezcla de reacción se agitó durante 90 minutos adicionales a temperatura ambiente, seguido de tratamiento para aislar el crudo BA9. El trabajo incluyó: 1. dilución de la mezcla de reacción con acetato de etilo; 2. enfriamiento rápido de la mezcla de reacción con 1 N HCl frío; y 3. lavado de la capa orgánica con tres porciones de solución de cloruro de sodio al 20% en agua. El pH de la capa de agua después del último lavado con cloruro sódico fue de ~ 6. El material en bruto se purificó a continuación mediante cromatografía en columna de gel de sílice isocrático usando solo una mezcla de solventes (w-hexano / acetato de etilo en una relación de 4: 6 (vol / vol)).

15 **[0050]** El proceso se realizó en una escala de 2,0 g. Después de que la temperatura interna de la mezcla de reacción alcanzó 50 °C ( $t_{\text{baño}} = 51\text{-}52$  °C), se añadió triflato de 2-etoxietilo a la mezcla de reacción en porciones. Se observó un aumento de la temperatura interna hasta 58 °C después de la adición. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC. Las cantidades relativas de rapamicina, BA9 y del subproducto principal con RRT = 1,2 obtenidas por análisis de HPLC se resumen en **Tabla 1**. Las cantidades relativas en las tablas se expresan como AUC% (área bajo la curva), es decir, la fracción de la señal total que corresponde a un pico único (correspondiente, a su vez, a una sola especie, o dos o más especies con tiempos de retención similares/idénticos) en un cromatograma dado RRT se refiere a la relación entre el tiempo de retención de una especie dada y el tiempo de retención de BA9 (*por ejemplo.*, para la especie X,  $RRT = RT_X/RT_{\text{BA9}}$ ). Debido a que la mezcla de reacción contiene tolueno y lutidina, los valores de AUC% son aproximados.

Tabla 1. Cantidades relativas (HPLC / AUC%) de los tres componentes principales de la mezcla de reacción calentada por un baño de agua ( $t_{\text{baño}} = 51\text{-}55$  °C) en varios momentos del progreso de la reacción.

Tiempo (min)	Rapamicina AUC %	BA9 AUC %	Derivado (RRT = 1,2) AUC %
15	40,9	52,6	6,4
45	22,2	65,2	12,6
65	21,4	64,8	13,9
90	14,0	67,9	18,1
+ 90*	13,9	67,1	16,4

90 minutos de agitación después de la adición de la segunda porción de 2,6-lutidina

35 **[0051]** Tal y como revelaron los datos en la **Tabla 1**, el AUC% de BA9 alcanzó su máximo tras 45 minutos de calentamiento. Después de este tiempo, la rapamicina aún se consume, pero también está acompañada por un aumento del subproducto con RRT de 1.2. La adición de la segunda porción de 2,6-lutidina seguida de agitación a temperatura ambiente durante 90 minutos no tuvo un efecto significativo sobre la composición de la mezcla de reacción.

40 **[0052]** El análisis por HPLC mostró que el proceso dio como resultado BA9 bruto (contenido de AUC 58,6%). Además de la rapamicina sin reaccionar ( $RRT \sim 0,52\text{-}0,58$ ), el producto crudo contenía una impureza/subproducto mayor en el tiempo de retención de HPLC = 11,0 minutos ( $RRT = 1,2$ ) de 9,6% de AUC y un conjunto de impurezas entre 13,2 ( $RRT = 1,42$ ) y 13,6 minutos ( $RRT = 1,47$ ) hasta 1,8% de AUC.

45 Ejemplo 3: Preparación de Biolimus A9 a Bajas Temperaturas.

50 **[0053]** El proceso se realizó a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente mediante el siguiente procedimiento. La adición de triflato de 2-etoxietilo (hecho en porciones en 1 hora) elevó la temperatura interna de la mezcla de reacción inicial de 22,6 °C a 26,3 °C. Después de completar la adición del triflato, la mezcla de reacción se agitó a ~ 26 °C durante 40 minutos y luego se analizó mediante HPLC (ver entrada para 0 horas en

la Tabla 2). La temperatura interna de la mezcla de reacción se aumentó luego en un par de minutos a 30 °C y la mezcla se agitó a esta temperatura durante hasta 19,5 horas. Tras agitar durante 19,5 horas, la reacción alcanzó un punto de equilibrio.

5 **Tabla 2. Cantidades relativas (HPLC/AUC%) de los tres componentes principales de la mezcla de reacción a diferentes tiempos y temperaturas internas del progreso de la reacción**

Tiempo (min)	Rapamicina AUC %	BA9 AUC %	Subproducto (RRT = 1,2), AUC %	AUC% Absoluto de BA9
0 hrs	67,9	31,4	0,8	30,3
1,5 hrs a 30 °C	46,7	51,8	1,4	48,3
3,5 hrs a 30 °C	36,2	61,4	2,3	56,9
5 hrs a 30 °C	32,0	66,1	1,9	60,7
19,5 hrs a 30 °C	27,4	69,3	3,2	64,3

10 **[0054]** Para los datos de la Tabla 2, "AUC% BA9" se refiere al pico BA9 integrado con relación a la suma de los picos BA9, rapamicina y RRT = 1,2. "AUC% Absoluto" se refiere al pico BA9 integrado en relación con todos los picos integrados en el cromatograma HPLC. Los datos en la Tabla 2 revelan lo siguiente: a) controlar la temperatura del lote durante la adición de triflato de 2-etoxietilo a  $\leq 30$  °C contribuye significativamente a la reducción de la formación del subproducto con RRT = 1,2; b) todavía hay 32% de rapamicina sin reaccionar en la mezcla de reacción incluso después de 5 horas a 30 °C; c) requeriría un total de hasta 20 horas de calentamiento para reducir la cantidad de rapamicina a 27% AUC; y d) el calentamiento prolongado provoca un aumento del RRT = 1,2 subproducto hasta el 3,2% del AUC.

15 **[0055]** El proceso se realizó a una temperatura máxima de 40 °C. En este ensayo, la adición de triflato de 2-etoxietilo (hecho en porciones en el plazo de 1 hora) elevó la temperatura interna de 24,2 °C a 27,6 °C. Después de completar la adición del triflato, la mezcla de reacción se agitó a  $\sim 27$  °C durante 30 minutos, luego se analizó por HPLC (ver entrada durante 0 horas en la Tabla 3). La temperatura interna de la mezcla de reacción se aumentó a 40 °C y se agitó a esta temperatura durante hasta 4 horas. Como es evidente en la Tabla 3, el rendimiento máximo de BA9 en la mezcla de reacción se alcanzó después de 3-4 horas de agitación a 40 °C.

20 **[0056]** La comparación de los datos para diferentes temperaturas de reacción indica la formación del subproducto con HPLC / RRT = 1,2 a niveles más altos (7-10% de AUC) a 40 °C que para las entradas análogas a 30 °C (1-2 % AUC). Además, se confirmó que controlar la temperatura del lote durante la adición de triflato de 2-etoxietilo a  $\leq 30$  °C contribuye significativamente a la reducción de la formación del subproducto con RRT = 1,2 ( $\sim 1$  contenido de AUC%).

25 **[0057]** La síntesis de BA9 en bruto a temperaturas  $\leq 40$  °C con el tratamiento completo de la mezcla de reacción que genera BA9 en bruto se sometió a ensayo en una escala de 2,0 g de rapamicina. Tras la adición en porciones del triflato de 2-etoxietilo en 30 minutos, la temperatura interna aumentó de 20,0 °C a 24,0 °C y después de la agitación adicional (aún sin calentamiento externo) a 25,5 °C (después de 1 hora desde el comienzo del triflato adición). La mezcla de reacción se calentó externamente a 40 °C (durante 25 minutos) y se agitó a esta temperatura durante 3 horas. Después de la reacción inicial, se añadieron 12,9 g de 2,6-lutidina a la mezcla de reacción. La nueva mezcla de reacción se agitó a 30 °C durante 90 minutos.

30 **Tabla 3. Cantidad relativa (HPLC / AUC%) de los tres componentes principales de la mezcla de reacción a diferentes tiempos y las temperaturas internas del progreso de la reacción**

Tiempo (min)	Rapamicina AUC %	BA9 AUC %	Subproducto (RRT = 1,20), AUC %	AUC% Absoluto de BA9
0 hrs	59,7	39,1	1,2	37,7
1 hr a 40 °C	32,8	59,9	6,5	57,5
2 hrs a 40 °C	26,9	65,2	7,9	60,3
3 hrs a 40 °C	22,8	68,6	8,6	62,2
4 hrs a 40 °C	20,6	70,0	9,5	62,9

35 **[0058]** El trabajo del producto incluyó: 1. dilución de la mezcla de reacción con 160 ml de acetato de etilo; 2. enfriamiento rápido de la mezcla de reacción con 160 ml de HC 1 N frío en el rango de temperatura entre 3 °C y 9 °C; y 3. lavado de la capa orgánica con tres porciones de solución de cloruro de sodio al 20% en agua (320 ml, 200 ml y 200 ml, *respectivamente*). El pH de la capa de agua después del último lavado con cloruro sódico fue de 6. La traza de HPLC del producto oleoso del producto crudo reveló un mayor contenido de BA9 (66,3 AUC%).

El análisis por HPLC mostró que el contenido de BA9 en un producto bruto análogo generado a 50-55 °C era solo del 58,6%. Además, la comparación de los dos lotes de BA9 crudo (generados a 40 °C y a 50-55 °C) revela menores cantidades de subproductos en el lote generado a la temperatura más baja. Lo más sorprendente es la diferencia en el contenido del subproducto con HPLC / RRT = 1,2 en los dos lotes. Si bien el contenido de esta impureza es 9,6 AUC% para el lote sintetizado a la temperatura más alta (ver Figura 3A), el contenido es solo 3,6 AUC% para el producto bruto generado a 40 °C (ver Figura 3B).

#### Ejemplo 4: Escalado de reacción

**[0059]** Debido a que se descubrió que la distribución de producto y subproducto dependía de la temperatura de la mezcla de reacción, se investigó el perfil de temperatura para el proceso de derivatización de rapamicina en varias escalas. El proceso se realizó en una escala de 30,0 g con respecto al inicio de rapamicina. Tras la adición en porciones sensatas del triflato de 2-etoxietilo en 30 minutos, la temperatura interna aumentó de 20 °C a 27 °C y después de agitar aún más (aún sin calentamiento externo) a 32 °C (después de 1 hora desde el comienzo de la adición de adición). La mezcla de reacción se calentó externamente a 40 °C y se agitó a esta temperatura durante 3 horas. Después de la reacción inicial, se añadió 2,6-lutidina a la mezcla de reacción y se agitó a 30 °C durante 90 minutos. El procesamiento de la mezcla de reacción proporcionó un producto oleoso. Basándose en el análisis por HPLC, el producto bruto generado por primera vez por la síntesis a gran escala contenía 64,2% de ABC de BA9 y 4,9% de subproducto con RRT = 1,2.

**[0060]** La síntesis de escalado de BA9 de acuerdo con el proceso descrito en el párrafo anterior se repitió dos veces más, en ambos casos a una escala de 52,0 g de inicio de rapamicina. El aumento adicional de la escala de la síntesis contribuyó a una exotermia aún mayor del lote al agregar triflato de 2-etoxietilo (de 20 a 36 °C en el primer caso y de 18 a 33 °C en el segundo caso). Como es evidente a partir de las HPLC del Biolimus A9 crudo sintetizado a escala 52 g, los productos en bruto contienen 62,9 y 65,0 AUC% de Biolimus A9 y 10,2 y 8,5 AUC% del subproducto con RRT de 1,20.

**[0061]** La comparación de la exotermia inicial observada durante la adición de triflato de 2-etoxietilo a la mezcla de reacción a diferentes escalas de síntesis muestra que la extensión de este efecto exotérmico es proporcional a la escala de la síntesis (ver la comparación de los aumentos de temperatura debidos a el proceso exotérmico para las síntesis descritas previamente en la Tabla 4).

**[0062]** La comparación de los perfiles de impurezas del Biolimus A9 crudo en una escala de 2 g en primera instancia y de los lotes de Biolimus A9 crudo sintetizados a 30-52 g revela la formación de cantidades mayores del subproducto con RRT = 1,2 según el escalado del procedimiento sintético. Si bien la cantidad de esta impureza fue solo de 3,6% para un producto de síntesis de 2 g, se encontró que la cantidad de esta impureza era 4,9-10,2% AUC para los productos sintetizados a gran escala. Sin desear estar obligado por ninguna teoría en particular, se cree que esta diferencia es causada por un aumento de la temperatura del lote más bajo durante la adición térmica no controlada del triflato de 2-etoxietilo en una escala pequeña (temperatura elevada a 25,5 °C, mientras que en el síntesis a gran escala hasta 36 °C; consulte la Tabla 4). Como tal, las medidas para controlar la temperatura de reacción deben ajustarse según la escala de la reacción.

Tabla 4. Relación entre la escala de la síntesis de BA9 crudo y la extensión del aumento de la temperatura debido a la exotermia asociada con la adición de triflato a la mezcla de reacción.

Escala de síntesis (cantidad de rapamicina de inicio)	Temperaturas observadas	incremento de la temperatura
2 g	20,0 °C a 25,5 °C	5,5 °C
30 g	20 °C a 32 °C	12 °C
52 g	20 °C a 36 °C	16 °C
52 g	18 °C a 33 °C	15 °C

#### Ejemplo 5: Elaboración de Biolimus A9

**[0063]** La síntesis se repitió en una escala de 2,0 g de rapamicina, con una temperatura de reacción máxima de solo 35°C. La única diferencia fue una ralentización lenta del aumento de la temperatura de la mezcla de reacción de 25 °C a 35 °C (dentro de los 30 minutos, en lugar de - 5 minutos, para minimizar aún más las cantidades de subproductos). La síntesis nuevamente generó Biolimus A9 crudo con un alto contenido de HPLC/ AUC (66,8%) de la API y con un bajo contenido de subproducto con RRT = 1,2 (RT = 10,7 min, 2,7%).

**[0064]** El producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice empleando una mezcla de solvente en gradiente de w-hexano y acetato de etilo. Las fracciones cromatográficas se analizaron mediante HPLC. Se combinaron las fracciones con HPLC/ AUC% de BA9  $\geq$  95,0% y al mismo tiempo se pasaron las especificaciones para la presencia de las impurezas conocidas y desconocidas. Esto proporcionó un rendimiento del 40% de BA9 purificado con una pureza HPLC / AUC = 96,2%.

**[0065]** Además de la porción principal de BA9 purificado, se obtuvieron otras dos porciones significativas de BA9 purificada a partir de la purificación por cromatografía en gel de sílice: a) rendimiento del 12% de una porción con una pureza de HPLC / AUC del 91,8% y b) rendimiento del 8% una porción con una pureza HPLC / AUC del 91,8%.

- 5 **[0066]** El uso de un gradiente poco profundo y de elución extendida con hexano/acetato de etilo dio como resultado una mala resolución de las impurezas durante la cromatografía en columna a una escala mayor (escala de 52 g de rapamicina) Se utilizó un gradiente más pronunciado con una mezcla de w-hexano / acetato de etilo. La purificación de Biolimus A9 en bruto por cromatografía en columna de gel de sílice del gradiente más  
10 g de rapamicina. Se obtuvieron 10,0 g adicionales de producto (HPLC/AUC, pureza del 94,9%).

Ejemplo 6: Pequeños cambios en la temperatura de reacción conducen a aumentos sorprendentes en la distribución del producto.

- 15 **[0067]** Se observó que se producían pequeños cambios de temperatura en un cambio sorprendente en la distribución del producto/subproducto. La comparación de los muestreos de la mezcla de reacción para la síntesis a 60 °C frente a 55 °C, como se muestra en la Tabla 5 y la Tabla 6, indica que la pequeña reducción en la temperatura de reacción reduce drásticamente la formación de subproductos. Esto fue más evidente para el compuesto eluyendo a 11,5 minutos de tiempo de retención, una impureza disustituida (12,5% de TR 11,5 reaccionó a 60 °C frente a 5,9% a 55 °C).

20

Tabla 5. El muestreo de la mezcla de reacción que contiene rapamicina, diclorometano, base de Huenig y 2-etoxietiltriflato se realiza durante 80 minutos a 60 °C.

	Rap (AUC%)	BA9 (AUC%)	Impureza (RT 11,5)	Impureza (RT 12,0)	Impureza (RT 12,4)	Impureza (RT 13,6)
<b>Rapamicina en DCM en presencia de la base de Huenig</b>	98,0%	-	-	-	-	-
<b>2 min después de la adición de triflato</b>	92,9%	5,0%	-	-	-	0,6%
<b>Después de que la mezcla de reacción alcance 60 °C</b>	90,6%	8,2%	0,1%	-	0,2%	-
17 min a 60 °C	49,6%	41,7%	2,2%	0,1%	0,8%	0,7%
35 min a 60 °C	53,8%	37,4%	2,5%	0,4%	0,6%	0,6%
52 min a 60 °C	37,9%	45,3%	5,6%	1,3%	1,2%	0,8%
65 min a 60 °C	38,1%	38,4%	7,1%	2,1%	1,6%	0,7%
75 min a 60 °C	28,6%	38,0%	10,5%	3,1%	1,9%	1,1%
80 min a 60 °C	29,8%	34,6%	10,0%	2,9%	2,2%	0,7%
<b>FINAL El crudo se enfría a 9°C</b>	20,7%	39,8%	12,5%	3,9%	2,9%	1,4%

- 25 **[0068]** En consecuencia, hay una conversión mejorada del material de inicio de rapamicina en BA9 haciendo funcionar la reacción para la misma duración a una temperatura de solo 5 °C más baja (el 39,8% de BA9 reaccionó a 60 °C frente al 70,2% a 55 °C). La supresión de la formación de subproductos es especialmente ventajosa porque los subproductos son especialmente difíciles de eliminar de las mezclas de productos. Por el contrario, los materiales de inicio sin reaccionar son fáciles de eliminar. De ese modo, los métodos descritos en este documento aumentan significativamente el rendimiento del producto purificado y reducen el coste y las complicaciones asociadas con los métodos conocidos anteriormente.
- 30

Tabla 6. El muestreo de la mezcla de reacción que contiene rapamicina, diclorometano, base de Huenig y 2-etoxiltrimetilato se realiza durante 80 minutos a 55 °C.

	Rap AUC %	BA9 AUC %	Impureza (RT 11,5)	Impureza (RT 12,0)	Impureza (RT 12,4)	Impureza (RT 13,6)
<b>Rapamicina en DCM en presencia de la base de Huenig</b>	-	-	-	-	-	-
<b>2 min después de la adición de triflato</b>	-	-	-	-	-	-

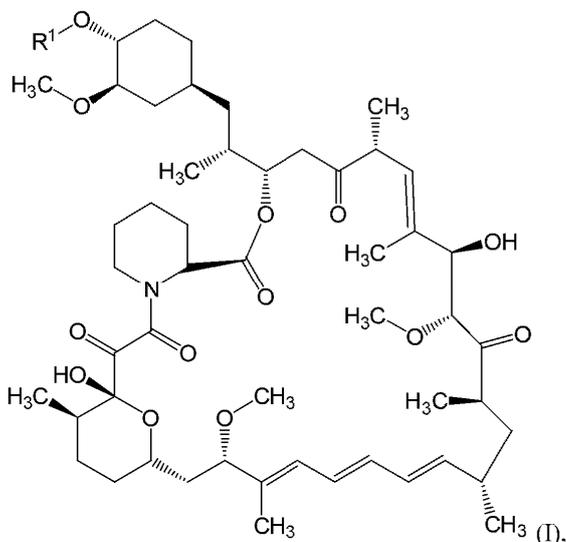
ES 2 645 951 T3

<b>Después de que la mezcla de reacción alcance 55 °C</b>	90,4%	7,7%	0,1%	-	0,2%	
15 min a 55 °C	57,1%	37,2%	1,6%	-	0,6%	0,6%
30 min a 55 °C	42,9%	56,5%	2,6%	-	0,7%	1,3%
45 min a 55 °C	35,8%	53,9%	3,8%	-	1,0%	1,3%
65 min a 55 °C	16,8%	67,8%	4,8%	-	1,0%	2,0%
80 min a 55 °C	28,4%	57,6%	4,6%	0,2%	0,7%	1,0%
<b>FINAL El crudo se enfría a 5 °C</b>	15,1%	70,2%	5,9%	-	1,1%	2,6%

[0069] Aunque lo anterior se ha descrito en cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad y comprensión, un experto en la técnica apreciará que ciertos cambios y modificaciones pueden practicarse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas

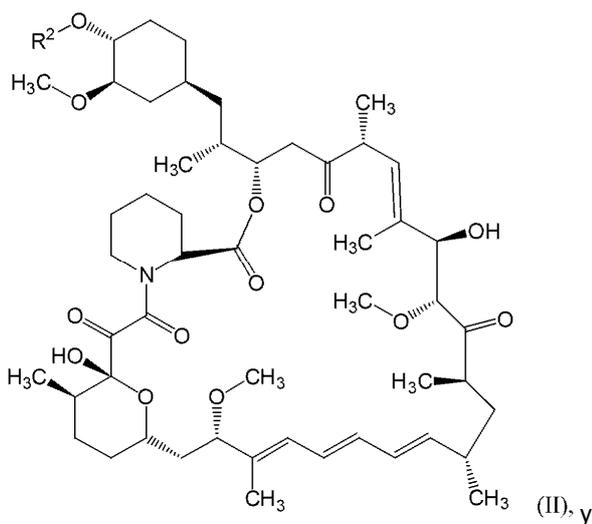
Reivindicaciones

1. Un método para obtener un compuesto con la estructura de Fórmula I.

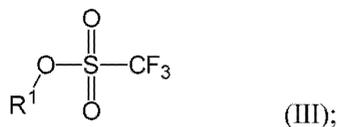


el método incluye:

- 5 a) combinar en una mezcla de reacción un disolvente orgánico, un compuesto de base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno, un compuesto con la estructura de Fórmula II



un compuesto con la estructura de Fórmula III



10

- b) manteniendo la mezcla de reacción a una temperatura de 25°C a 55°C; y  
a) separando de la mezcla de reacción un compuesto que tiene la estructura de Fórmula I;

donde

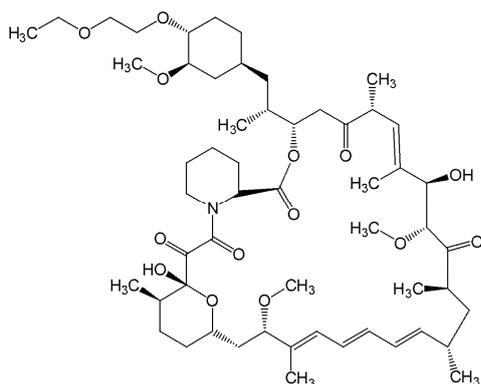
15

R<sup>1</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-H, en donde e es un número entero seleccionado de 1-5, y f es un número entero seleccionado de 1-5; y;

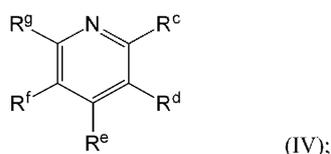
R<sup>2</sup> es hidrógeno;

de esa manera se obtiene un compuesto con la estructura de Fórmula I.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto con la estructura de Fórmula I es



3. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto de base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno tiene la estructura de Fórmula IV



5

en donde:

R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup>, R<sup>f</sup>, y R<sup>g</sup> se seleccionan del grupo de manera independiente formado por HH, C<sub>1-5</sub>alquilo, OH, y NH<sub>2</sub>.

10

4. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto de base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno se selecciona entre 2,6-lutidina y N, N-diisopropiletilamina.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el mantenimiento en la parte (b) es de 2 a 10 horas.

6. El método de la reivindicación 5, en el que la temperatura mantenida en la parte (b) es de 25 a 40 °C.

7. El método de la reivindicación 1, en donde el disolvente orgánico es tolueno o cloruro de metileno.

15

8. El método de la reivindicación 1, en donde la molar del compuesto con la estructura de Fórmula III al compuesto con la estructura de Fórmula II es de aproximadamente 30 a 1 a 60 a 1.

9. El método de la reivindicación 1, en donde la relación molar del compuesto de base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno al compuesto con la estructura de la Fórmula II es de 80 a 1 a 120 a 1.

10. El método de la reivindicación 9, en donde la relación es 104 a 1.

20

11. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto de la base orgánica con un heteroátomo de nitrógeno se agrega en dos porciones separadas.

12. El método de la reivindicación 1, en donde se separa el compuesto con la estructura de la cromatografía en Fórmula I g.

13. El método de la reivindicación 1, que comprende además solidificar el compuesto con la estructura de Fórmula I.

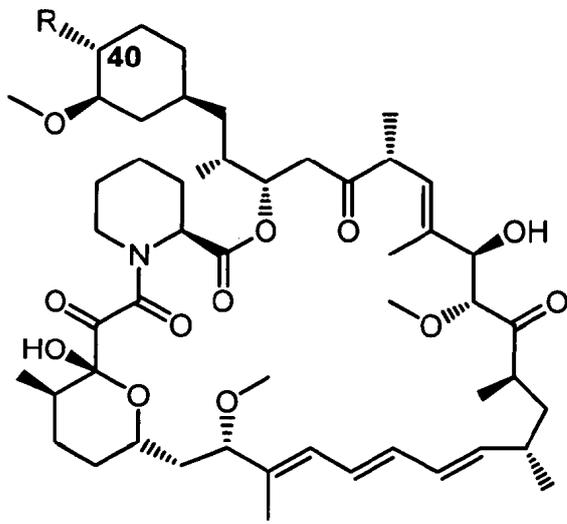
25

14. El método de la reivindicación 13, en donde la solidificación del compuesto con la estructura de Fórmula I comprende

a) solubilizar el compuesto con la estructura de Fórmula I en metanol; y

b) precipitar el compuesto con la estructura de Fórmula I en agua; solidificando con ello el compuesto con la estructura de Fórmula I.

30



Sirolimus, R = OH  
 Everolimus, R = OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH  
 Biolimus A9, R = OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 Temsirolimus, R = OCOCCH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>  
 Zotarolimus, R = NCHN<sub>3</sub>

Figura 1



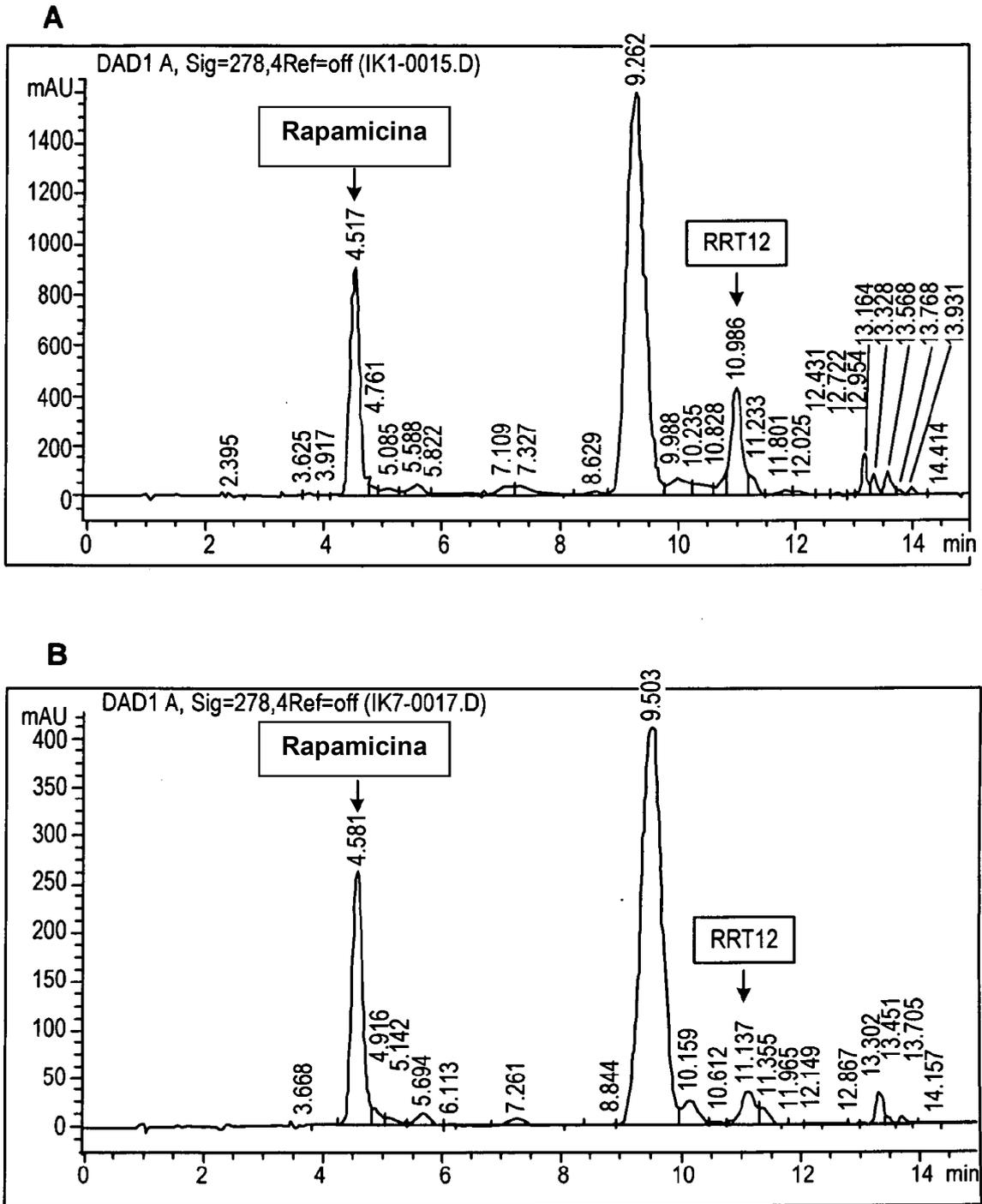


Figura 3