



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101646685 B

(45) 授权公告日 2014.12.17

(21) 申请号 200880007952.9
 (22) 申请日 2008.03.13
 (30) 优先权数据
 60/906,838 2007.03.14 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2009.09.11
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/IL2008/000360 2008.03.13
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02008/111082 EN 2008.09.18
 (73) 专利权人 坎-菲特生物药物有限公司
 地址 以色列佩塔提克瓦
 (72) 发明人 保罗·布鲁齐恩斯基 刘学军
 卡梅伦·吉布
 佩德罗·埃尔南德斯-阿巴德
 (74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
 责任公司 11240
 代理人 吴贵明 张英
 (51) Int. Cl.
 C07H 19/16 (2006.01)
 A61K 31/7076 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)

evaluation of di- and trisubstituted
 5'-carboxamidoadenosine analogues.
 《Bioorganic & Medicinal Chemistry》.2005, 第
 14 卷
 Boris Rodenko, et al. Solid
 phase synthesis and antiprotozoal
 evaluation of di- and trisubstituted
 5'-carboxamidoadenosine analogues.
 《Bioorganic & Medicinal Chemistry》.2005, 第
 14 卷
 Pnina fishman, et al. Targeting the
 A3 Adenosine Receptor for Cancer
 Therapy: Inhibition of Prostate Carcinoma
 Cell Growth by A3AR Agonist. 《Anticancer
 Research》. 2003, 第 23 卷
 Carola Gallo-Rodriguez, et
 al. Structure-Activity Relationships of
 N6-Benzyladenosine-5'-uronamides as
 A3-Selective Adenosine Agonists. 《J. Med.
 Chem》. 1994, 第 37 卷 (第 5 期),
 Carola Gallo-Rodriguez, et
 al. Structure-Activity Relationships of
 N6-Benzyladenosine-5'-uronamides as
 A3-Selective Adenosine Agonists.. 《J. Med.
 Chem》. 1994, 第 37 卷 (第 5 期),

(56) 对比文件
 Boris Rodenko, et al. Solid
 phase synthesis and antiprotozoal

审查员 高义

权利要求书3页 说明书23页

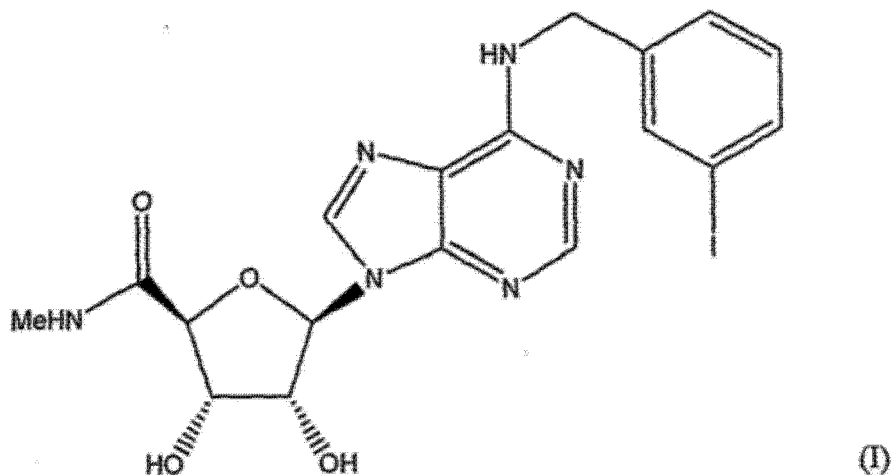
(54) 发明名称
 合成 IB-MECA 的方法

二醇保护基团。

(57) 摘要
 本披露内容提供了一种合成 IB-MECA 的方
 法。更具体而言,本披露内容提供了一种用于
 IB-MECA “良好制造生产”(Good Manufacturing
 Production) (GMP) 的简单高收率方法。本方法
 涉及 6- 卤代嘌呤-9- 核糖核苷与二醇保护剂的
 反应;在二醇受保护的 6- 卤代嘌呤中的伯醇的氧
 化;二醇受保护的 6- 卤代嘌呤与亲核试剂(例
 如,甲胺)的反应;用碘苯胺取代卤素基团和去除

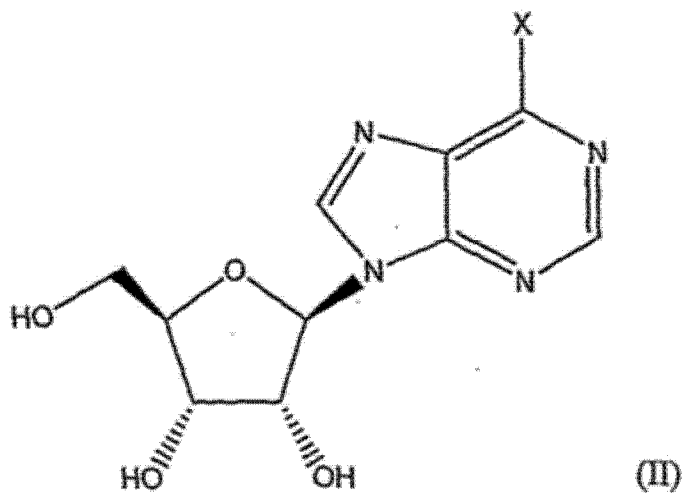
CN 101646685 B

1. 一种用于具有下式的 IB-MECA 的合成方法：

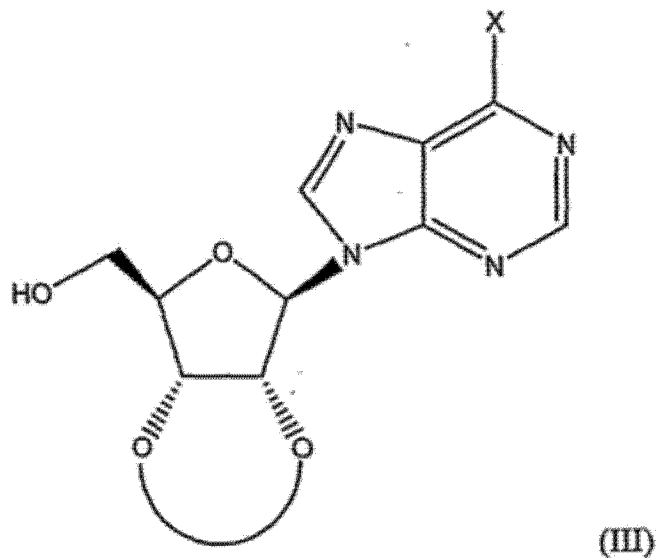


所述方法包括：

(i) 使下式 (II) 的 6- 卤代嘌呤 -9- 核糖核苷：

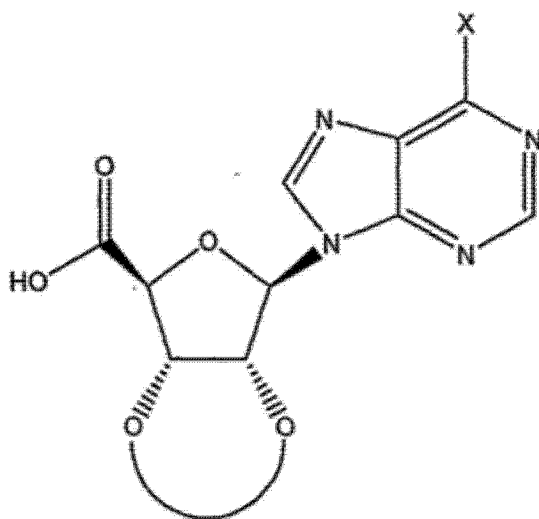


其中 X 是选自 Cl、I 或 Br 的卤素，与二醇保护剂发生反应以获得下式 (III) 的二醇受保护的 6- 卤代嘌呤：



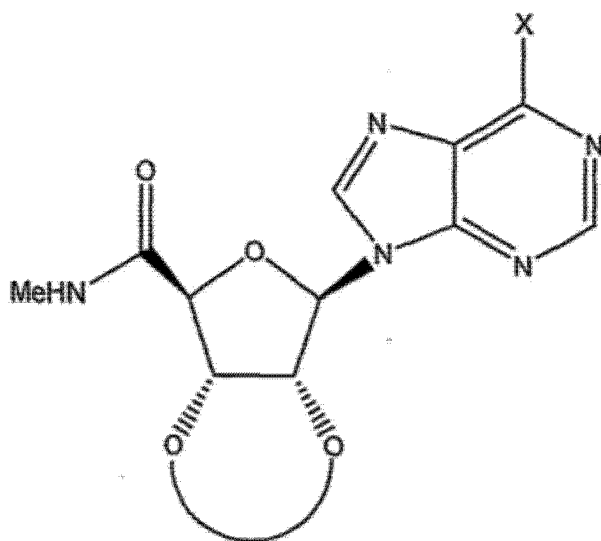
其中所述二醇保护剂包含直链或支链的 C_1 - C_6 烷基基团；

(ii) 通过加入催化量的氧化剂,将所述式 (III) 的二醇受保护的 6- 卤代嘌呤中的伯醇氧化以获得式 (IV) 的相应羧酸衍生物,所述氧化剂由高碘酸钠和三氯化钨组成:



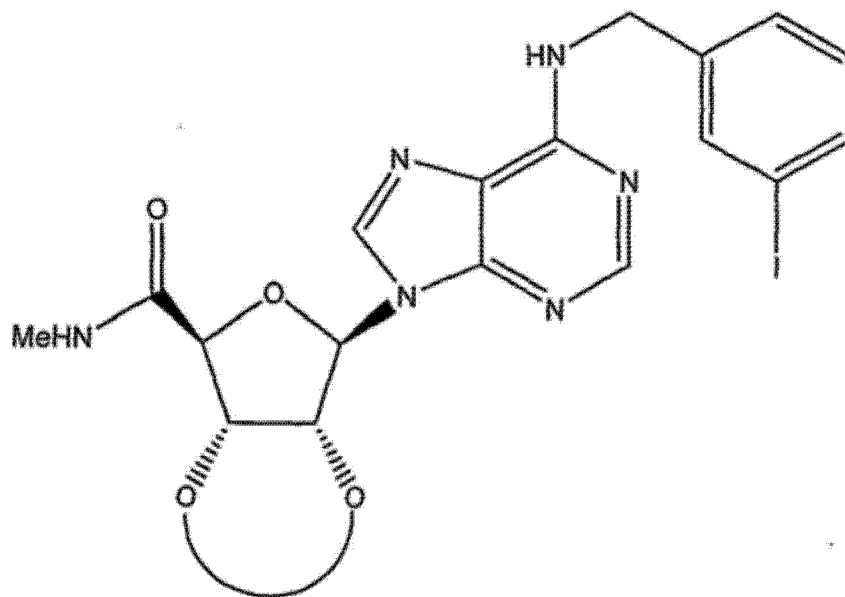
(IV) ;

(iii) 在乙腈存在下使所述式 (IV) 的衍生物的羧酸基团与 SOCl_2 反应以获得酰氯,接着在二异丙基乙胺 (DIPEA) 存在下与甲胺反应以获得所述二醇受保护的 6- 卤代嘌呤 (III) 的相应甲基酰胺衍生物,所述甲基酰胺衍生物具有式 (V) :



(V) ;

(iv) 在二异丙基乙胺 (DIPEA) 存在下用 3- 碘苄胺取代所述甲基酰胺衍生物 (V) 的卤素基团以形成具有式 (VI) 的二醇受保护的 IB-MECA :



(VI) ;

- (v) 去除二醇保护而获得所述式 (I) 的 IB-MECA。
2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述卤素是氯。
 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述保护剂是 C₃-C₆ 二烷氧基烷烃。
 4. 根据权利要求 3 所述的方法, 其中, 所述二烷氧基烷烃是 2, 2-二甲氧基丙烷。
 5. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述二醇保护是在强酸和极性有机溶剂存在下实现的。
 6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中, 所述强酸选自 p-TsOH、甲磺酸、苯磺酸、甲酸、盐酸、硫酸。
 7. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中, 所述极性有机溶剂是水混溶性溶剂。
 8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中, 所述极性有机溶剂是丙酮。
 9. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述二醇保护基团的去除是在强酸和极性非质子溶剂存在下实施的。
 10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中, 所述强酸是 HCl, 而所述溶剂是四氢呋喃 (THF)。

合成 IB-MECA 的方法

技术领域

[0001] 本发明属于化学领域,更具体而言涉及 A₃ 腺苷受体激动剂的合成。

背景技术

[0002] 腺苷是普遍存在的嘌呤核苷,其由代谢活性的受胁迫细胞胞外分泌的。腺苷是一种通过其结合到至少 4 类 G- 蛋白 - 相关的细胞表面受体 (目前分成 A₁、A_{2a}、A_{2b} 和 A₃) 的重要调节分子 [Linden B. *TIPS* 15 :298-306(1994) ;Poulsen S, *Bioorg Med Chem* 6 : 619-41(1998)]。

[0003] 几乎所有人体组织表达 1 类或多类腺苷受体,并且这以高密度包括各种肿瘤细胞 [Merighi S, et al. *Br. J. Pharmacol.* 134 :1215-1226(2001)]。A₁ 和 A₂ 受体活化引起导致激酶 PKB/Akt 和 PKA 活性降低以及 cAMP 形成减少的 G- 蛋白信号转导 ;这抑制细胞生长 [Fishman P, et al. *Oncogene* 21 :4060-4064(2002)]。

[0004] 1- 脱氧 -1-(6-[(3- 碘苄基) 甲基] 氨基) 9H- 嘌呤 -9- 基)-N- 甲基 -β -D- 呋喃核糖羧酰胺 (ribofuranuronamide) (甲基 1-[N6-(3- 碘苄基)- 腺嘌呤 -9- 基]-β -D- 依波呋喃酰胺 (ibofuranamide), IB-MECA ;MW = 510. 29Da) 是一种对 A₃ 受体具有特异性亚微摩尔效力的口服活性腺苷受体激动剂 (K_i = 0. 47M)。

[0005] 在体内,口服给药的 IB-MECA 抑制同基因 (黑素瘤,结肠癌) 和异种移植 (结肠癌和前列腺癌) 小鼠模型中的肿瘤形成 [Fishman P. et al. *Anticancer Res.* 23(3A) : 2077-2083(2003)]。

[0006] 人们已经发现,向小鼠口服给予 IB-MECA 经由粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 的增加而刺激嗜中性粒细胞的产生,并且相应地,IB-MECA 防止细胞毒性 - 诱导的骨髓中毒性 [Bar-Yehuda S, et al. *Exp. Hematol.* 30 :1390-139(2002)]。口服 IB-MECA 还抑制裸小鼠中结肠癌的进展,并在该品系中的细胞毒性药物疗法之后刺激嗜中性粒细胞恢复。

[0007] 已经积累相当多的证据表明腺苷通过其受体也在限制炎症中起重要作用。腺苷的抗炎作用通过抑制 TNF-α、白介素 -1 和白介素 -6 的产生而被证实。腺苷涉及到介导若干种抗炎药如阿司匹林、甲氨蝶呤和柳氮磺吡啶 (sulfasalazin) 的效用已经进行了描述,支持腺苷在调节炎症过程中的作用。近来的研究表明,高选择性的 A₃ 腺苷受体 (A₃AR) 激动剂 IB-MECA 在实验动物模型中抑制 TNF-α 和 MIP-1α 体外产生,同时防止胶原质和佐剂诱导的关节炎 (AIA) 形成 (WO2004/045627)。另外,已经表明,A₃AR 在 AIA 大鼠的滑液和外周血单核细胞 (PBMNC) 中高度表达,并且其水平在 IB-MECA 治疗后下调 (WO 2004/038419)。

[0008] 腺苷 A₃ 受体选择性激动剂,特别是腺嘌呤化合物尤其是 IB-MECA 的化学合成,首先由 Jacobson K. 等在美国专利 5, 773, 423 中进行了描述。

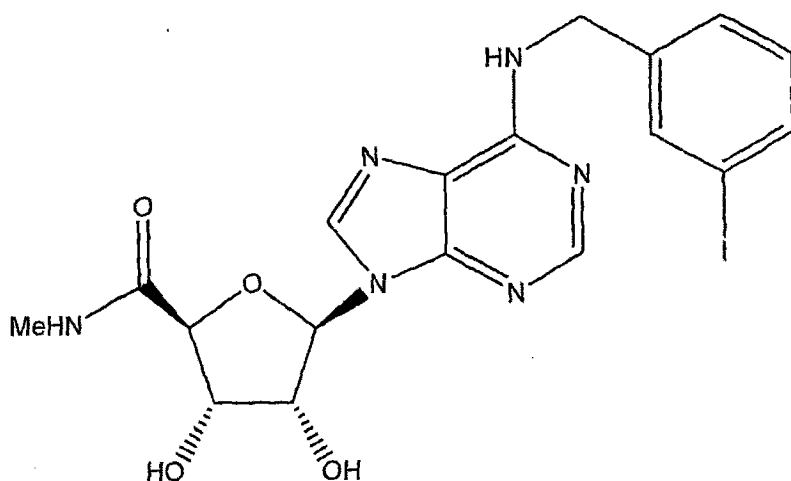
[0009] 美国专利申请公开 No. 2006/0014944 描述了用于合成核苷酸的方法。

发明内容

[0010] 根据本发明的第一方面,本发明提供了一种用于化学合成具有下式 (I) 的

IB-MECA 的方法：

[0011]

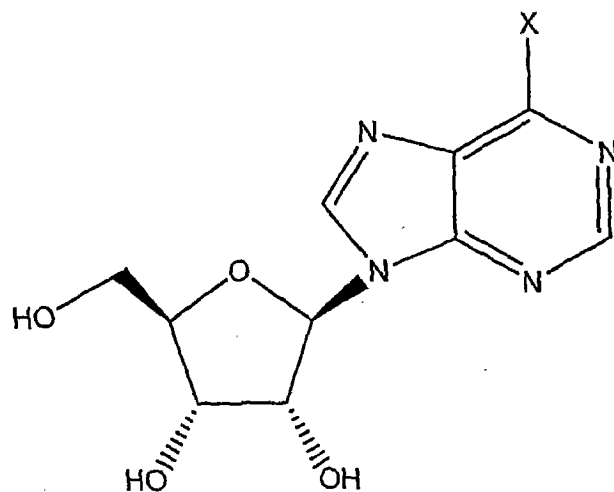


(I)

[0012] 根据本发明的该方法包括：

[0013] (i) 使下式 (II) 的 6- 卤代嘌呤 -9- 核糖核苷：

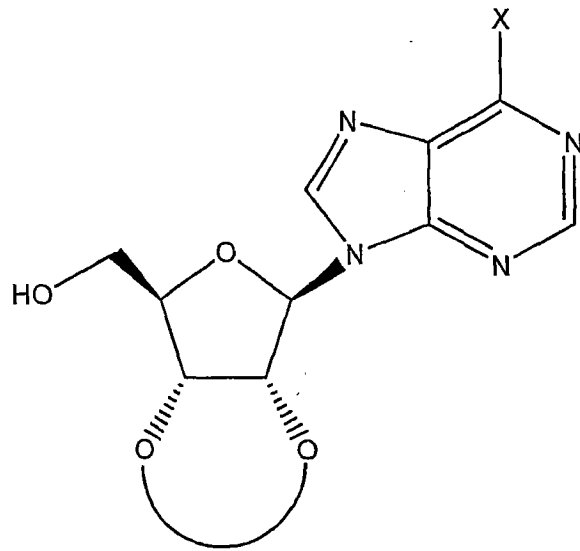
[0014]



(II)

[0015] 其中 X 是选自 Cl、I 或 Br 的卤素，与二醇保护剂反应，而获得下式 (III) 的二醇受保护的 6- 卤代嘌呤：

[0016]

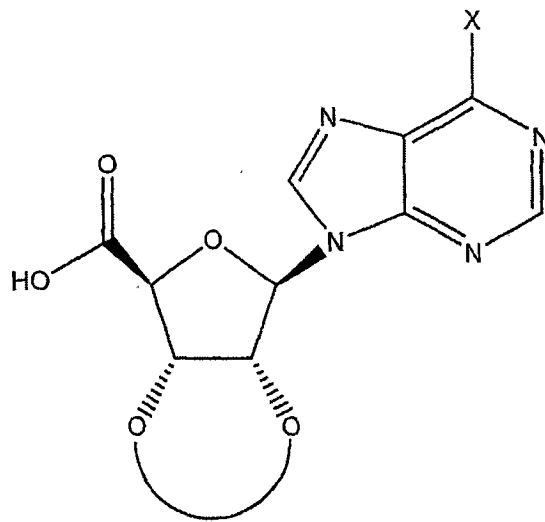


(III)

[0017] 其中所述二醇保护剂包含直链或支链的 C_1-C_6 烷基基团；

[0018] (ii) 将式 (III) 的所述二醇受保护的 6- 卤代嘌呤中的伯醇氧化成式 (IV) 的相应羧酸衍生物；

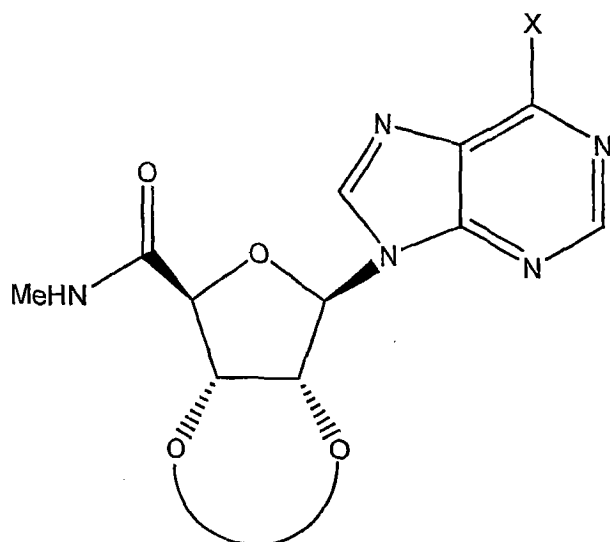
[0019]



(IV) ;

[0020] (iii) 使式 (IV) 的衍生物的羧酸基团与甲胺反应而获得二醇受保护的 6- 卤代嘌呤 (III) 的相应甲基酰胺衍生物, 该甲基酰胺衍生物具有式 (V) ;

[0021]

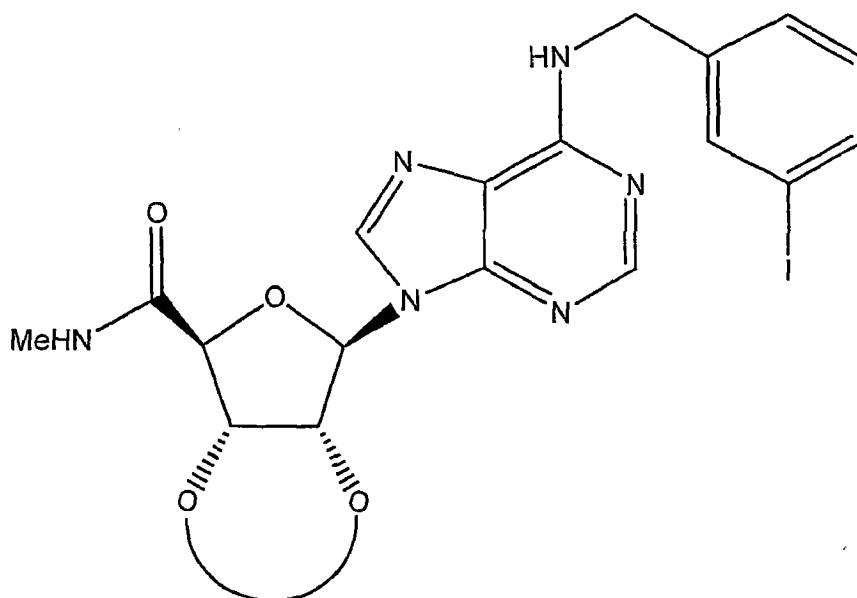


(V)

;

[0022] (iv) 用 3-碘苄胺取代所述甲基酰胺衍生物 (V) 的卤素基团而形成具有式 (VI) 的二醇受保护的 IB-MECA :

[0023]



(VI)

;

[0024] (v) 去除二醇保护而获得式 (I) 的所述 IB-MECA。

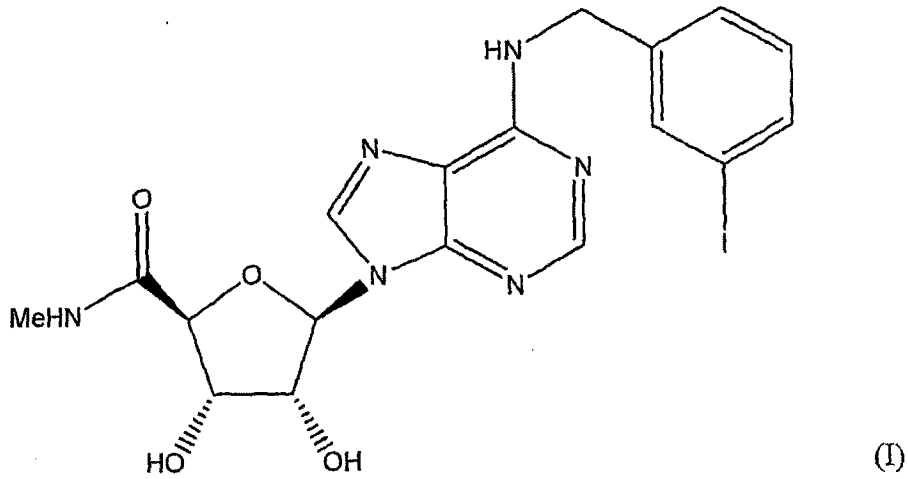
[0025] 本发明还提供了只要是通过本发明方法获得的化学合成的 IB-MECA, 以及包含所述化学合成的 IB-MECA 的药物组合物。

具体实施方式

[0026] 本发明基于用于合成 IB-MECA 的有效方法的开发, 并且发现, 这种方法也适合 IB-MECA 的当前良好制造生产 (当前良好制造品, current good manufacturing production) (cGMP)。注意到, IB-MECA 有时也由术语 CF101 指代。

[0027] 因此, 本文披露了一种用于化学合成具有下式 (I) 的 IB-MECA 的方法:

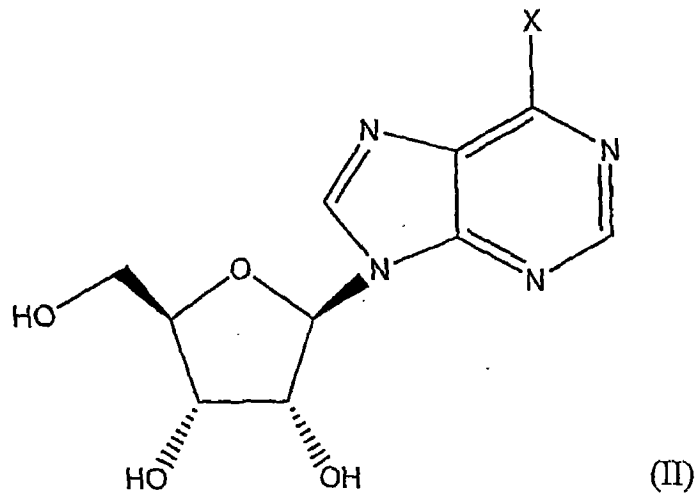
[0028]



[0029] 该方法包括：

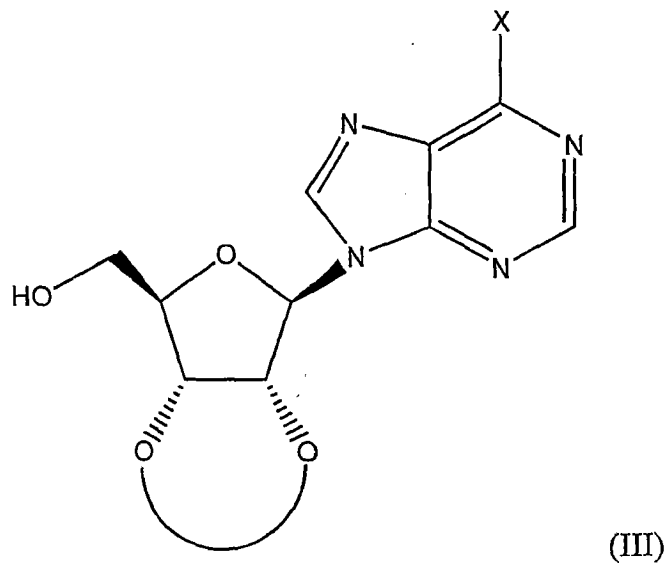
[0030] (i) 使下式 (II) 的 6- 卤代嘌呤 -9- 核糖核苷：

[0031]



[0032] 其中 X 是选自 Cl、I 或 Br 的卤素，与二醇保护剂反应，而获得下式 (III) 的二醇受保护的 6- 卤代嘌呤：

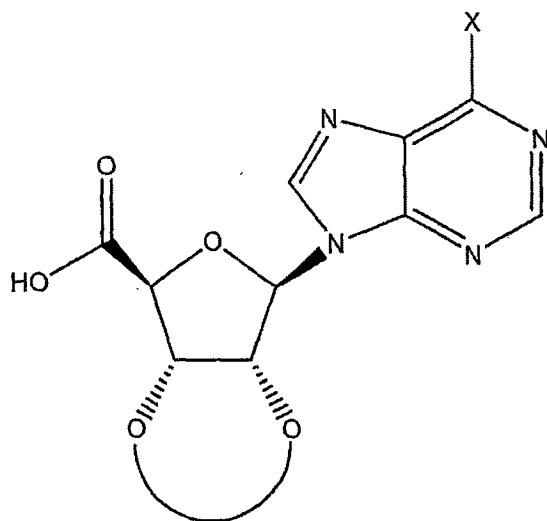
[0033]



[0034] 其中二醇保护剂包含直链或支链的 C₁-C₆ 烷基基团；

[0035] (ii) 将式 (III) 的所述二醇受保护的 6- 卤代嘌呤中的伯醇氧化成式 (IV) 的相应羧酸衍生物：

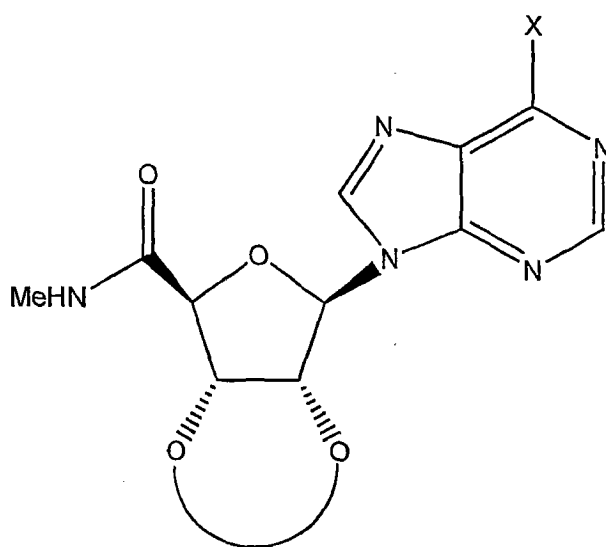
[0036]



(IV) ;

[0037] (iii) 使式 (IV) 的衍生物的羧酸基团与甲胺反应, 获得二醇受保护的 6- 卤代嘌呤 (III) 的相应甲基酰胺衍生物 (methyamidederivative), 该甲基酰胺衍生物具有式 (V) :

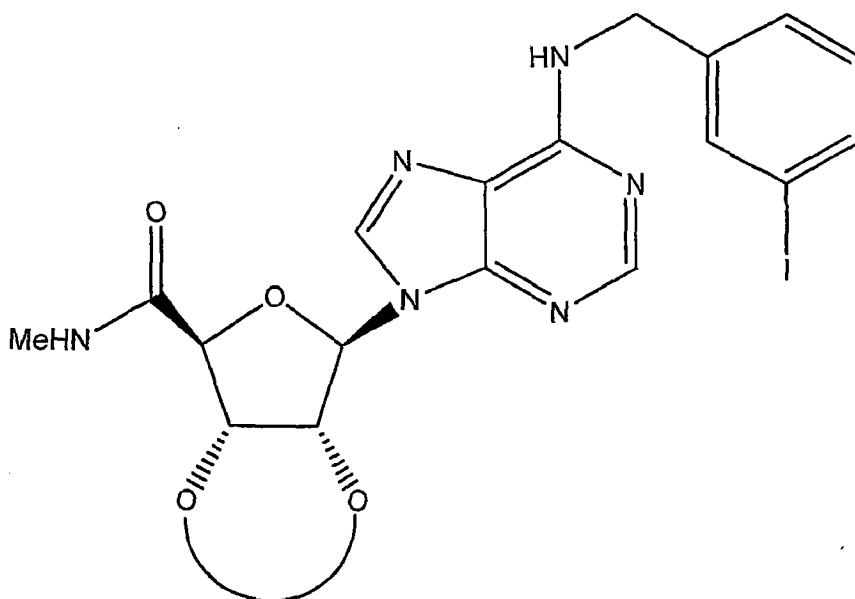
[0038]



(V) ;

[0039] (iv) 用 3- 碘苄胺取代甲基酰胺衍生物 (V) 的卤素基团而形成具有式 (VI) 的二醇受保护的 IB-MECA :

[0040]



[0041] (v) 去除二醇保护而获得式 (I) 的所述 IB-MECA。

[0042] 在本公开内容中,术语“保护剂 (protecting reagent)”用于指通过化学修饰官能团以在后续化学反应中获得化学选择性而被引入到分子中的任何化学部分。各种保护剂对有机化学领域中的技术人员来说是已知的。如本文中使用的,保护剂与底物分子的官能团发生反应而形成受保护的底物。这种受保护的底物对于该受保护底物将要经受的反应条件是稳定的,之后保护剂在与底物中存在的其它官能团相容的条件下从受保护底物是可除去的以释放出该官能团。1,2- 二醇的羟基可以单个地被保护或可以一起用环状二醇保护基团被保护。合适的羟基保护基团和二醇保护基团的实例可以在文献 T. W. Greene et al. " Protective Groups in Organic Synthesis" ,3rdEd., John Wiley and c Sons Inc. , NY(1999) 中找到,该文献结合于此作为参考。

[0043] 根据本公开内容,保护剂包含 C₁-C₆ 烷基部分。在本文中公开的一个实施方式中,二醇官能团的保护是在使包含所述二醇基团的分子与保护剂反应时实现的,例如但不限于 C₃-C₆ 二烷氧基烷烃,由此在底物分子上形成保护性的环状缩醛部分,易于采用本领域已知的合适反应条件除去。优选,该二烷氧基烷烃是二甲氧基丙烷。

[0044] 在另一实施方式中,二醇保护是在强酸和极性有机溶剂存在下实现的。强酸可以选自但不限于 p-TsOH(对甲苯磺酸)、甲磺酸、苯磺酸、甲酸、盐酸、硫酸。根据另一实施方式,极性有机溶剂可以是水混溶性溶剂。对于极性有机溶剂的非限制性实例是丙酮。其它可以包括乙酸乙酯、甲乙酮、氯仿、乙醇、甲醇等。

[0045] 本文中使用的术语“官能团”是指相对于其物理性质和它可能经历的与其它试剂发生的反应,分子中负责其物理化学特性的原子或原子团。对于各种化合物,各种官能团是已知的。根据一个实施方式,官能团是在呋喃环上存在的二醇基团。在本文所公开的一个实施方式中,“二醇”官能团是指连接到相邻碳原子上的两个羟基基团 (-OH 基团)。

[0046] 如本文中所用的,术语“氧化剂”是指在反应中获得电子并且其氧化数降低的任何物质。在典型反应中,氧化剂易于将氧原子转移到反应物例如式 (III) 的二醇受保护的 6- 卤代嘌呤,由此增加其氧原子的含量。

[0047] 在本公开内容的上下文中,可以互换使用的术语“取代反应”和“取代”,或“替代”

是指在反应物分子中的原子、部分、官能团或取代基独立地被一种反应物分子中的另一原子、部分、官能团或取代基的任何代替。

[0048] 在本公开内容的上下文中,术语“亲核取代”涉及这样的反应,其中具有非共用电子对或带负电的部分的富电子试剂(称为亲核剂)进攻底物分子带正电或部分正电的部分(例如,酰氯的羧基碳)并替代一个基团或原子(也称为“离去基团”,例如连接酰氯底物的氯阴离子)。

[0049] 在本文中公开的另一实施方式中,式(III)的二醇受保护的6-卤代嘌呤中的伯醇被氧化成对应的羧酸衍生物的氧化是在催化用量的氧化剂存在下实施的。

[0050] 可以适用于将伯醇氧化成对应羧酸的氧化剂的非限制性举例包括钌金属(Ru)、氯化钌、三氧化铬、高碘酸钠、重铬酸钾、高锰酸钾、氧化银、硝酸、氧化铂/氧、2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基(TEMPO)、亚氯酸钠以及它们的任意组合。优选地,所述氧化是在催化用量的 RuCl_3 和高碘酸钠存在下实施的。

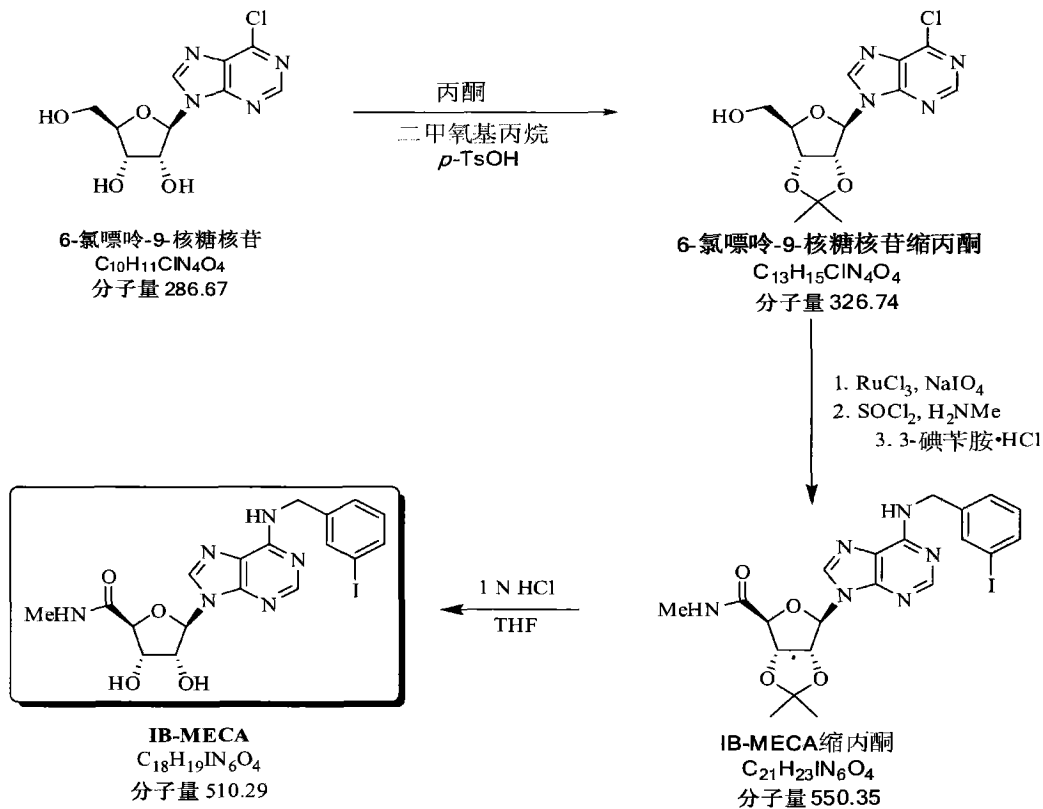
[0051] 式(IV)的羧酸衍生物向式(V)的相应甲基酰胺衍生物的转变是通过在卤化试剂存在下的亲核取代和随后引入所选亲核剂如甲胺而实施的。

[0052] 在本公开内容的上下文中提到的术语“卤化试剂”,是指能够用卤素原子取代分子中的基团或部分的试剂。在本公开内容的上下文中,卤化试剂取代羧酸部分上的羟基,由此使之更易于与甲胺亲核剂发生亲核取代反应,因为所取代的基团是卤素离子,是已知的弱路易斯碱,即易于被亲核剂取代。卤化剂的非限制性实例包括亚硫酸二氯(SOCl_2)、五氯化磷(PCl_5)。优选卤化试剂是亚硫酸二氯。

[0053] 最后,去除呋喃环的二醇部分上的保护基团。典型地且不受限于理论,保护基团的去除是还原性裂解反应,是在强酸存在下进行的。二醇保护基团的去除是在强酸和极性非质子溶剂存在下实施的。根据一个实施方式,强酸是HCl而溶剂是四氢呋喃(THF)。本领域已知的其它极性非质子溶剂也可以在反应过程的这个阶段使用,包括但不限于二甲基亚砜(DMSO)、二甲基甲酰胺(DMF)、二氧六环和六甲基磷酰三胺(HMPA)。

[0054] 在一个实施方式中,生产IB-MECA的方法根据以下方案获得:

[0055]



[0056] 本发明方法的一个优点在于其也可用于大规模生产 IB-MECA。

[0057] 在本公开内容的上下文中,大规模生产是指从几十克到几千克量的最终产品材料。如具体实施例中所示,不需要中间纯化的过程。正如本领域技术人员所理解的那样,中间纯化步骤导致最终产品收率降低,因此一般而言是不适合大规模生产的。本发明的方法既适合小规模生产 IB-MECA,也适合大规模生产 IB-MECA。

[0058] 而且,已经建立了,本发明的方法适合于 IB-MECA 的“良好制造生产”(Good Manufacturing Production) (GMP)。众所周知,GMP 是指用于生产药物物质(也称为活性药成分(API))和药物产品(在欧洲称为医药产品)、医疗器械、体内和体外诊断产品以及食品的一套法规、法律和准则。在美国,GMP 称之为“cGMP”或“现行良好制造规范”(current Good Manufacturing Practices)。该术语对于药物产品生产和质量控制检验的控制和管理被全球认可。

[0059] 在本公开内容的另一方面,提供了一种只要是通过本发明任何方法获得的化学合成的式(I) IB-MECA。

[0060] 在本公开内容的另一实施方式中,提供了一种包含只要是通过本发明方法获得的化学合成的式(I) IB-MECA 的药物组合物。

[0061] 本发明的药物组合物可以用于治疗或预防各种疾病。术语“治疗”等在本文中用来指获得所需的药理学和生理学效果。这种效果可以是根据预防或部分预防疾病、其症状或病症的预防性作用和/或可以根据部分或完全治愈一种疾病、归因于该疾病的病症、症状或有害影响的治疗性作用。如本文中所用的,术语“治疗”涵盖了哺乳动物尤其是人类的疾病的任何治疗作用,并且包括:(a) 预防疾病在主体中发生,该主体可能对该疾病预处置但还没有诊断患有该疾病,即,使该疾病的临床症状不会在可能对疾病进行预处置但还没有患有或显示该疾病症状的主体中形成;(b) 抑制疾病,即阻止或降低疾病或其临床症状

的形成 ;或 (c) 缓解疾病,即使疾病和 / 或其症状或病症消退。

[0062] 通过本发明组合物可治疗的疾病的非限制性举例包括发炎,如 WO 2004/045627、WO 2005/063246、WO/2005/111053 和 WO2006/059328 中所一般描述的 ;癌症,如 WO2000/040251 和美国临时专利申请 No. 60/838,863 中一般描述的 ;干眼 (dry eye), 如 PCT 专利申请 No. IL2006/000130、WO2006/011130 和美国专利申请 No. 11/604,905 中一般描述的 ;病毒复制,如 W002/055085 中一般描述的 ;骨关节炎,如 PCT 专利申请 No. IL2006/001374 一般描述的 ;以及如 WO 2006/048884 中一般描述的加速骨质吸收 (boneresorption) ;以上所有申请的内容结合于此作为参考。

[0063] 实施例

[0064] 原料

[0065] 6- 氯嘌呤 -9- 核糖 (获自 Wilshire Technologies)

[0066] p-TsOH H₂O (获自 Aldrich)

[0067] 2,2- 二甲氧基丙烷 (获自 Aldrich)

[0068] 氯化钨 (III) 水合物 (获自 Aldrich)

[0069] 3- 碘苄胺 HCl (获自 Apollo)

[0070] TBAI (获自 Aldrich)

[0071] CH₃CN (获自 Fisher)

[0072] H₂NCH₃ (获自 Aldrich)

[0073] SOCl₂ (获自 Aldrich)

[0074] NaIO₄ (获自 Aldrich)

[0075] 方法

[0076] 实施例 1 :IB-MECA 的合成

[0077] 1. 缩丙酮 (丙酮叉, acetone) (III) 的制备

[0078] 6- 氯嘌呤 -9- 核糖缩丙酮 (III) 由商购获得的 6- 氯嘌呤 -9- 核糖 (II) 通过用 2,2- 二甲氧基丙烷在催化作用的对甲苯磺酸存在下进行处理而制备。

[0079] 核糖核苷 (II) 转化成缩丙酮 (III) 在 20 ~ 25°C 下需要约 48h 才能达到反应完全。所用的操作以下进行概述,并且涉及到用氢氧化钠水溶液淬灭反应,浓缩混合物至干,接着混合物水溶液萃取到二氯甲烷中。然后通过硫酸镁干燥、过滤以除去干燥剂,通过溶剂交换而进入乙腈中以沉淀产物,通过过滤收集并在真空下干燥而分离出缩丙酮 (III)。通过浓缩母液和从乙腈中的料浆分离而获得第二份缩丙酮 (III)。从 6- 氯嘌呤 -9- 核糖 (II) 的缩丙酮 (III) 的 (两次) 合并后的收率为 85.7%。

[0080] 以下是制备缩丙酮 (III) 所实施的合成步骤的概述 (所有的试剂、重量和体积当量都是相对于所加入的 6- 氯 -9- 核糖核苷 (II) 提供的) :

[0081] - 式 II 的核糖核苷 (1wt 当量) 加入到丙酮 (23 体积) 中并开始搅拌反应混合物。

[0082] - 然后向反应混合物中加入 TsOH (0.05 当量) 和 2,2- 二甲氧基丙烷 (3.5 当量)。

[0083] - 在 20 ~ 25°C 下反应混合物搅拌 48 ~ 96h, 在此期间取样通过 HPLC 检测反应是否完全。当核糖核苷 (II) 不超过 (NMT) 2% 时确定为完全条件。

[0084] - 然后通过加入 1N NaOH (0.052 当量) 并搅拌 1h 淬灭反应。

[0085] - 所得混合物然后采用在 30 ~ 40°C 下旋转蒸发进行干燥。

- [0086] - 所得残余物然后在 CH_2Cl_2 (10 体积) 和水 (10 体积) 之间分配, 搅拌 15min 并静置。
- [0087] - 实施相分离, 并且水相用 CH_2Cl_2 (2×3 体积) 萃取。
- [0088] - 合并有机萃取物, 并在 MgSO_4 (2.5wt 当量) 上干燥。
- [0089] - 通过硅藻土垫过滤萃取物的混合物而滤饼用 CH_2Cl_2 (1.5 体积) 冲洗。
- [0090] - 滤液通过 30 ~ 40°C 的旋转蒸发浓缩至干。
- [0091] - 使残余物在 CH_3CN (2 体积) 中于 55 ~ 65°C 下成浆料 1h。
- [0092] - 浆料冷却至 0 ~ 10°C, 然后在 0 ~ 10°C 下陈化至少 1h。
- [0093] - 然后产物通过过滤并用冷 CH_3CN (0.5 体积) 冲洗所得的滤饼而收集。
- [0094] - 产物 (滤饼) 在 25 ~ 35°C 下干燥而得到式 (III) 的缩丙酮 (第一批产物)。预计收率为 59% ~ 76%; 纯度为 96.6 ~ 99.5%。
- [0095] - 为了提高收率, 母液回收以获得第二批产物:
- [0096] - 由第二批产物将滤液浓缩至干。
- [0097] - 使残余物在 CH_3CN (1.5 体积) 中于 55 ~ 65°C 下成浆料至少 30min。
- [0098] - 产物冷却至 0 ~ 10°C, 然后在 0°C 下陈化至少 1h。
- [0099] - 然后产物通过过滤并用冷 CH_3CN (0.03 体积) 冲洗后收集产物 (滤饼)。
- [0100] - 产物在 25 ~ 35°C 下干燥而得到式 (III) 的缩丙酮 (第二批产物)。预计收率为 9% ~ 14%; 纯度为 96.2 ~ 97.8%。
- [0101] 由两批产物的预期收率为 73% ~ 85%。
- [0102] 1.1 用于缩丙酮 (III) 制备的工艺优化
- [0103] 采用已经建立的条件 (以上概述中的步骤 1 ~ 3), 式 (II) 的核糖核苷 (30g) 与 2,2-二甲氧基丙烷进行反应而得以在丙酮中的溶液形式获得缩丙酮 (III)。混合物用 1N 氢氧化钠水溶液淬灭中止反应 (以上概述中步骤 4) 并分成多个部分。
- [0104] 1.2 从水中分离缩丙酮 (III)
- [0105] 以上的丙酮溶液通过在减压条件下的旋转蒸发而浓缩到 9 体积, 然后用水 (27 体积) 稀释并机械搅拌 20min。物料温度从 23°C 升高到 28°C, 并观察到一些沉淀。混合物冷却至 4°C, 并在 3 ~ 5°C 下陈化 1h。可以观察到作为精细结晶固体的物料沉淀。通过过滤收集沉淀, 用水 - 丙酮 (2 : 1, 1.5 体积) 冲洗并在真空 (30in. Hg) 室温下干燥而获得浅黄色固体状的缩丙酮 (III), 收率 68% 而纯度 98.8% (AUC, HPLC)。
- [0106] 为了提高缩丙酮 (III) 的收率, 其分离过程从更浓的丙酮 / 水混合物实施。因此, 丙酮溶液浓缩到 9 体积, 如上所述, 然后用水 (9 体积) 稀释并搅拌 10min。混合物进一步浓缩至 12.5 体积 (估计丙酮 - 水比率为 2.6 : 1), 并且产物沉淀成精细晶体物质。混合物搅拌冷却至 5°C, 陈化 30min, 然后通过过滤收集产物, 用水 - 丙酮 (2 : 1, 1.5 体积) 冲洗并在室温、真空下干燥而获得浅黄色固体状的缩丙酮 (III), 收率 80% 而纯度 99.3% (AUC, HPLC)。采用该方法, 缩丙酮 (III) 的收率和纯度都得以提高。
- [0107] 1.3 从乙腈中分离缩丙酮 (III)
- [0108] 丙酮溶液在减压下浓缩至 6 体积, 并从淬灭的反应混合物沉淀产物。需要乙腈 (15 体积) 以溶解块状的固体。混合物澄清, 滤液通过减压下旋转蒸发至 3 体积。所得的浆料在 60°C (浴温) 下搅拌 1h。然后冷却至 5°C 并陈化 1h。通过过滤收集产物, 用水 - 丙酮

(2 : 1, 1.5 体积) 冲洗并在室温、真空下干燥而获得浅黄色固体状的缩丙酮 2, 收率 65% 而纯度 98.5% (AUC, HPLC)。

[0109] 这些实验清楚表明, 相比于丙酮, 缩丙酮 (III) 在水和乙腈中是相对不可溶的。通过从水 / 丙酮中分离缩丙酮 (III) 获得了最佳结果。采用以上描述的改变, 重复反应, 而由核糖核苷 (II) (30g) 制备的缩丙酮 (III) 收率为 79% (27.1g), 并且纯度为 99.54% (AUC, HPLC)。优化的反应条件容许去除液 - 液萃取步骤、两次蒸发至干步骤和对分离缩丙酮 (III) 的第二批产物的需要。工作程序的效率提高显著减少了用于分离缩丙酮 (III) 的周期。

[0110] 2. 用于制备羧酸 (IV) 的工艺

[0111] 2.1 合成过程

[0112] 缩丙酮 (III) 通过采用在含水乙腈中的三氯化钌 / 高碘酸钠体系的氧化而转化成羧酸 (IV)。该反应放热, 一旦加入高碘酸钠就相对迅速地从 5°C 升温到 31°C。

[0113] 以下是制备羧酸 (IV) 合成步骤的概述:

[0114] 1. 式 III 的缩丙酮 (1wt 当量) 和乙腈 (14.9 体积) 置于反应器中。

[0115] 2. 另外, 向反应器中加入 RuCl_3 (0.01wt, 1.6mol%), 然后加入水 (4 体积)。

[0116] 3. 然后, 将四丁基碘化铵 (TBAI) 加入到反应器中 (0.01wt, 1mol%)。

[0117] 4. 所获得的混合物冷却至 $< 5^\circ\text{C}$ 。

[0118] 5. 向冷却的反应混合物中以逐份的方式加入 NaIO_4 (1.5wt, 2 当量), 维持混合物温度 $< 30^\circ\text{C}$ 。

[0119] 6. 混合物在 $15 \sim 30^\circ\text{C}$ 下进行搅拌, 并通过 TLC 监控反应是否完全。

[0120] 7. 过滤反应产物以除去无机物并用乙腈 (6 体积) 漂洗滤饼。

[0121] 8. 滤液于 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ (浴温) 在旋转蒸发器上下浓缩至干。在这个阶段, 通过蒸发挥发性的 RuO_4 对产物脱色。

[0122] 9. 残余物在 THF (1.67 体积) 中于 $15 \sim 25^\circ\text{C}$ 下制成浆料并从旋转蒸发器球形瓶转移到干净的反应器中。

[0123] 10. 向干净的反应器中加入 THF (18.5 体积) 并搅拌 30min。

[0124] 11. 然后步骤 10 的产物通过 DE 垫过滤, 滤饼用 THF (0.66 体积) 漂洗。

[0125] 12. 滤液通过在 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 下旋转蒸发而浓缩至干。

[0126] 13. 残余物在 CH_3CN (2.33 体积) 中于 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 下制成浆料直至充分可以流动。

[0127] 14. 步骤 13 的产物然后通过于 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 下旋转蒸发浓缩至干。

[0128] 15. 经由旋转蒸发器球形瓶多份地加入 IPAc (乙酸异丙酯) (17.5 体积), 并将反应产物转移到反应器中。

[0129] 16. 向反应器中也加入水 (5 体积) 并将反应器中的混合物搅拌 2h。

[0130] 17. 实施相分离并用水 (5 体积) 冲洗有机相。

[0131] 18. 合并水相并用 IPAc (3 体积) 反萃取。

[0132] 19. 合并有机相并在 Na_2SO_4 (1.67wt 当量) 上干燥 1h。

[0133] 20. 过滤产物以除去干燥剂并且滤液 (滤饼) 用 IPAc (2 体积) 漂洗。

[0134] 21. 然后收集滤液并通过旋转蒸发 ($30 \sim 40^\circ\text{C}$) 至干。

[0135] 22. 然后残余物在真空炉于 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 下干燥至恒重。固体碾成粉末并继续干燥

直至恒重。预期收率为 85%，预期纯度为 92%~93% (HPLC)。

[0136] 2.1 用于羧酸 (IV) 的工作优化

[0137] 从物料中取出样品，冷却到 6℃，形成非常稠的浆料。加入乙腈 (4 体积)，其溶解大多数固体物质，并将混合物再次浓缩至 4 体积。在降温到 6℃后，并保持 1h，样品形成良好性能的浆料。通过过滤收集产物，用水冲洗并干燥而获得灰白色固体状酸 3，纯度 95.3% (AUC, HPLC)。

[0138] 反应混合物的剩余物按照以上描述的过程进行处理而获得含 7.0wt% IPAc 的羧酸 (IV)，收率为 77%。并将这与先前制备的 85%收率的含 7.4wt% (IPAc) 的缩丙酮 (III) 的 cGMP 结果进行比较。

[0139] 重复氧化反应，并按照对以上样品进行的描述通过从水 / 乙腈中结晶分离出羧酸 (IV)。在这种情况下，反应混合物在初始乙腈 / 水汽提 (以上概述中的步骤 8) 期间不会脱色，并且分离出的羧酸 (IV) 呈灰色固体，收率 78%，纯度 97.9% (AUC, HPLC)。这种“非脱色”行为 (暂时性地归属为在 25℃下发生了氧化反应)，在制备 IB-MECA 先前 cGMP 物料期间观察到并且不会影响所生产的 API 的质量。Karl Fischer 分析表明该物料含有 0.19% 的水。

[0140] 2.2 在羧酸 (IV) 制备中延迟放热的控制

[0141] 缩丙酮 (III) 的氧化在加入高碘酸钠之后伴随着延迟放热。主动冷却的中断导致物料从 5℃迅速升温到 30℃。这就产生了一个严重的安全隐患，尤其是到时候一旦放大规模到固定生产设备是更是如此。

[0142] 为了更好地控制放热，实行将底物 (缩丙酮 (III)) 反加到三氯化钨和高碘酸钠的混合物中。缩丙酮 (III) (5g) 在作为在乙腈 - 水中的溶液在 2h 内加入到在 30~35℃水中的氧化剂混合物中。按照通常添加模式的定期观察，16h 后反应完全。采用改进的工艺方法条件但冷却到 20℃代替 5℃，酸 3 为白色固体，收率 62%，纯度 99.3% (AUC, HPLC)。第二批物料通过进一步发生结晶的母液过滤分离，用水冲洗并干燥，而获得灰白色固体状的酸 3，收率 19%，纯度 98.2% (AUC, HPLC)。两批酸 3 合并收率为 81%。两批产物都适合在下一步骤中使用 (即制备 IB-MECA 缩丙酮 (VI))。

[0143] 2.3 羧酸 (IV) 的条件的优化

[0144] 采用将底物反加入氧化混合物中而使缩丙酮 (III) (25g) 转化成羧酸 (IV)。当氧化反应完成时，过滤物料以除去无机杂质，滤饼用乙腈 (6 体积) 冲洗。滤液用另外的水 (3 体积) 稀释而得到羧酸 (IV) 在乙腈 (约 21 体积) 和水 (约 7 体积) 中的溶液。该物料在 26~36℃下真空蒸馏而浓缩至 8 体积。在这时估计乙腈 - 水比率分别为 40 : 60。将该物料冷却至 5~10℃以诱导结晶，并陈化 1h。产物通过过滤收集，用水冲洗并干燥，而获得白色固体状的酸 3，收率 75%，纯度 99.75% (AUC, HPLC)。

[0145] 该优化的工艺消除了对于使用 THF 和 IPAc 的萃取工作、一个过滤步骤和四个蒸发至干的需要，分离羧酸 (IV) 的周期显著缩短，并且产物也以易于处理的形式分离出来。当进行 IPAc 含量修正时，对于现有和新开发的过程，这些收率是相当的 (分别是 77%对 75%)，而羧酸 (IV) 通过从乙腈 - 水中结晶以更高纯度 (97.9%~99.7%) 分离。

[0146] 3. 制备 IB-MECA 缩丙酮 (VI) 的工艺

[0147] 羧酸 (IV) 按照以下概述的三个步骤转化成 IB-MECA 缩丙酮 (VI)。羧酸 (IV) 通过

在乙腈中用亚硫酸二氯处理首先转化成酰氯,然后通过二异丙基乙胺 (DIPEA) 存在下与甲胺反应而生成酰胺 (V)。酰胺 (V) 与 3-碘苄胺盐酸盐偶合而得到 IB-MECA 缩丙酮 (VI)。中间体酰氯和酰胺 (V) 不需要进行分离。

[0148] 3. 13-碘苄胺盐酸盐的纯化

[0149] 3-碘苄胺盐酸盐的质量显著地影响合成结果。具体而言,3-溴苄胺盐酸盐,是存在于 3-碘苄胺盐酸盐中的杂质,和由此衍生的杂质,已知将会持续到包括 API 的下游处理期间。对于在 3-碘苄胺盐酸盐中确立 3-溴苄胺盐酸盐 $\leq 0.5\%$ 的上限,不影响成功制备 IB-MECA。由于 3-碘苄胺盐酸盐的合适商业供应对于优化工而言是不可利用的,所以需要研究纯化方法。

[0150] 采用在合成 IB-MECA 中使用的溶剂对 3-碘苄胺盐酸盐进行溶解性研究,其结果概述于下表 1 中。从质子溶剂中重结晶的 3-碘苄胺盐酸盐但在非质子有机溶剂中是不溶性的。在非质子有机溶剂中热(回流)浆料期间,没有观察到纯度提高。

[0151] 表 1- 对 3-碘苄胺盐酸盐的溶解性研究

[0152]	溶剂	溶剂体积	21°C 下的行为	回流下的行为	注释
[0153]	1 MeOH	1	不溶	可溶	重结晶,纯度未提高
[0154]	2 MeCN	5	不溶	不溶	热浆料没有提高纯度
[0155]	3 IPAc	10	不溶	不溶	热浆料没有提高纯度
[0156]	4 IPA	10	不溶	可溶	重结晶,纯度未提高
[0157]	5 THF	10	不溶	不溶	热浆料没有提高纯度

[0158] 从水(4 体积)中重结晶将 3-碘苄胺盐酸盐中的 3-溴苄胺盐酸盐含量降低到可接受的水平。为了产生用于保证计划运行中的供应,3-碘苄胺盐酸盐(150g, ex. Apin) 从水中重结晶,收率 78.6%。3-溴苄胺盐酸盐浓度由 0.92%降低到 0.38%。

[0159] 采用修改后的条件制备的一批羧酸 (IV),利用以下所概述的过程转化成 IB-MECA 缩丙酮 (VI)。所有的试剂、重量和体积当量都是相对于加入的羧酸 (IV) 提供的。

[0160] 1. 式 (IV) 羧酸衍生物(1wt 当量)与乙腈(10 体积)混合而形成浓厚浆料,并在 20 ~ 25°C 下搅拌该浓厚浆料;

[0161] 2. 向搅拌的料浆中加入卤化剂,即亚硫酸二氯(1.6 当量),并且混合物至少搅拌 1h 以形成溶液;

[0162] 3. 通过以 IPAc-MeOH(10 : 1) 洗脱的 TLC 监控反应是否完全。

[0163] 4. 反应溶液通过在 20°C (浴温) 旋转蒸发浓缩成油状物(以除去亚硫酸二氯);

[0164] - 加入乙腈(0.5 体积)并将该混合物再次浓缩成油状物。该油状物中含有浓酰氯。

[0165] 5. 酰氯再溶于乙腈(10.4 体积)并冷却至 $< 2^{\circ}\text{C}$ 同时进行搅拌。

[0166] 6. 加入甲胺(2M 的 THF 溶液,1.05 当量),并且混合物温度维持 $< 5^{\circ}\text{C}$ 。在反应器中观察到白色沉淀(怀疑是甲胺盐酸盐)。

[0167] 7. 产物在 $< 5^{\circ}\text{C}$ 下搅拌至少 15min。

[0168] 8. 然后加入 DIPEA(1.5 当量),并将该体系的温度维持在 $< 5^{\circ}\text{C}$ 下。

[0169] 9. 主动冷却是间断的,并且允许反应混合物在约 2h 内升温到 20°C。

[0170] 10. 反应通过用 IPAc-MeOH(10 : 1) 洗脱的 TLC 监控。当反应完全时,获得酰胺

(V) 的 MeCN/THF 溶液。

[0171] 11. 向酰胺 (V) 的溶液中加入 3-碘苄胺盐酸盐 (1.35 当量), 随后加入 DIPEA (5.0 当量)。

[0172] 12. 混合物加热到 70°C, 并通过 HPLC 监控反应是否完成。预计反应时间为 14 ~ 16h, 并且反应完完成的条件是剩余酰胺 (V) $\leq 0.7\%$ 。

[0173] 13. 当反应完成时, 产物冷却到 $< 40^\circ\text{C}$, 并通过旋转蒸发浓缩成油状物。在此时尤其应避免起泡。

[0174] 14. 然后将残余物溶解于 IPAc (8 体积)。

[0175] 15. 向溶解的残余物中加入饱和 NaHCO_3 水溶液 (7 体积), 混合物搅拌至少 30min。

[0176] 16. 然后停止搅拌, 静置, 并进行相分离。

[0177] 17. 有机相用水 (4 体积) 冲洗。

[0178] 18. 合并的水相用 IPAc (2×3.4 体积) 反萃取。

[0179] 19. 合并有机萃取物, 并通过旋转蒸发浓缩成残余物。

[0180] 20. 然后产物在 MeOH (4 体积) 中调成浆料, 随后通过旋转蒸发浓缩成残余物。

[0181] 21. 然后向步骤 20 的产物中加入 MeOH (4 体积), 并在搅拌下加热至溶解 (约 65°C)。

[0182] 22. 步骤 21 的产物然后冷却至 $< 30^\circ\text{C}$ 由诱导结晶。

[0183] 23. 结晶产物然后通过过滤收集, 而滤饼用冷 (13°C) 的 MeOH (1.8 体积) 冲洗。

[0184] 24. 滤饼在 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 真空下干燥而获得 IB-MECA 缩丙酮 (VI)。

[0185] 25. 根据需要, 重复从 MeOH 的重结晶和干燥以获得本说明书中的 IB-MECA 缩丙酮 (VI)。预期收率 48%。

[0186] 从甲醇中单次重结晶后, 分离出呈白色固体状的 IB-MECA 缩丙酮 (VI), 收率 80%, 纯度 99.52% (AUC, HPLC)。所观察到来源于 3-溴苄胺盐酸盐的杂质浓度为 0.21% (规定: $\leq 0.5\%$), 并且所有其它杂质 $< 0.1\%$ 。这些结果证实, 用于制备缩丙酮 (III) 和羧酸 (IV) 的改进生产的物料适用于制备 IB-MECA 缩丙酮 (VI)。它们也间接表明, 使用更高质量的酸 3 (98.2% ~ 99.3% 的纯度, 先前是 92% ~ 93%), 无需多次重结晶就能制备非常高纯度的 IB-MECA 缩丙酮 (VI)。HPLC 数据也表明, 酰胺 (V) 能够在 IB-MECA 缩丙酮 (VI) 分离期间从高达 2.3% 的 IPC 浓缩液中成功地吹洗出。

[0187] 4. 制备 IB-MECA (I) 的工艺

[0188] IB-MECA (I) 利用盐酸水溶液通过 IB-MECA 缩丙酮 (VI) 去保护而制备。

[0189] 以上 IB-MECA 缩丙酮 (VI) 物料采用以下概述的方法步骤 (步骤 1 ~ 10) 去保护, 而获得白色固体状的 IB-MCA (I), 收率 90%, 纯度 99.67% (AUC, HPLC)。来源于 3-溴苄胺盐酸盐的杂质浓度为 0.18%, 并且没有浓度 $> 0.1\%$ 的其它杂质。

[0190] 1. 向反应器中加入 IB-MECA 缩丙酮 (VI) (1wt 当量) 和 THF (5 体积)。

[0191] 2. 开始搅拌, 接着加入 1N 盐酸 (5 体积)。混合物从 16°C 升温至 25°C 。

[0192] 3. 然后, 混合物主动加热至 50°C , 并通过 HPLC 监控反应是否完全。反应完全的条件是: 剩余缩丙酮 $\leq 1.5\%$ 。预期反应时间为 8h。如果 8h 后反应不完全, 则将物料温度降至 40°C , 以避免生成杂质。

[0193] 4. 产物在 40°C 下过滤。

[0194] 5. 然后,过滤的产物冷却到至少 15℃,然后在维持温度在 10 ~ 25℃ 的饱和 NaHCO₃(15 体积)中淬灭。与碱接触则产物发生沉淀。

[0195] 6. 混合物在 10 ~ 25℃ 下搅拌至少 12h。

[0196] 7. 通过过滤收集固体并将滤饼用 H₂O(5×0.95 体积)冲洗。

[0197] 8. 冲洗后的产物然后在甲醇-水(9 : 1,9.9 体积)中于 50℃ 下调成浆料至少 30min,然后冷却至 15 ~ 25℃。

[0198] 9. 通过过滤收集产物,并将滤饼用甲醇-水(9 : 1,0.27 体积)冲洗。

[0199] 10. 产物在 30 ~ 40℃ 下真空干燥而获得 IB-MECA(I),预期收率为 81%。

[0200] 11. 产物再在水(4.14 体积)中在 35 ~ 45℃ 下调成浆料至少 3h。

[0201] 12. 再次调成浆料的产物然后冷却到 25℃,然后通过过滤收集。

[0202] 13. 滤饼用水(2×1 体积)冲洗。

[0203] 14. 滤饼然后在 55-65℃ 下干燥而获得 IB-MECA(I)。预期回收率 78%。

[0204] 实施例 2 :IB-MECA(I) 大规模合成的概念验证 (proof-of-concept)

[0205] 为了证实对于从 6-氯嘌呤-9-核糖核苷(II)合成 IB-MECA(I) 而开发的优化条件,实施以上过程以制备 50g IB-MECA(I)。因此,利用以下描述的方法将 6-氯嘌呤-9-核糖核苷(II)转化成缩丙酮(III)。所有的试剂、重量和体积当量都是相对于加入的核糖核苷提供的。

[0206] 制备缩丙酮(III)的优化方法

[0207] 1. 向反应器中加入核糖核苷(II)(1wt 当量),随后加入丙酮(23 体积)并搅拌。

[0208] 2. 然后,向反应器中加入对甲苯磺酸(TsOH)(0.05 当量)并随后加入 2,2-二甲氧基丙烷(3.5 当量)。

[0209] 3. 混合物在 20 ~ 25℃ 下搅拌 48 ~ 96h 并通过 HPLC 检验反应是否完全。反应完全的条件是:核糖核苷 NMT 2%。

[0210] 4. 通过加入 1N NaOH(0.052 当量)并搅拌 1h 使反应淬灭。

[0211] 5. 产物通过旋转蒸发(30 ~ 40℃)而浓缩至 9 体积。

[0212] 6. 然后加入水(9 体积)。

[0213] 7. 然后通过旋转蒸发(30 ~ 40℃)将产物浓缩至 12.5 体积。

[0214] 8. 混合物冷却至 0 ~ 5℃;并在 0 ~ 5℃ 下维持至少 1h。

[0215] 9. 通过吸滤收集产物,接着用冷(0 ~ 5℃)H₂O/丙酮(2 : 1,1.5 体积)漂洗。

[0216] 10. 然后产物在 40℃ 下干燥而获得缩丙酮(III)。预期收率为 79%。

[0217] 作为淡黄色晶体分离出缩丙酮(III),从 6-氯嘌呤-9-核糖核苷(II)的收率为 82.2% (153.1g),纯度 99.58% (AUC, HPLC)。反应在 63h 后(以上概述中的步骤 3)反应完全,并在步骤 7 结束后保持过夜(14h)。物料温度在即将进行步骤 9(以上概述中)的过滤之前为 2℃,并且干燥时间为 17h。在物料运行过程中没有遇到处理问题。缩丙酮(III)(147.2g)采用以下描述的方法继续反应并转化成酸 3。所有的试剂、重量和体积当量都是相对于加入的缩丙酮(III)提出的。

[0218] 制备羧酸(IV)的优化方法

[0219] 1. 向反应器中加入 NaIO₄(2.30 当量)、TBAI(1mol%) 和水(2 体积)并搅拌以形成浆料。

- [0220] 2. 加入 RuCl_3 (1.6mol%) 并用水 (1 体积) 清洗称重容器。
- [0221] 3. 反应混合物搅拌下加热到 30℃。
- [0222] 4. 缩丙酮 (III) 作为在乙腈 (12 体积) 和水 (1 体积) 中的溶液装入到反应混合物中, 并将温度维持在 30 ~ 35℃。该加料过程预期将会花费 2h 才能完成。当完成加料后, 盛装缩丙酮 (III) 溶液的容器用乙腈 (3 体积) 漂洗并加入到产物中。
- [0223] 5. 混合物在 30 ~ 35℃ 下冷却, 并通过 TLC 监控反应是否完全。预期反应时间 16h。
- [0224] 6. 产物在 20 ~ 25℃ 下冷却并过滤以除去无机杂质。
- [0225] 7. 反应器和滤饼用乙腈 (6 体积) 漂洗, 而滤液用水 (3 体积) 稀释。
- [0226] 8. 滤液通过 25 ~ 35℃ 下旋转蒸发而浓缩至 8 体积。在这个阶段通过蒸发挥发性 RuO_4 使产物脱色。
- [0227] 9. 产物冷却至 5 ~ 10℃ 以诱导结晶, 并陈化至少 1h。
- [0228] 10. 然后通过过滤收集产物, 滤饼用水 (3×3 体积) 冲洗。
- [0229] 11. 产物在 35 ~ 45℃ 下真空干燥而获得酸 (IV)。预期收率为 75%。
- [0230] 缩丙酮 (III) 在 3h 内加料到反应混合物内并达到最大物料温度 36℃。14h 后氧化反应完成 (TLC 分析)。在冷却到 20 ~ 25℃ (以上概述中步骤 6) 后, 物料意想不到地颜色变深, 由橙色变成绿色, 表明钌物种的氧化态从 Ru^{VI} 变成了 Ru^{III} 。而且, 物料在降低乙腈浓度的浓缩期间并不脱色。最后分离出的酸 (IV) 呈深绿色固体, 收率 63% (96.2g) 而纯度 98.9% (AUC, HPLC)。由于先前的研究已经表明, 产生杂质的颜色在下游处理期间除净, 因此产物无需进一步纯化就可以继续向前反应。羧酸 (IV) (75g) 采用实施例 1 中描述的方法转化成 IB-MECA 缩丙酮 (VI)。
- [0231] 为了制备酰氯的氯化反应, 在 70min 后完成 (实施例 1 中概述的步骤 3), 而物料在浓缩 (实施例 1 中的步骤 4 和 5) 期间大量起泡。在 16min 内向酰氯溶液加入甲基胺 (2M 的 THF 溶液), 并且最大物料温度为 5℃。酰氯向酰胺 (V) 的转化在 2h 之后完成, 在此期间物料从 5℃ 升温到 17℃ (实施例 1 中的步骤 10 和 11)。3-碘苄胺盐酸盐与酰胺 (V) 的偶联反应需要 16h 以达到反应完全 (实施例 1 的步骤 13)。在萃取过程期间, 观察到大量的固体物质。在步骤 17 (实施例 1 中), 过量的 NaHCO_3 会从混合物中沉淀出来, 并且可以通过在步骤 18 (实施例 1 中) 期间加入更多的水克服。产物沉淀, 并需要加入水 (5 体积) 和 IPAc (5 体积) 以再溶解 IB-MECA 缩丙酮 (VI)。在步骤 18 (实施例 1 中) 结束时, 水层的 HPLC 分析表明, IB-MECA 缩丙酮 (VI) 并未以显著浓度存在。这样, 省略了用 IPAc 反萃取水相 (实施例 1 中的步骤 19)。最后分离出的 IB-MECA 缩丙酮 (VI) 呈浅绿色固体, 收率为 75.2% (91.6g) 而纯度为 99.79%。在 3-碘苄胺盐酸盐中以 0.38% 的浓度存在的“溴-杂质”, 观察到的相对浓度为 0.21%。在分离过程结束时, 物料显著脱色但是没有完全脱色 (加入的羧酸 (IV) 为深绿色)。
- [0232] IB-MECA 缩丙酮 (VI) (85g) 采用实施例 1 中概述的方法去保护, 而获得白色固体状的 IB-MECA (I), 收率 84.5% (67g) 而纯度 99.83%。缩丙酮裂解在 9.5h 后完成 (实施例 1 的步骤 3), 并且产物在甲醇-水调成浆料之后的收集期间脱色 (实施例 1 中的步骤 9)。在水中成浆料以除去甲醇之后, 非常缓慢地过滤产物并很困难地转移到干燥器中。在从甲醇-水中进行其初始分离和从水中在形成浆料后之间, IB-MECA 纯度没有变化。
- [0233] 实施例 3: IB-MECA (I) 的 cGMP 生产

[0234] 6-氯嘌呤-9-核糖核苷缩丙酮的 cGMP 生产

[0235] 向带有适度搅拌的 200L 反应器中加入丙酮 (115L, 23 体积) 和 6-氯嘌呤-9-核糖核苷 (5.0kg, 17.4mol, 1.0wt/1.0 体积)。随后, 加入 p-TsOH · H₂O (166g, 0.88mol, 0.05 当量, 0.033wt) 和 2,2-二甲氧基丙烷 (7.6L, 62mol, 3.54 当量, 1.52 体积), 并在室温下搅拌所得的黄色悬浮液。45h 后, 对所得的黄绿色溶液取样并通过 HPLC 进行分析, 表明经过转化起始原料以 0.42% (总纯度 96.9 面积%) 存在。物料通过加入 1N NaOH (900mL, 0.90mol, 0.05 当量, 0.18 体积) 进行中和。该加入操作花约 2min 的时间; 最终的 pH 为 7。物料搅拌 1h。所得的浑浊黄色混合物在减压下于 35 ± 5°C 旋转蒸发器上浓缩 8h 的时间, 直至达到体积为 45L (9.0 体积)。浓缩液在 2 ~ 8°C 的 N₂ 下储存。

[0236] 浓缩液转移到 200-L 的反应器并开始搅拌。加入水 (45L, 9.0 体积), 并且所得稀悬浮液搅拌 55min。物料逐份地转移到组装到配备用于真空蒸馏的加热套中的 72-L 反应器中。在 35 ± 5°C 下开始蒸馏并继续直至物料体积达到 62L (12.4 体积) (蒸馏操作实施 2 天, 并且包括一旦完成后在 ≤ 30°C 下陈化的 15h)。物料转移到组装在冷却浴中的 72-L 反应器中。物料在 4¹/₂h 的时间内骤冷直至温度 ≤ 5°C, 并搅拌另外 1h。固体采用 Sharkskin 滤纸过滤, 滤饼用冷的 2 : 1 水 / 丙酮 (7.5L, 1.5 体积) 漂洗 (总过滤时间约 1h 40min, 并且包括用氮气吹扫滤饼以助其干燥)。湿固体 (5.99kg) 转移到 6 个玻璃干燥用托盘中, 并在 40 ± 5°C 烘箱中真空下进行干燥。干燥 47h 后, 物料在 N₂ 下包装在 4-mil LDPE (双层袋) 中并储存在纤维制圆筒中。这得到 6-氯嘌呤-9-核糖核苷缩丙酮 (4505g, 79%)。

[0237] IB-MECA 缩丙酮的 cGMP 生产

[0238] 向支撑在冷却浴中的 72-L 反应器中, 装入 CH₃CN (37L, 14.8 体积)。在室温下开始搅拌。向其中加入 6-氯嘌呤缩丙酮 (2234g 和 266g, 总计 = 2500g = 1.0wt = 1.0 体积, 7.65mol)、氯化钨 (III) 水合物 (25g, 0.121mol, 0.016 当量, 0.010wt)、水 (10L, 4.0 体积) 和 TBAI (25g, 0.068mol, 0.009 当量, 0.010wt)。所得混合物采用冰水冷却浴在 1h 内冷却至 5°C, 并在 2min 内加入 NaIO₄ (3750g, 17.5mol, 2.3 当量, 1.5wt), 同时维持内部物料温度 < 10°C。冰 / 溶剂浴在 50min 后倒空, 而物料允许升温至室温 (物料温度在 2h 的时间内达到最大 33°C, 采用冷水浴防止物料温度超过该温度)。所得的稠褐色-橙色悬浮液在 15 ~ 30°C 下搅拌 21h。通过 TLC (IPAc, UV 检测) 分析表明, 6-氯嘌呤-9-核糖核苷缩丙酮消失。黄色悬浮液 (21°C) 过滤 30min 直至液滴停止滴落; 用 CH₃CN (15L, 6.0 体积) 漂洗反应器和滤饼。滤液分三份在带有设置为 40 ± 5°C 的水浴的旋转蒸发器上浓缩 11h。

[0239] 向 72-L 反应器中装入所得的残余物 (7.7kg) 和纯水 (22.5L, 9 体积)。室温下开始搅拌。1h 之后, 物料 (23°C) 进行过滤, 反应器和滤饼用纯水 (7.5L, 3 体积) 冲洗。湿滤饼 (4.7kg) 转移到 6 个干燥用托盘中, 并在 40°C 烘箱中真空干燥 6 天。IPC KF (规定设定在 < 0.6%) 和 ¹H NMR (DMSO-d₆) 表明是可接受的物质。这获得 6-氯嘌呤酸 (2145g, 82%), 将其在 N₂ 下储存在带有特氟隆内衬的塞子的玻璃瓶中。

[0240] 生产粗品 IB-MECA 缩丙酮的典型过程

[0241] 向 72-L 反应器中装入 6-氯嘌呤酸 [2600g, 7.63mol, 1.0wt = 1.0 体积], 采用 CH₃CN (31.7L, 12.2 体积) 以实施这个转移过程, 并开始搅拌。向稠的灰色浆料中加入亚硫酸二氯 (889mL, 12.2mol, 1.60 当量, 0.342 体积), 混合物在 < 30°C 下搅拌 4h。向 MeOH (2mL, HPLC 级, Fisher) 中加入约 0.5mL 所得深色溶液并通过 TLC (UV 检测, IPAc/MeOH, 10 : 1) 分

析表明原料消失。在 6.5h 内,物料溶液在旋转蒸发器上真空下浓缩直至蒸馏停止(水浴初始设置为 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 并对此逐渐升高到 $35 \pm 5^\circ\text{C}$);用 CH_3CN (825mL, 0.32 体积)漂洗反应器。关闭水浴热源,并将 CH_3CN (7.6L, 2.9 体积)加入到球形瓶的残余物中。无需真空,球形瓶旋转直至物料开始完全流动,然后转移到位于钢管内的 72-L 反应器中。开始搅拌并加入另外的 CH_3CN (25.5L, 9.8 体积)。物料采用冰水/溶剂浴冷却直至内部物料温度为 $< 2^\circ\text{C}$ (这将花 1h);然后经由 5-L 加料漏斗在 52min 的时间内加入 2M 甲胺的 THF 溶液(4004mL, 8.01mol, 1.05 当量, 1.54 体积),同时维持内部物料温度 $< 7^\circ\text{C}$ 。随后,经由 5-L 加料漏斗在 1h 的时间内加入 DIPEA(1976mL, 11.3mol, 1.5 当量, 0.76 体积);在 $< 7^\circ\text{C}$ 下继续搅拌最低 1h,冷却浴排干,继续搅拌 11h,同时物料允许升温至室温(物料 pH 9)。典型地,用于这些操作的物料最低温度为 0°C 。通过 TLC(UV 检测, IPAc/MeOH, 10 : 1)分析表明 6-氯嘌呤酸/酰氯消失,而形成一种更高流动的主产物。物料转移到另一安装于加热套中且配备有水冷冷凝器的 72-L 反应器中;采用 CH_3CN (1.3L, 0.5 体积)辅助该转移。开始搅拌,并加入 3-碘苄胺·HCl(2777g, 10.30mol, 1.35 当量, 1.068wt)。随后,加入 DIPEA(6656mL, 38mol, 5.0 当量, 2.56 体积),并将混合物在 $70 \pm 5^\circ\text{C}$ 下加热 25h。通过 HPLC 分析表明,通过转化剩余 0.70% 的 6-氯嘌呤酰胺,由此正好满足 $\leq 0.70\%$ 的规定。关闭热源,并允许物料冷却过夜。在 8h 的时间内,物料在 $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 下于旋转蒸发器上真空浓缩直至蒸馏停止;采用 CH_3CN (1650mL, 0.63 体积)漂洗反应器。在 IPAc(5.36L, 2.1 体积)辅助下,残余物转移到 72-L 反应器中。向反应器内加入另外的 IPAc(20.4L, 7.85 体积)并开始搅拌。向这个反应体系中加入饱和碳酸氢钠水溶液(22.2L, 8.5 体积)。搅拌 30min 后,允许该两相体系静置 10min,收集下层水相(加入额外的水(5L)以溶解两相混合物中少量的剩余固体)。剩余的有机相用水(12.7L, 4.9 体积)采取 25-min 搅拌时间和 38-min 静置时间进行清洗。合并有机相并在 $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 下于旋转蒸发器上真空浓缩直至蒸馏停止(在 6h 的时间内)。细口瓶用 IPAc(825mL, 0.32 体积)漂洗。在这些阶段,所获得的残余物在旋转蒸发器的烧瓶内用 MeOH(12.7L, 4.9 体积)调成浆料并浓缩至蒸馏停止(4.5h)。获得的粗 IB-MECA 缩丙酮(7.2kg)为湿的米色固体,其储存以备进一步处理和物料合并。HPLC 分析表明,IB-MECA 缩丙酮为 91.3 峰面积%纯度。

[0242] 粗 IB-MECA 缩丙酮的纯化

[0243] 粗 MeOH 润湿的 IB-MECA 缩丙酮(15kg, 91 峰面积%)从 $60 \sim 65^\circ\text{C}$ 的 MeOH(34L)中重结晶。所获得的滤饼用冷 MeOH(15.3L)漂洗并转移至 8 个干燥用托盘(物料重 10kg)中。HPLC 分析表明,滤液中 IB-MECA 缩丙酮以 65 峰面积%纯度存在。由峰高估计,在该操作过程中将损失 1kg 该物质。该批物料在设置为 40°C 的真空烘箱中干燥约 22h(7945g)。HPLC 分析表明,99.0 峰面积%纯度的期望产物被两种在 RRT 0.64(0.32 峰面积%)和 RRT 1.30(0.58 峰面积%)的主要杂质污染。这些峰的质谱为:

[0244] RRT = 064

[0245] MW = 424.19

[0246] m/e : 424.19(100%), 425.19(23.9%), 426.19(4.0%), 425.18(2.2%)

[0247] C, 59.42 ;H, 5.70 ;N, 19.80 ;O, 15.08。

[0248] RRT 1.30

[0249] MW = 752.34g/mol

[0250] m/e :752.01(100.0%),753.01(32.4%),754.02(4.5%),754.01(1.5%)

[0251] C,43.10 ;H,3.48 ;I,33.74 ;N 11.17 ;O 8.51。

[0252] 该物质再次从 60 ~ 65℃的 MeOH(23.8L) 重结晶。所获得的滤饼用冷 MeOH(2×8L) 漂洗。总过滤时间为 85min。滤饼在氮气流下储存。滤饼通过 HPLC 分析表明,99.77 峰面积%纯度的期望产物被两种在 RRT 0.64(0.07 峰面积%) 和 RRT 1.30(0.16 峰面积%) 的主要少量杂质污染。该批物料转移至 6 个干燥用托盘(物料重 7.4kg) 中而不是实施第 3 次可选的重结晶。物料在设定 40℃的真空烘箱中干燥约 60h。获得的 IB-MECA 缩丙酮(7097g) 为白色固体,包装到 4 个琥珀色玻璃瓶中之后,在室温下储存。

[0253] IB-MECA 的 cGMP 生产

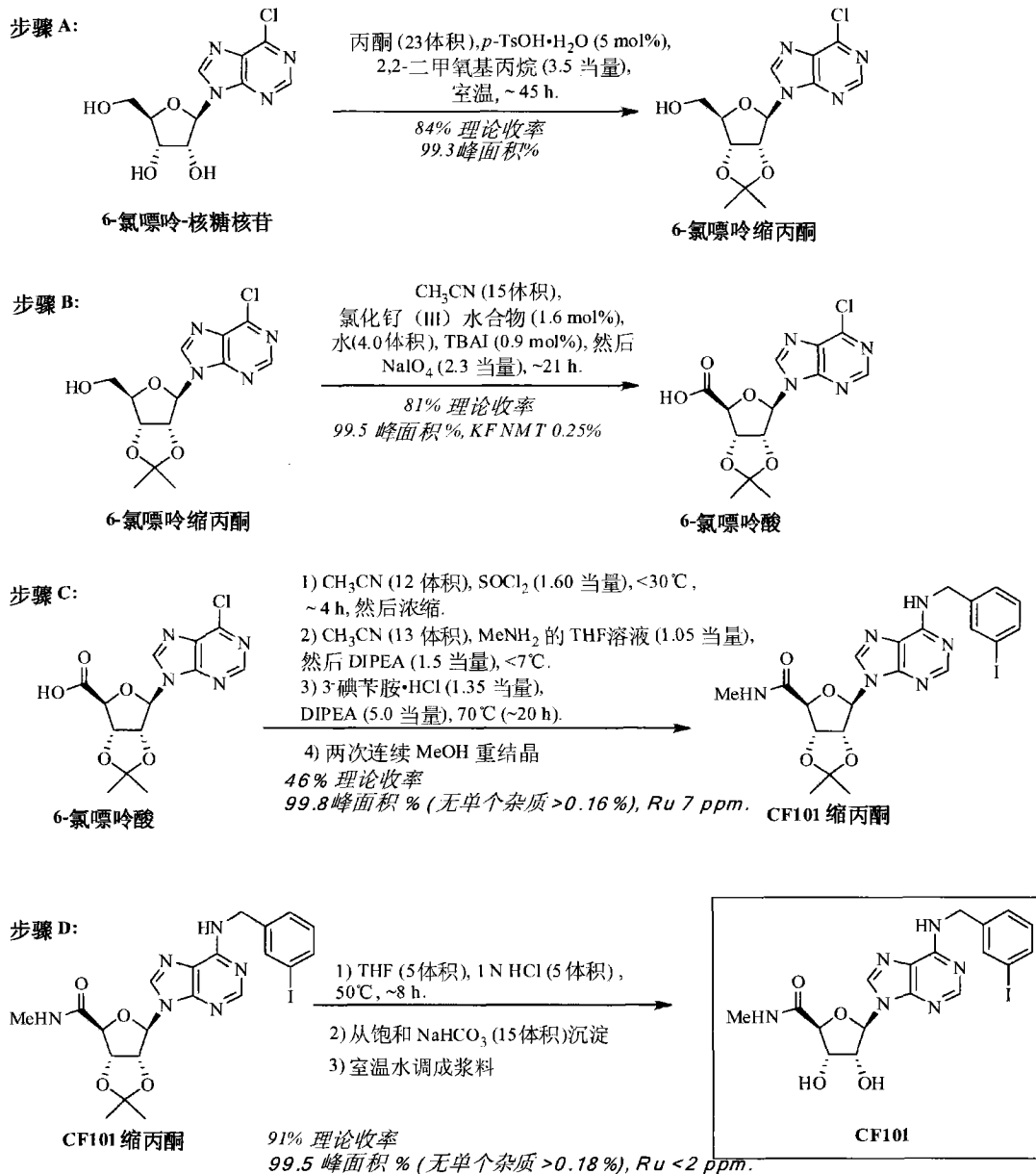
[0254] 向 72-L 反应器中装入 THF(18.1L,5.1 体积)、IB-MECA 缩丙酮(3.55kg,6.45mol,1.0wt/1.0 体积) 和 1N HCl 水溶液(17.8L,17.8mol,2.76 当量,5.0 体积)。所获得的浅绿色搅拌浆料在 50±5℃下加热约 8h,此时的 HPLC 分析表明,相对于 IB-MECA 剩余 1.16% 的 IB-MECA 缩丙酮(因此满足规定≤1.5%)。物料冷却至约 40℃,然后经由传送泵通过在线过滤器过滤。空的反应器和传送管路用 THF(600mL,0.17 体积) 冲洗。所得到的滤液于冷藏室(2~8℃) 储存过夜。向 200-L 反应器中通过在线过滤器加入冷的饱和 NaHCO₃ 水溶液(53.6L,15 体积,16℃) 并开始搅拌。富含 IB-MECA 的滤液(15℃) 在 30min 内经由配备在线过滤器的传送泵加入到 200-L 反应器中。所获得的白色沉淀搅拌过夜以陈化(在 20±2℃发生沉淀期间,几乎不存在温度波动,不需要采用冷却,且仅有少量起泡。浆料 pH 为 pH 7.5)。物料采用尼龙过滤布过滤;空的反应器和滤饼用水(5×3.4L,4.8 体积) 清洗。滤饼在 N₂ 流下引流(总过滤时间 5.5h),包装以备进一步处理,且储存于冷藏室。该批料(9.2kg 湿重) 通过 HPLC 分析表明为 99.5 峰面积%纯度,没有任何单个杂质>0.20 峰面积%纯度。

[0255] 实施例 4:IB-MECA 千克级对照 cGMP 生产方法

[0256] 图解 1 表示根据本公开内容和如所附权利要求限定的用于千克级制备 IB-MECA 的过程(典型收率和 HPLC 纯度如所示)。在图解 1 中表示的生产步骤类似于以上实施例 1 中详细描述的准备 IB-MECA 的生产工艺。采用该工艺单批生产的 IB-MECA 达 6kg 之多(HPLC:99.5 峰面积%纯度,无单杂质>0.18%)。cGMP 生产从商购的 6-氯嘌呤-9-核糖核苷(10kg) 开始,并获得 IB-MECA(6kg,34%总理论收率(60wt%))。

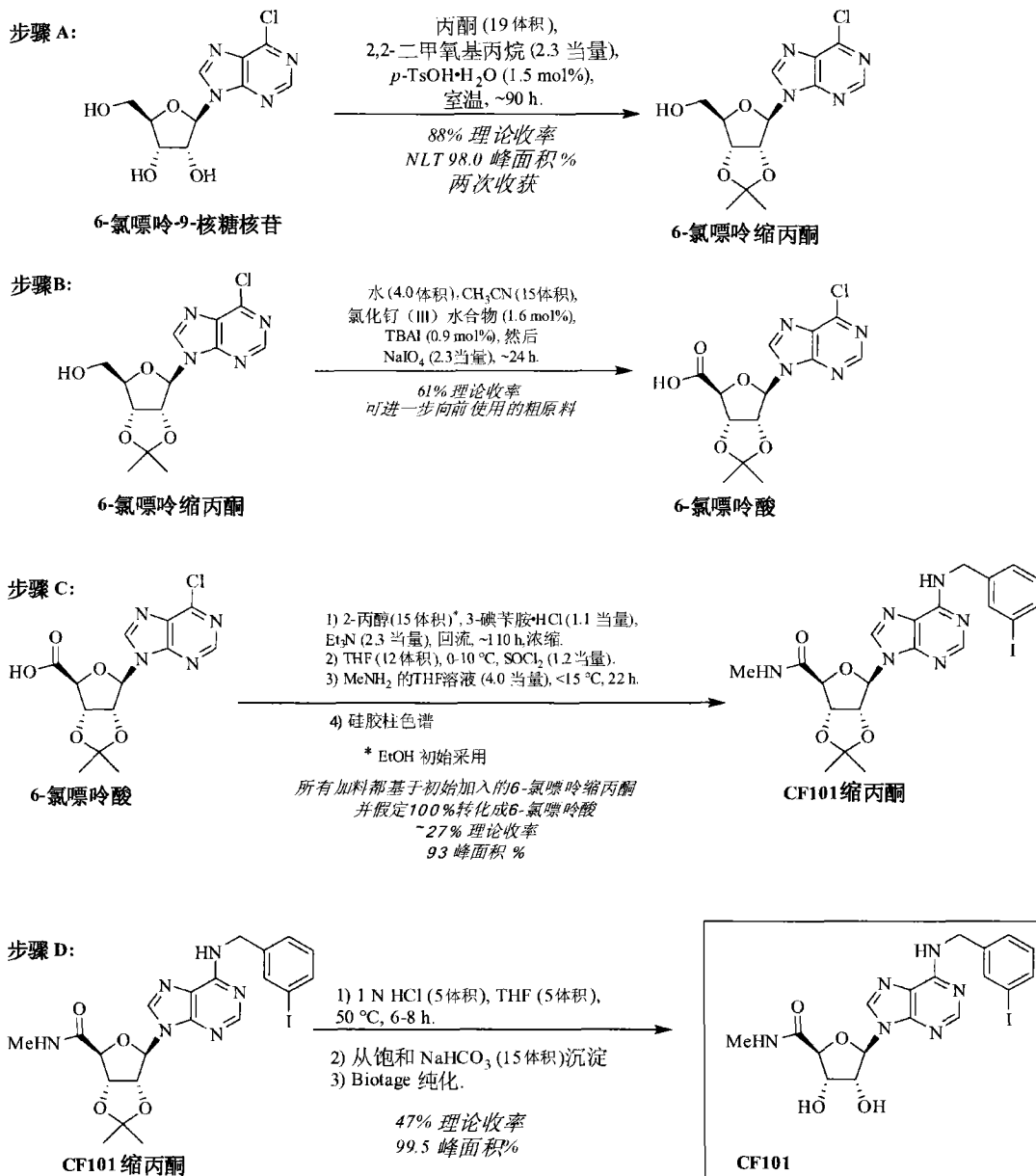
[0257] 图解 2 表示 IB-MECA 生产工艺的变形(典型收率和 HPLC 纯度也如所示)。差别在于操作过程、反应顺序、装入的试剂当量、所用溶剂和随后的收率。在图解 2 中的过程采用了硅胶柱色谱和反相 Biotage 纯化。图解 2 的工艺以 350-g 和 2-kg 规模实施,并分别获得(32g,9wt%) 和(414g,21wt%) 的 IB-MECA。

[0258]



[0259] 图解 1: 生产 IB-MECA (CF101) 的工艺

[0260]



[0261] 图解 2: 生产 IB-MECA (CF101) 的工艺变形

[0262] 在用于 IB-MECA cGMP 生产的图解 1 和图解 2 的工艺步骤之间注释了许多主要不同之处, 如下:

[0263] 步骤 A 6-氯嘌呤缩丙酮的制备:

[0264] 在根据图解 2 的工艺中, p-TsOH·H₂O 和 2,2-二甲氧基丙烷的加料量增加是为了加快反应速率同时不会有损收率和质量。这从成本上使反应-容器停留时间减半。在规模上, 初始过程不一致而导致反应不完全。为了促使反应完全, 不得不在高达 3 周的时间内分份添加另外的试剂, 导致总反应体积显著增加。这些加料也进行优化, 以使可能的副反应保持最低。

[0265] 根据图解 1 的工艺, 其也是所述权利要求的主题, 作为单次产物获得与如方案图解 2 的工艺实现的收率类似的高质量物质。

[0266] 步骤 B 6-氯嘌呤酸的制备:

[0267] 根据图解 1 中详述的工艺, 为了获得 IB-MECA 缩丙酮的后续试剂和溶剂的加入, 都

基于分离的酸重量。然而根据图解 2 的工艺,试剂和溶剂的加入是相对于分离的前体中间体(6-氯嘌呤缩丙酮)的重量。因此,浆料、萃取 IPAc/H₂O 操作和 Na₂SO₄ 干燥操作每一步在图解 1 的工艺中都可以省略。

[0268] 图解 1 中的酸从水中以易于处理的形式分离出,以至于能够在烘箱中干燥而满足残余水含量的规定(随后的酰氯生成对水很敏感)。在该酸中残余的水的可接受上限确定为 < 0.6wt%。这通过简单的真空烘箱干燥就能始终满足,而不会损害质量。通过增加滤饼的冲洗体积以及通过消除前述的多余处理步骤,能够提高回收率。

[0269] 步骤 C IB-MECA 缩丙酮的制备:

[0270] 两个图解之间的 3 个合成转化步骤(与 3-碘苄胺的反应,然后生成酰氯,最后与 MeNH₂ 反应生成酰胺)的次序上有显著差异。相对于 6-氯嘌呤酸加入,优化各种试剂的加入(参见以上步骤 B)。在图解 1 中使用单一反应溶剂(CH₃CN)。这消除了当采用图解 2 的工艺时遇到的酯杂质生成(未显示)的情况。另外,根据图解 1 中该步骤的工艺次序,在合成的最后阶段采用了成本最昂贵的物质(3-碘苄胺)。在图解 2 的工艺中硅胶柱色谱纯化条件用 MeOH 重结晶(图解 1)代替。在该处还存在鉴定的其它几种可能的工艺杂质。

[0271] 步骤 D IB-MECA 的制备:

[0272] 在图解 2 的工艺中采用的 Biotage 纯化操作就不再需要,因为前体 IB-MECA 缩丙酮的纯度在图解 1 中通过甲醇重结晶而得以改进。在两种方案中缩丙酮去保护(酸性条件)期间确定发生热分解,因此反应时间限制为 8h(不会有损于收率)。