

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 903 212**

51 Int. Cl.:

C07D 239/47 (2006.01)

C07D 201/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2016 PCT/US2016/036768**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16201146**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2016 E 16730210 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.10.2021 EP 3307251**

54 Título: **Usos y procedimientos de preparación de fluorociclopentenilcitosina**

30 Prioridad:

09.06.2015 US 201562173174 P

27.08.2015 US 201562210708 P

01.02.2016 US 201662289801 P

07.04.2016 US 201662319369 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2022

73 Titular/es:

**OCUPHIRE PHARMA, INC. (100.0%)
15245 Shady Grove Road, Suite 455
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**LEE, YOUNG BOK;
KIM, DEOG JOONG;
PETERS, GODEFRIDUS J.;
SARKISJAN, DZJEMMA y
MAZHARI, REZA**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 903 212 T3

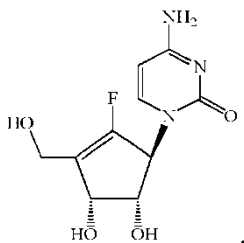
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Usos y procedimientos de preparación de fluorociclopentenilcitosina

Antecedentes de la invención

La Pat. de los EE.UU. N° 7.405.214 (publicada el 29 de julio de 2008) divulga un compuesto de fórmula (I)



(I)

también denominado RX-3117, fluorociclopentenilcitosina o 4-amino-1-((1S,4R,5S)-2-fluoro-4,5-dihidroxi-3-hidroximetil-ciclopent-2-enil)-1H-pirimidina-2-ona. La patente estadounidense 7.405.214 también divulga una síntesis total de 11 etapas del RX-3117 a partir de la D-ribosa y la síntesis utiliza un catalizador costoso que plantea un desafío para la implementación en la producción de la planta.

La patente de EE.UU. N° 9.150.520 (publicada el 6 de octubre de 2015) divulga una ruta corta para la preparación de RX-3117 mediante (3R,4R,6aR)-terc-butil-(5-fluoro-2,2-dimetil-6-tritiloximetil-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[1,3]dioxol-4-iloxi)-difenil-silano a 4-amino-1-(3aS,4S,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritiloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)pirimidina-2(1H)-ona. La síntesis requiere el aislamiento de los intermedios en cada etapa. Por lo tanto, el procedimiento es insatisfactorio para la producción a escala del producto final debido a las limitaciones de tiempo y coste. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un procedimiento mejorado, por ejemplo, reduciendo el número de etapas y/o eliminando la necesidad de purificar cada intermedio.

Sumario de la invención

La invención proporciona un procedimiento de preparación de 4-amino-1-((1S,4R,5S)-2-fluoro-4,5-dihidroxi-3-(hidroximetil)ciclopent-2-en-1-il)pirimidina-2(1H)-ona 1H₂O (RX-3117-MH) mediante la conversión de terc-butil(((3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritiloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)oxi)difenilsilano (ASM11) a 4-amino-1-((3aS,4S,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritiloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)pirimidina-2(1H)-ona (INT14) en un procedimiento continuo con más de una etapa sin aislamiento de ningún intermedio.

Las realizaciones del procedimiento pueden incluir la disolución de terc-butil(((3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritiloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)oxi)difenilsilano (ASM11) en 2-metil tetrahidrofurano; añadir fluoruro de tetra-n-butilamonio para formar ((3aS,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritiloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il) (INT12) en una solución de reacción; y recuperar INT12 en una fase orgánica.

Las realizaciones de la recuperación de INT12 en la fase orgánica pueden incluir el lavado de la solución de reacción con una solución acuosa; la separación de una extracción acuosa de la fase orgánica que tiene INT12; el lavado de la extracción acuosa con 2-metil tetrahidrofurano para extraer INT12 de la extracción acuosa; y la combinación del INT12 extraído con la fase orgánica que tiene INT12.

Las realizaciones del procedimiento pueden incluir la adición de trietilamina y cloruro de metanosulfonilo en 2-metil tetrahidrofurano al INT12 en la fase orgánica para formar ((3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritiloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il metanosulfonato) (INT13) en una segunda solución de reacción; y recuperar INT13 en DMSO.

Las realizaciones de la recuperación de INT13 en DMSO pueden incluir la adición del DMSO a la segunda solución de reacción con INT13; y la eliminación de al menos el 90% en peso de 2-metil tetrahidrofurano por destilación.

Las realizaciones del procedimiento pueden incluir la adición de 2,5 equivalentes de carbonato de cesio y citosina a la INT13 en DMSO para formar 4-amino-1-((3aS,4S,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritiloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)pirimidina-2(1H)-ona (INT14) en una tercera solución de reacción.

Las realizaciones del procedimiento pueden incluir el mantenimiento de la temperatura de reacción entre 33 y 37°C aproximadamente.

En las realizaciones, el INT14 tiene una proporción de isómeros N- a O- de más de aproximadamente 95:5.

Las realizaciones del procedimiento pueden incluir la adición de un ácido a la tercera solución de reacción con INT14 para formar 4-amino-1-((1S,4R,5S)-2-fluoro-4,5-dihidroxi-3-(hidroximetil)ciclopent-2-en-1-il)pirimidina-2(1H)-ona (RX-3117); lavar el RX-3117 con metil terc-butil éter y agua para formar una fase orgánica y una fase acuosa que tenga RX-3117; y purificar el RX-3117 para formar RX-3117-MH.

- 5 Las realizaciones del procedimiento pueden incluir la carga de la mezcla de reacción con metanol y la destilación de la mezcla de reacción para eliminar el acetónido hasta que se detecte un área inferior a aproximadamente el 1,0% del acetónido antes de la etapa de lavado.

- Las realizaciones de la etapa de lavado pueden incluir la separación de la fase acuosa que tiene RX-3117 de la fase orgánica; el lavado de la fase acuosa que tiene RX-3117 con metil terc-butil éter hasta que se detecte menos de aproximadamente el 0,5% p/p de alcohol tritílico en la fase acuosa; añadir una resina aniónica básica a la fase acuosa que tiene RX-3117 para formar una suspensión; filtrar la suspensión para retener un licor madre; concentrar el licor madre para formar un concentrado; y añadir acetonitrilo al concentrado para formar RX-3117-MH purificado.

- Otro aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento continuo de preparación de 4-amino-1-((3aS,4S,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritoloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)pirimidina-2(1H)-ona (INT14) a partir de terc-butil(((3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritoloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)oxi)difenilsilano (ASM11), incluyendo las etapas de: disolver el ASM11 en 2-metil tetrahydrofurano; añadir fluoruro de tetra-n-butilamonio para formar ((3aS,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritoloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-ol) (INT12) añadiendo trimetilamina y cloruro de metanosulfonilo en 2-metil tetrahydrofurano al INT12 para formar ((3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritoloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il metanosulfonato) (INT13) y añadir carbonato de cesio y citosina al INT13 para formar 4-amino-1-((3aS,4S,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritoloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)pirimidina-2(1H)-ona (INT14); en el que las etapas se realizan en uno o más reactores fijos sin aislamiento de INT12 o INT13.

- Otro aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento continuo de preparación de 4-amino-1-((1S,4R,5S)-2-fluoro-4,5-dihidroxi-3-(hidroximetil)ciclopent-2-en-1-il)pirimidina-2(1H)-ona 1H₂O (RX-3117-MH) a partir de 4-amino-1-((3aS,4S,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritoloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)pirimidina-2(1H)-ona (INT14), incluyendo las etapas de: reaccionar la INT14 con un ácido para formar 4-amino-1-((1S,4R,5S)-2-fluoro-4,5-dihidroxi-3-(hidroximetil)ciclopent-2-en-1-il)pirimidina-2(1H)-ona (RX-3117); lavar la RX-3117 con metil terc-butil éter y agua para formar una fase orgánica y una fase acuosa con RX-3117 separar la fase acuosa que tiene RX-3117 de la fase orgánica; lavar la fase acuosa que tiene RX-3117 con metil terc-butil éter hasta que menos de aproximadamente 0Se detecta un 5% en peso de alcohol tritílico en la fase acuosa; se añade una resina aniónica fuertemente básica a la fase acuosa que tiene RX-3117 para formar una suspensión; se filtra la suspensión para retener un licor madre; se concentra el licor madre para formar un concentrado; se añade acetonitrilo al concentrado para formar RX-3117-MH purificado; y se aísla el RX-3117-MH purificado; en el que las etapas se realizan en uno o más reactores fijos.

35 Breve descripción de las figuras

La FIG. 14 muestra las fórmulas estructurales de la citidina, la gemcitabina y el nuevo análogo de la citidina RX-3117.

La FIG. 21 muestra una visión general de la ruta metabólica del RX-3117.

La FIG. 29 es una RMN de ¹H de RX-3117 hecha usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 9.

- 40 La FIG. 30 es una RMN de ¹³C de RX-3117 realizada mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 9.

La FIG. 31 es una RMN de ¹⁹F de RX-3117 realizada mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 9.

La FIG. 32 es un espectro de masas de RX-3117 realizado mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 9.

La FIG. 33 es un Espectro de Masa (con un filtro ES) de RX-3117 hecho usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 9.

- 45 La FIG. 34 es una comparación microscópica de RX-3117 hecho según el procedimiento del Ejemplo 9 (fila superior) y preparado mediante un procedimiento a escala de laboratorio (fila inferior) bajo luz polarizada simple (columna izquierda) y luz polarizada cruzada (columna derecha).

- La FIG. 35 son datos de difracción de polvo de rayos X que comparan el RX-3117 fabricado mediante un procedimiento a escala de laboratorio (espectro superior) y el RX-3117 fabricado mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 9 (espectro inferior).

Descripción detallada

El alcance de la invención se define en las reivindicaciones.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los significados de todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento son los comúnmente entendidos por una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece la materia divulgada. Un experto en la materia apreciará que cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento también puede utilizarse para practicar o probar la materia divulgada.

A menos que se indique claramente lo contrario, los siguientes términos utilizados en el presente documento tienen el significado que se indica a continuación. Estos significados pretenden complementar, y no alterar, los significados de estos términos tal y como se entienden en la técnica.

"C_{máx}" se refiere a la concentración plasmática máxima observada.

"T_{máx}" se refiere al momento en que se alcanza la C_{máx}.

"T_{1/2}" se refiere al tiempo necesario para que la concentración plasmática de un fármaco alcance la mitad de su valor original. "Terminal T_{1/2}" se refiere a T_{1/2} en la fase terminal.

"AUC_{0-t}" se refiere al área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo (AUC) desde el tiempo cero hasta el tiempo t, donde "t" es el último punto de tiempo de muestreo con concentración medible. Por ejemplo, AUC₀₋₂₄ o AUC_{0-t} (0-24 horas) se refiere al AUC desde el tiempo cero hasta las 24 horas.

"Forma farmacéutica oral" se refiere a una composición farmacéutica formulada para la administración oral. La forma de dosificación oral puede formularse para proporcionar una liberación inmediata, sostenida, prolongada, retardada o controlada. Algunos ejemplos de formas de dosificación oral son los comprimidos, las cápsulas, los granulados y las cápsulas de gel.

"Cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto o composición farmacéutica que, basándose en sus parámetros de eficacia y potencial de toxicidad y en los conocimientos de un experto en la materia, produce un efecto deseado, como el tratamiento o la prevención de una afección. Una cantidad efectiva puede ser administrada en una o más dosis.

"Poner en contacto" se refiere a provocar, directa o indirectamente, que un compuesto y una célula estén en suficiente proximidad para producir un efecto deseado, como inducir la apoptosis o modular la proteína quinasa. El contacto puede realizarse *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, el contacto de una célula con un compuesto puede implicar la entrega del compuesto directamente en la célula mediante técnicas conocidas, como la microinyección, la administración del compuesto a un sujeto portador de la célula o la incubación de la célula en un medio que incluya el compuesto.

"Tratar" se refiere a lograr un resultado beneficioso o deseado, como un resultado clínico. En algunas realizaciones, el resultado beneficioso o deseado es uno o más de los siguientes: inhibir o suprimir la aparición o el desarrollo de una afección, reducir la gravedad de la afección, reducir el número o la gravedad de los síntomas asociados a la afección, aumentar la calidad de vida de un sujeto que padece la afección, disminuir la dosis de otra medicación necesaria para tratar la afección, potenciar el efecto de otra medicación que un sujeto está tomando para la afección y prolongar la supervivencia de un sujeto que padece la afección.

"Prevenir" se refiere a reducir la probabilidad de que un sujeto desarrolle una condición que no tiene pero que está en riesgo de desarrollar. "En riesgo" denota que un sujeto tiene uno o más factores de riesgo, que son parámetros medibles que se correlacionan con el desarrollo de una condición y son conocidos en la técnica. Un sujeto que tiene uno o más de los factores de riesgo tiene una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad que un sujeto sin dichos factores de riesgo.

"Sujeto" se refiere a un animal, como un mamífero, incluyendo, pero no limitado a, un ser humano. Por lo tanto, los procedimientos aquí divulgados pueden ser útiles en la terapia humana y en aplicaciones veterinarias. En una realización, el sujeto es un mamífero. En otras realizaciones, el sujeto es un ser humano.

"En ayunas" se refiere a un sujeto que ha ayunado de alimentos durante al menos 8 horas antes del tratamiento.

"Apoptosis" o "proceso apoptótico" se refiere a un proceso de muerte celular programada que comienza cuando una célula recibe una señal interna o externa (señal apoptótica), y procede a través de una serie de eventos bioquímicos (fase de la vía de señalización) que desencadenan una fase de ejecución. En la fase de ejecución, las caspasas efectoras escinden proteínas celulares vitales que conducen a los cambios morfológicos que caracterizan la apoptosis. Estos cambios pueden incluir, por ejemplo, la contracción celular, la dilatación del retículo endoplásmico, la fragmentación celular, la formación de vesículas de membrana (cuerpos apoptóticos), la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN), la condensación de la cromatina, la migración de cromosomas marginación en los núcleos celulares, hinchazón mitocondrial, ensanchamiento de la cresta mitocondrial, apertura de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial, disipación del gradiente de protones mitocondrial, y/o sangrado de la

membrana plasmática. Los ensayos ejemplares utilizados para detectar y medir la apoptosis incluyen el examen microscópico de los cuerpos picnóticos, así como los ensayos enzimáticos como el etiquetado de extremos nítidos de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL), el ensayo de caspasas, el ensayo de anexina y el escalado de ADN. Las células apoptóticas pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el análisis FACS de las células teñidas con yoduro de propidio para detectar la hipoploidía del ADN.

"Inducir la apoptosis" se refiere a causar la apoptosis directa o indirectamente, y puede caracterizarse por un aumento del número de células en una población celular determinada que se someten a la apoptosis, un aumento de la tasa por la que una célula se somete a la apoptosis, o un aumento de la intensidad, el número o la tasa de aparición de una o más características morfológicas de la apoptosis.

"Sensibilizar" se refiere a aumentar la sensibilidad de una célula a, o reducir la resistencia de una célula en respuesta a, una señal apoptótica.

"Señal apoptótica" se refiere a un estímulo que activa una vía de señalización apoptótica.

La "vía de señalización apoptótica" se refiere a una serie de señales moleculares que desencadenan la muerte celular apoptótica. La vía se inicia con la recepción de una señal y termina cuando se desencadena la fase de ejecución de la apoptosis.

"Modular" se refiere a alterar la expresión y/o la actividad de una biomolécula como una proteína quinasa. En una realización, modular se refiere a aumentar la expresión y/o la actividad de una biomolécula. En otras realizaciones, modular se refiere a disminuir la expresión y/o la actividad de una biomolécula.

"Proteína quinasa" se refiere a una enzima quinasa que modifica otras proteínas por fosforilación. Los ejemplos de una proteína quinasa incluyen la proteína quinasa de serina/treonina (por ejemplo, la quinasa de punto de control 1, la quinasa de punto de control 2), la proteína quinasa específica de tirosina, la proteína quinasa específica de histidina y la quinasa mixta (por ejemplo, la proteína quinasa activada por mitógenos). En una realización, la proteína quinasa es una proteína quinasa de serina/treonina. En una realización, la proteína quinasa es una proteína quinasa de serina/treonina. En otras realizaciones, la proteína quinasa es la quinasa de punto de control 1 (Chk1) o la quinasa de punto de control 2 (Chk2). En otras realizaciones, la proteína quinasa es Chk1. En otras realizaciones, la proteína quinasa es Chk2.

"p53" se refiere a una proteína codificada por el gen supresor tumoral p53.

"UCK2" se refiere a la Uridina Citidina Quinasa 2 expresada predominantemente en la célula o tejido tumoral.

"Célula tumoral" se refiere a una célula derivada de un tumor.

"Tumor" se refiere a un crecimiento anormal de tejido o células, ya sea benigno o maligno. Algunos ejemplos son los tumores que se encuentran en la próstata, el pulmón, el cerebro, la mama, el riñón, el hígado, el pulmón, los intestinos, la linfa, el músculo, el hueso, la médula ósea, el útero, el ovario, la vagina, la vulva, el páncreas, la glándula suprarrenal, el sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico, cérvix, vejiga, endometrio, garganta, esófago, laringe, tiroides, sangre, penal, testicular, timo, piel, columna vertebral, estómago, conducto biliar, intestino delgado, tracto hepatobiliar, colorrectal, colon, recto, ano, endocrino, ojo y vesícula biliar.

"Cáncer" se refiere a un tumor maligno. Las células cancerosas pueden o no invadir el tejido circundante y, por tanto, pueden o no hacer metástasis en nuevos lugares del cuerpo. El cáncer abarca los carcinomas, que son cánceres de células epiteliales; los carcinomas incluyen carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, melanomas y hepatomas. El cáncer también abarca los sarcomas, que son tumores de origen mesenquimal; los sarcomas incluyen sarcomas osteogénicos, leucemias y linfomas. Los cánceres pueden afectar a uno o varios tipos de células neoplásicas.

"Agente antitumoral" se refiere a cualquier agente útil para tratar o prevenir un tumor. Los ejemplos de un agente antitumoral incluyen los agentes activos descritos en **Composiciones Farmacéuticas, infra**. En algunas realizaciones, el agente antitumoral, además del RX-3117, se selecciona entre antimetabolitos, agentes de fragmentación del ADN, agentes de entrecruzamiento del ADN, agentes intercalantes, inhibidores de la síntesis de proteínas, venenos de la topoisomerasa I, venenos de la topoisomerasa II, agentes dirigidos a los microtúbulos, inhibidores de las quinasas, polifenoles, hormonas, antagonistas de las hormonas, agonistas de los receptores de la muerte, inhibidores del punto de control inmunitario, anticuerpos contra el receptor de la muerte celular programada 1 (PD-1) y anticuerpos contra el ligando de la muerte celular programada 1 (PD-L1). En otras realizaciones, el agente antitumoral adicional es un anticuerpo del receptor PD-1. En otras realizaciones, el agente antitumoral adicional es pembrolizumab. En otras realizaciones, el agente antitumoral adicional es nivolumab. En otras realizaciones, el agente antitumoral adicional es duryalumab. En otras realizaciones, el agente antitumoral adicional es una combinación de nivolumab y pembrolizumab.

"Radiación" se refiere a cualquier radiación útil para tratar o prevenir un tumor. Algunos ejemplos de radiación son los rayos X, los rayos gamma y las partículas cargadas. La radiación puede administrarse mediante cualquier forma

de radioterapia, como la radioterapia de haz externo (EBRT, XBRT o teleterapia), la braquiterapia (radioterapia interna o terapia de fuente sellada), la radioterapia intraoperatoria o la radioterapia sistémica.

"Aislamiento" se refiere a cualquier procedimiento mediante el cual se separa un intermedio de una mezcla de reacción por purificación, como por ejemplo, mediante cromatografía, destilación, filtración, extracción, secado o recristalización.

El "reactor o recipiente fijo" se refiere a un sistema de reactor en un lugar fijo del plano que no puede ser movido.

"Tal como" tiene el mismo significado que "tal como pero no limitado a". Del mismo modo, "incluir" tiene el mismo significado que "incluir pero no limitarse a", mientras que "que incluye" tiene el mismo significado que "incluyendo pero no limitarse a".

Las formas singulares "un", "o" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "un compuesto" puede incluir uno o más compuestos y/o su(s) equivalente(s).

Cualquier intervalo numérico divulgado aquí abarca los límites superior e inferior y cada valor intermedio, a menos que se especifique lo contrario.

Salvo en los ejemplos prácticos, o cuando se indique lo contrario, los valores numéricos (como los números que expresan las cantidades de ingredientes, las condiciones de reacción) utilizados en la especificación y las reivindicaciones se modifican con el término "aproximadamente". Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, estas cifras son aproximaciones que pueden variar en función de las propiedades deseadas que se deseen obtener. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al ámbito de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse a la luz del número de dígitos significativos y de las técnicas ordinarias de redondeo.

Aunque los parámetros numéricos que establecen el alcance de la materia divulgada son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos de trabajo se reportan con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene intrínsecamente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

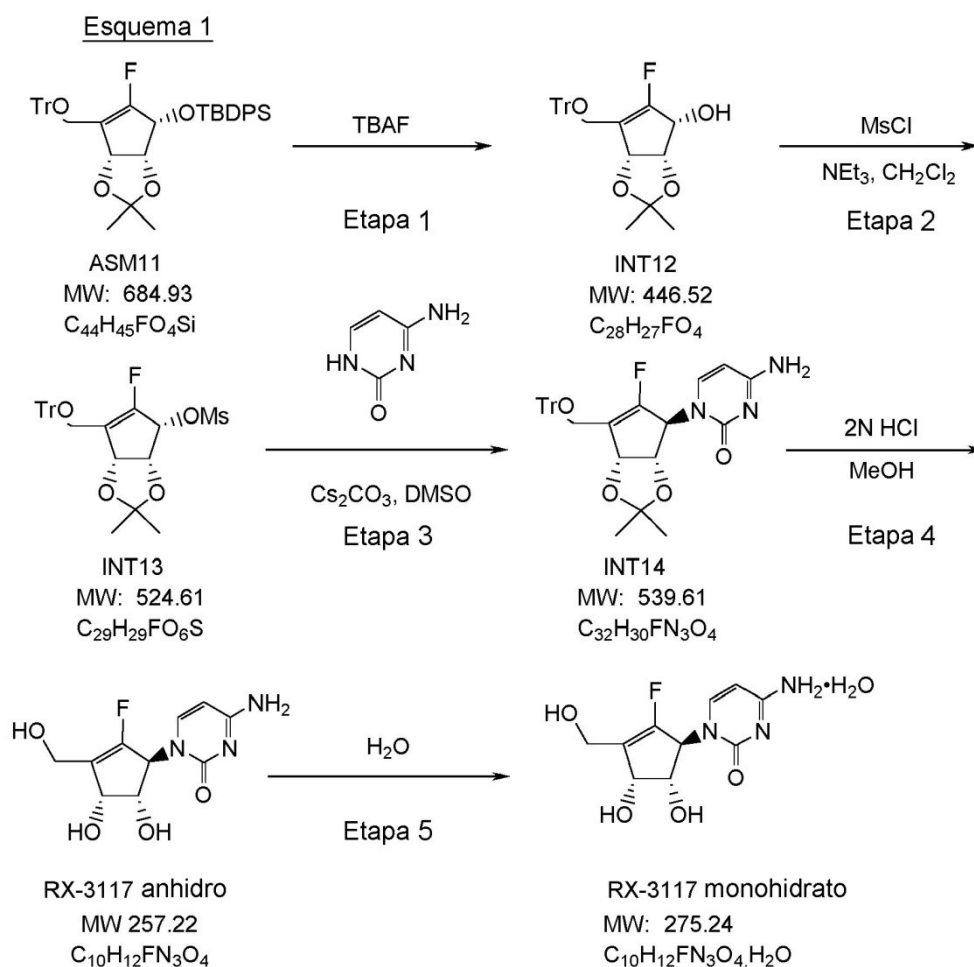
Mejoras en el procedimiento de fabricación de RX-3117

La Pat. de EE.UU. El número 7.405.214 divulga una síntesis de 11 etapas de RX-3117 a partir de D-ribosa. La síntesis utiliza un costoso catalizador que supone un reto para su aplicación en la producción de plantas a gran escala. Pat. de EE.UU. N° 9.150.520 mejoró la síntesis divulgando una ruta más corta para la preparación de RX-3117 mediante (3R,4R,6aR)-terc-butil-(5-fluoro-2,2-dimetil-6-tritiloximetil-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[1,3]dioxol-4-iloxi)-difenil-silano (ASM11) a 4-amino-1-(3aS,4S,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritiloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)pirimidina-2(1H)-ona (INT14). Sin embargo, la síntesis previa de ASM11 a INT14 requería el aislamiento de los intermedios en cada etapa. Por tanto, el procedimiento plantea limitaciones de coste y tiempo, sobre todo si se amplía para la fabricación comercial.

La presente invención proporciona un procedimiento mejorado de preparación de RX-3117, que es comercialmente viable para la producción a gran escala. El procedimiento telescópico de la síntesis de ASM11 a INT14 sin la necesidad de aislar cada uno de los materiales intermedios, reduciendo así el coste y mejorando la eficiencia. Más concretamente, la presente invención proporciona un procedimiento continuo con tres etapas para telescopiar la síntesis de ASM11 a INT14. La presente invención también proporciona un procedimiento para obtener RX-3117 monohidrato (RX-3117-MH) en recipientes fijos para reducir significativamente el coste de fabricación. Al convertir tres etapas en una sola, el presente procedimiento elimina la necesidad de concentrar un intermedio en un residuo. Estas mejoras se basan en beneficios inesperados al sustituir los reactivos que no son fácilmente evidentes para un experto en la materia.

Además, la presente invención proporciona condiciones optimizadas de reacción y aislamiento para aumentar la selectividad de nitrógeno a oxígeno (N/O) en la etapa 3, en la que se añade citosina a (3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritiloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il metanosulfonato (INT13) para hacer INT14. En el procedimiento mejorado, la relación entre los isómeros N y O mejoró a 99,03:0,97 desde el valor optimizado anteriormente de 88:12. El procedimiento de fabricación en recipiente fijo de la presente invención consigue las ventajas de coste de funcionamiento de una fabricación a escala del producto deseado en forma de monohidrato.

El esquema 1 siguiente ilustra un procedimiento mejorado de preparación de RX-3117MH.



Etapa 1 - Mejoras del procedimiento de desprotección de ASM11 para formar INT12

En la etapa 1 del procedimiento, se utilizó 2-metil-tetrahidrofurano como disolvente del procedimiento. Esta modificación permite realizar un trabajo sin necesidad de concentrar el intermedio (3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritoloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-ol (INT12) y evitar el intercambio de disolvente del intermedio en metil terc-butil éter (MTBE), que se utilizaba en el procedimiento anterior.

Además, el control de la reacción durante el procedimiento (IPC) se cambió del uso de TLC al procedimiento cuantitativo de ^1H NMR. El procedimiento se optimizó aún más utilizando la eliminación azeotrópica del agua en lugar del secado químico. El uso de 2-metil-tetrahidrofurano como disolvente del procedimiento permitió que el INT12 en solución se utilizara directamente en la etapa 2 del procedimiento sin necesidad de un mayor aislamiento o purificación.

Etapa 2 - Mejoras del procedimiento de mesilación de INT12 para formar INT13

La solución de INT12 en 2-metil-tetrahidrofurano se telescopó directamente en la etapa 2 para preparar (3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritoloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il metanosulfonato (INT13). Este procedimiento mejorado eliminó el uso del ambientalmente indeseable diclorometano como disolvente de la reacción. Además, el procedimiento utilizaba un lavado con cloruro de amonio para controlar aún más la trietilamina residual. Los volúmenes de trabajo se redujeron a un volumen de procedimiento máximo de 12,5 vol., una reducción de 14 vol. Una vez más, el procedimiento se optimizó utilizando la eliminación azeotrópica del agua en lugar del secado químico. El uso de 2-metil-tetrahidrofurano como disolvente del procedimiento permitió utilizar el INT13 en solución directamente en la etapa 3 del procedimiento.

Etapa 3 - Mejoras en el procedimiento de adición de citosina a INT13 para formar INT14

La solución de INT13 en 2-metil-tetrahidrofurano se telescopó directamente en la etapa 3 para hacer INT14. El dimetilsulfóxido (DMSO) se mantuvo como disolvente de la reacción y la eliminación del 2-metil-tetrahidrofurano se realizó por destilación. Se comprobó que una especificación del 27% en peso de 2-metil-tetrahidrofurano frente al producto permitía que la reacción de la etapa 3 funcionara bien. Se realizó un cribado de bases (inorgánicas y aminas) y se comprobó que el carbonato de cesio ofrecía la mayor quimioselectividad y la velocidad de reacción

más rápida. También se realizó un cribado de los disolventes de la reacción y encontraron que el DMSO era el disolvente más adecuado para la reacción.

Además, se estudió el impacto de las cargas de los reactivos, la temperatura y la concentración en la selectividad de los isómeros N- vs O- de INT14. De acuerdo con el procedimiento mejorado de la presente invención, la relación entre los isómeros N y O se mejoró a 99,03:0,97 mediante extracción con disolvente y recristalización/precipitación a partir del 88:12 previamente optimizado, que se aisló mediante cromatografía en columna de SiO₂. El procedimiento inventivo elimina la necesidad de la cromatografía en columna y también proporciona los N-isómeros deseados en más del 99%. En particular, se descubrió que la quimioselectividad se veía afectada principalmente por la temperatura de reacción. En particular, la disminución de la temperatura de reacción redujo la tasa de conversión a producto. La condición de reacción se mejoró aún más aumentando la carga de base y citosina de 2,0 equivalentes a 2,5 equivalentes. La temperatura de reacción se redujo de 40 °C a 35 °C. Además, se modificó el procedimiento de trabajo para reducir el volumen total del procedimiento de 22 vol. a 12,5 vol. para mejorar el rendimiento. El disolvente de trabajo se cambió de acetato de etilo a acetato de isopropilo para permitir que la mezcla de reacción pasara directamente al aislamiento sin necesidad de intercambiar el disolvente. El procedimiento de elaboración también se modificó para comenzar con la tautomerización, ya que se comprobó que el INT14 era más soluble tras el tratamiento con ácido acético. El aislamiento de INT14 se modificó para precipitar inicialmente el producto a partir de acetato de isopropilo a gran volumen antes de reducir el volumen y añadir *n*-heptano. Se comprobó que esta mejora evitaba el engrasado y la adherencia al recipiente antes del aislamiento. Así, se logró una síntesis mejorada en general con una mayor selectividad al cambiar simultáneamente múltiples parámetros de reacción. Se comprobó que la modificación de la temperatura y la concentración tenían un impacto positivo en la tasa de conversión y la quimioselectividad de la alquilación N/O.

Etapas 4 - Procedimiento de desprotección de INT14 para formar RX-3117 anhidro

Las condiciones originales de HCl 2 M en etanol resultaron ser las más estables para el producto y se mantuvieron. Sin embargo, el procedimiento se mejoró reduciendo la temperatura de reacción de 60 °C a 50 °C para favorecer la solubilidad. El subproducto de alcohol tritílico se eliminó mediante lavados con metil terc-butil éter (MTBE). El producto en la fase acuosa se telescopió directamente en el aislamiento de la etapa 5 tras la liberación de la sal de resina.

Etapas 5 - Procedimiento de aislamiento del monohidrato RX-3117

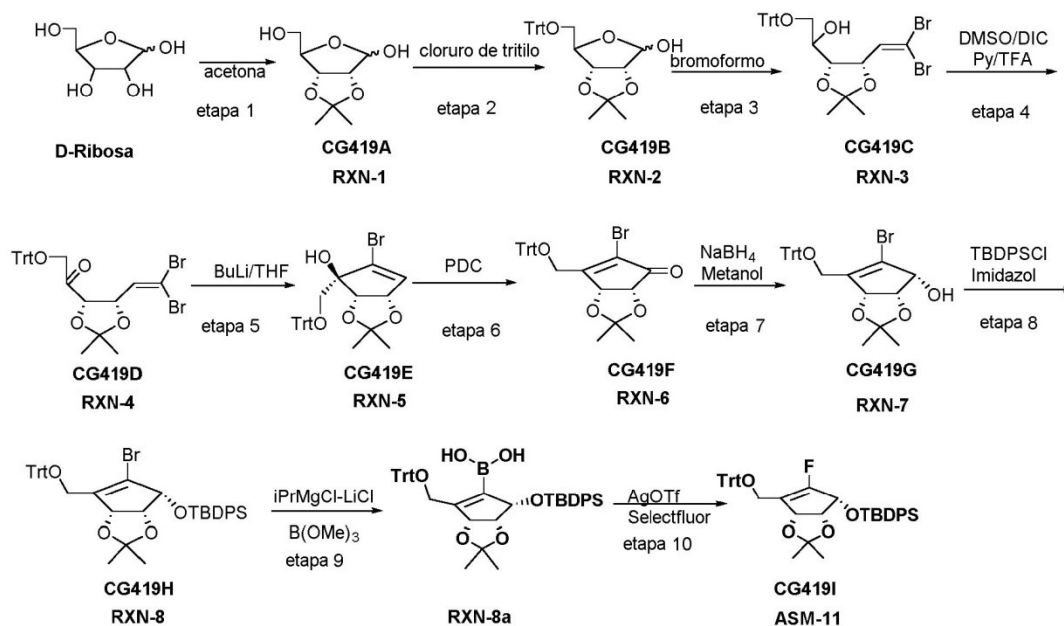
La solución de RX-3117MH se telescopió directamente en la etapa 5. La combinación de las fases 4 y 5, con pequeñas modificaciones en el procedimiento, optimizó el rendimiento y la operatividad a escala. El RX-3117-MH se secó en un filtro bajo aire, lo que permitió controlar las cantidades de acetonitrilo por debajo de la directriz de la ICH, conservando el contenido de agua. Este procedimiento mejorado eliminó el requisito de secar y rehidratar el producto para obtener un producto cristalino. El producto aislado utilizando el procedimiento mejorado tiene una pureza del (99,83%), que era comparable en pureza con la síntesis personalizada del producto en pequeñas cantidades.

Otras mejoras del procedimiento de fabricación de los materiales de partida del RX-3117

Son posibles otras mejoras del procedimiento para la síntesis de los materiales de partida del RX-3117. La síntesis de ASM11 utilizando diferentes intermedios y grupos protectores se muestra a continuación en los esquemas 2 y 3, respectivamente.

Síntesis de ASM11 por Bromo Intermediates

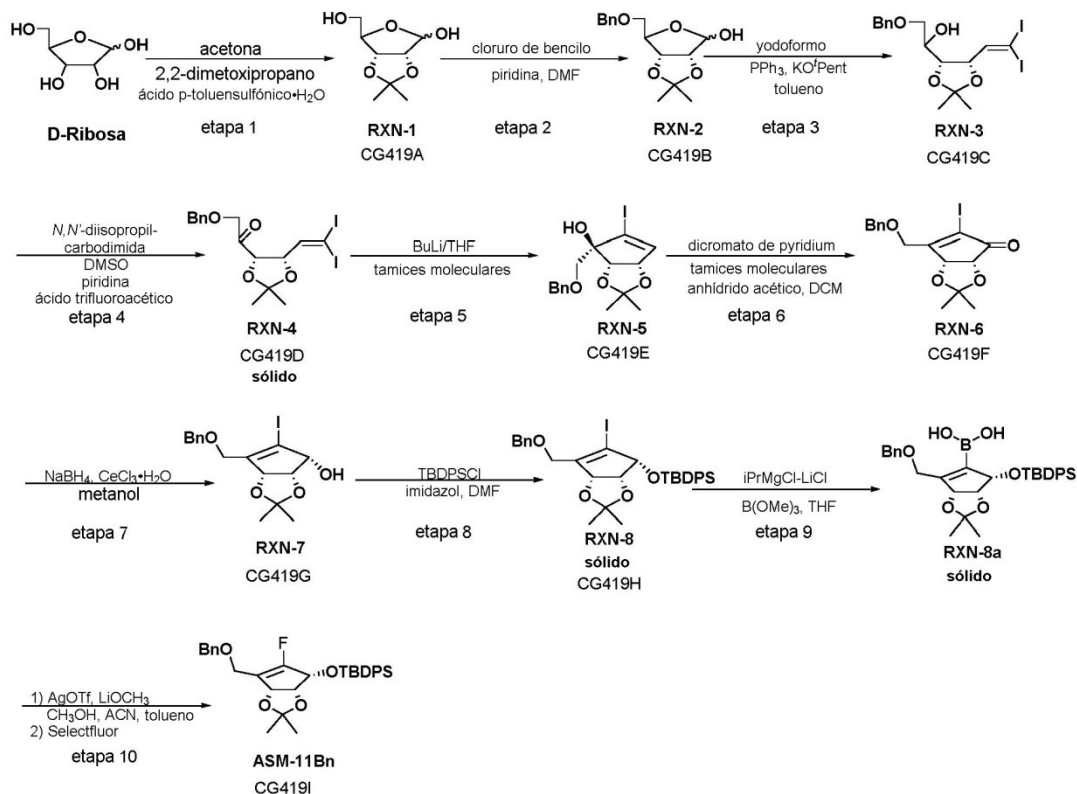
Esquema 2



En la Patente de EE.UU. 9.150.520 se utilizó yodoformo en la etapa 3 de la reacción para convertir el RXN-2 en RXN-3. En la presente invención, el uso de bromoformo o una mezcla de bromo-iodometano para obtener bromointermedios en lugar de yodointermedios. Los bromointermedios pueden ser más estables que su derivado de yodo. Por lo tanto, el rendimiento y la pureza globales pueden aumentar como resultado.

Síntesis de ASM11Bn mediante la protección benzílica del grupo 5-hidroxilo

Esquema 3



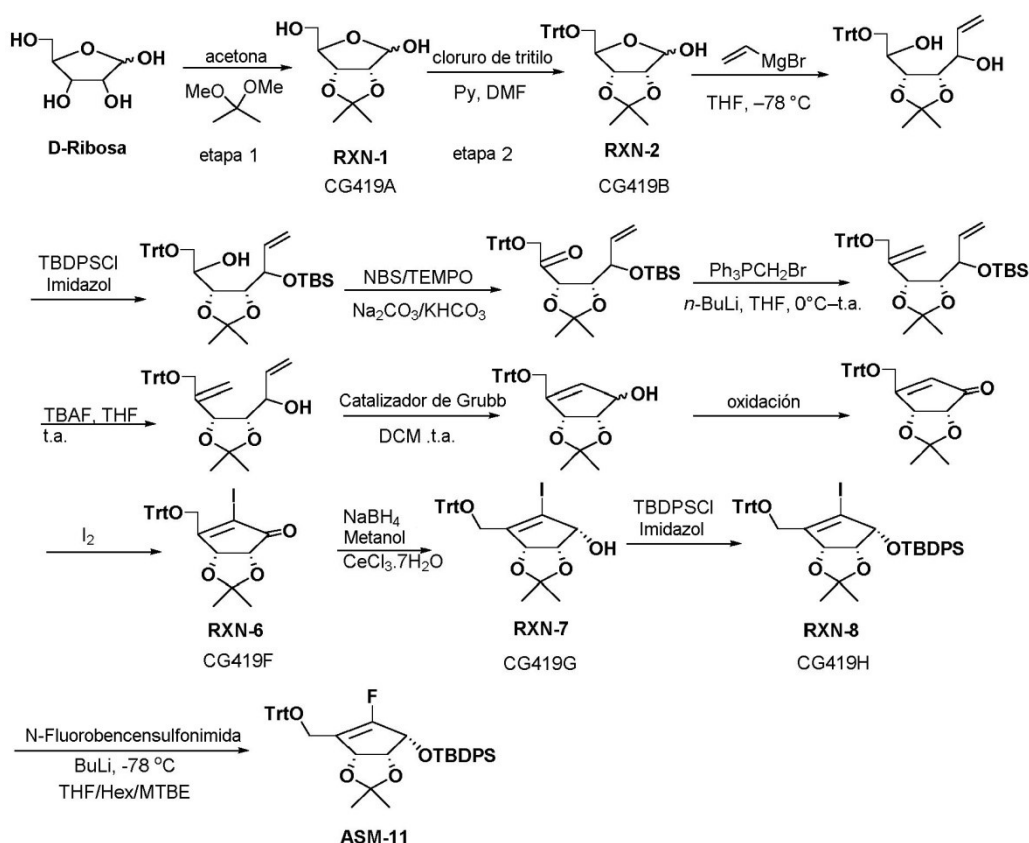
Inesperadamente, los cambios en los grupos protectores colocados en los primeros intermedios pueden tener efectos dramáticos en las etapas de reacción realizados más tarde en el procedimiento, sin requerir la modificación

de numerosas etapas a lo largo del camino. Por ejemplo, si se cambia el grupo protector tritilo por bencilo en la etapa 2, se podría mejorar el rendimiento de la fluoración en la etapa 10 de la reacción. Estas mejoras pueden realizarse sin necesidad de modificar el procedimiento general.

Síntesis de ASM11 por metátesis de cierre de anillo

- 5 Los inventores de la presente invención también desarrollaron esquemas para la síntesis de ASM11 mediante el empleo de metátesis de cierre de anillo. En el esquema 4, se utiliza una reacción de metátesis de cierre de anillo para formar la fracción de anillo de 5 miembros. El rutenio del catalizador de Grubb es recuperable, lo que mejora aún más los procedimientos de ampliación al reducir los residuos y los costes.

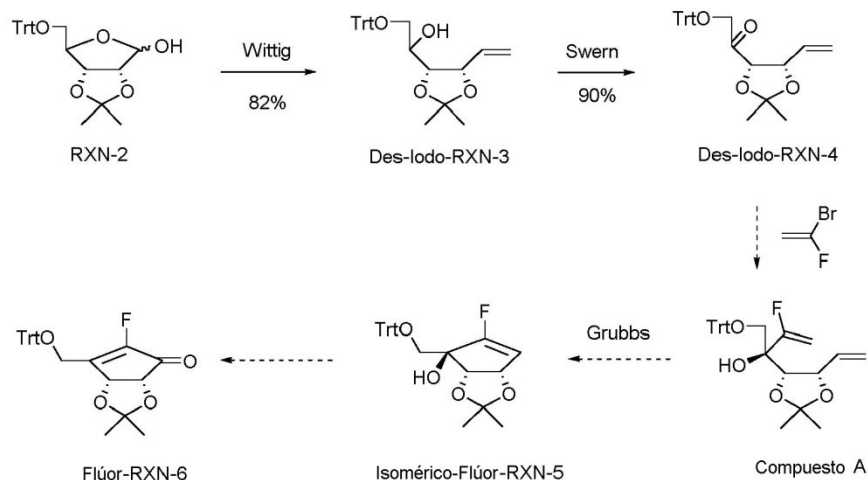
Esquema 4



10 Síntesis del intermedio RXN-6 por metátesis de cierre de anillos

La síntesis del RXN-6 intermedio puede realizarse por metátesis de cierre de anillo, incluyendo el RXN-5 e introducir el átomo de flúor en el anillo de cinco miembros haciendo un RXN-6 fluorado. Como se muestra en el esquema 5, se utiliza una reacción de metátesis de cierre de anillo para formar la fracción de anillo de 5 miembros (Fluoro-RXN-6). Como en el esquema 4, el rutenio del catalizador de Grubb es recuperable

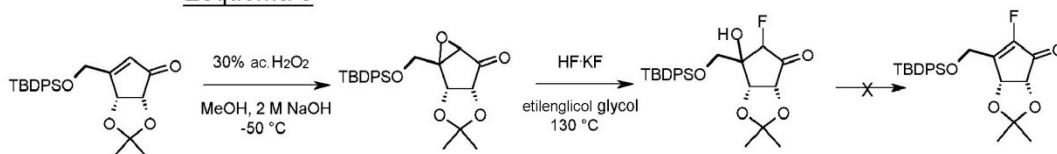
Esquema 5



Síntesis del intermedio RXN-6 por fluoración nucleófila a través de un epóxido

Se puede proporcionar la síntesis del intermedio RXN-6 mediante una fluoración nucleofílica alternativa a través de un epóxido. El esquema 6 muestra la formación de un anillo epóxido a partir del material de partida (3aR,6aR)-6-(((terc-butildifenilsil)oxi)metil)-2,2-dimetil-3a,6a-dihidro-4H-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-ona. El epóxido se abre por fluoración nucleófila utilizando, por ejemplo, fluoruro de potasio. Como alternativa, también puede utilizarse otra fuente de fluoruro, por ejemplo, fluoruro de tetrabutilamonio, para abrir el anillo de epóxido. La eliminación del agua es una etapa difícil en este procedimiento y se pueden utilizar agentes deshidratantes alternativos, como, por ejemplo, sales de trietilamonio carbometoxi, para llegar al intermedio modificado Flouro-RXN6-TBDPS

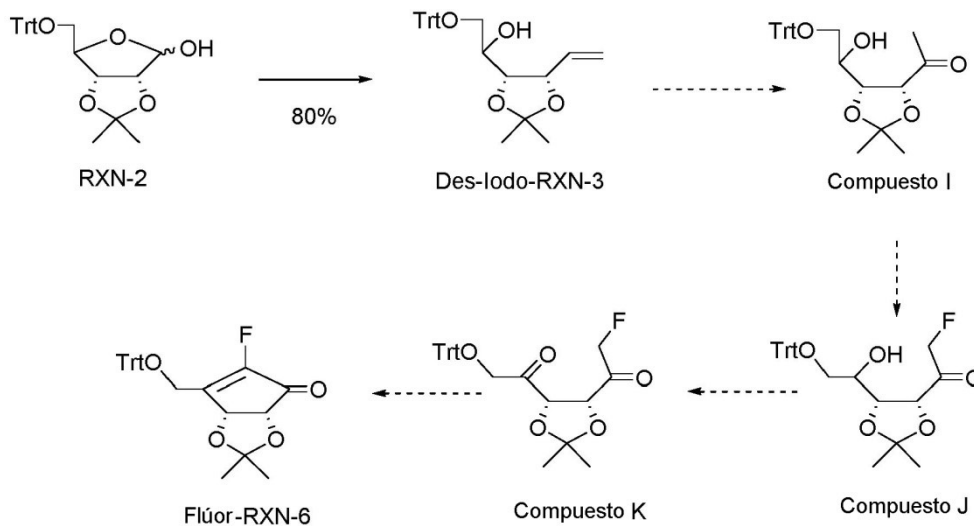
Esquema 6



Síntesis del intermedio RXN6 por condensación aldólica

La síntesis del RXN6 intermedio también se puede llevar a cabo utilizando Condensación Aldólica para introducir un átomo de flúor en el anillo de cinco miembros haciendo un RXN-6 fluorado. Como se muestra en el esquema 7, el átomo de flúor se introduce pronto para formar el derivado fluorado de RXN6 (Fluoro-RXN6). Una condensación Aldólica interna puede formar el anillo de 5 miembros con la fracción de fluoruro de vinilo en su lugar

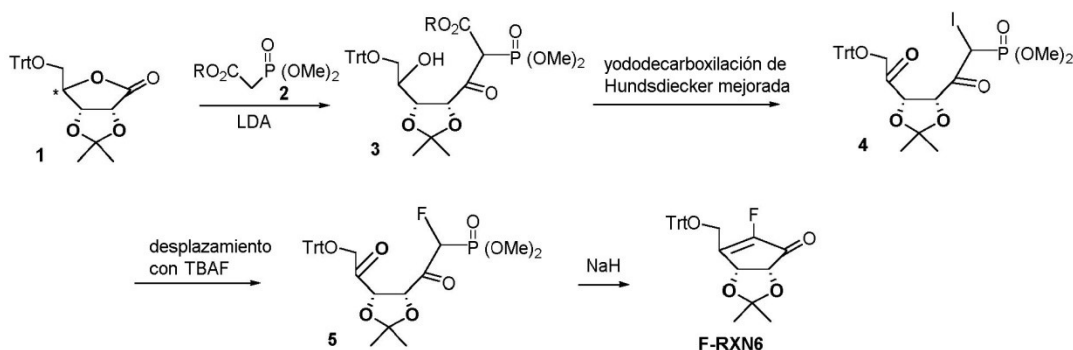
Esquema 7



Síntesis alternativa del intermedio Fluoro-RXN6

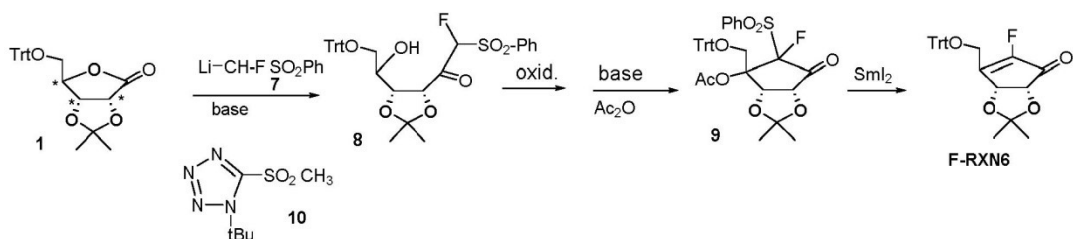
En los esquemas 8 y 9 se muestran otras alternativas para la síntesis del intermediario Fluoro-RXN-6. En el esquema 8, se obtiene una ruta más corta haciendo reaccionar la D-ribolactona **1** con el fosfonato **2** para generar el intermedio **3**. Se comprobó que el derivado de D-ribolactona **1** no reacciona fácilmente con el fluoroalquilfosfonato de dimetilo, pero se puede obtener una mejor reactividad utilizando el carbalcoximetilfosfonato de dimetilo. A continuación, el intermedio **3** se somete a una yododecarboxilación de Hunsdiecker para formar el intermedio **4**, que puede someterse a una sustitución nucleófila con fluoruro de tetra-n-butilamonio (TBAF)

Esquema 8



El esquema 9 (a continuación) proporciona una ruta aún más corta haciendo reaccionar la D-ribolactona **1** con una alquil fenil sulfona **7**, que se prepara mediante reactivos fluorados electrofílicos, para formar el intermedio **8**. El derivado de la D-ribolactona reacciona más fácilmente con la litio fluoroalquil sulfona **7** que con los fluoroalquilfosfonatos. El intermedio **8** puede convertirse en el intermedio **9**, que sufrirá la eliminación para formar F-RXN6. Alternativamente, una opción más eficaz pero más cara es utilizar una sulfona de tetrazolilo fluorado **10** en lugar de la litio fluoroalquil sulfona **7**

Esquema 9

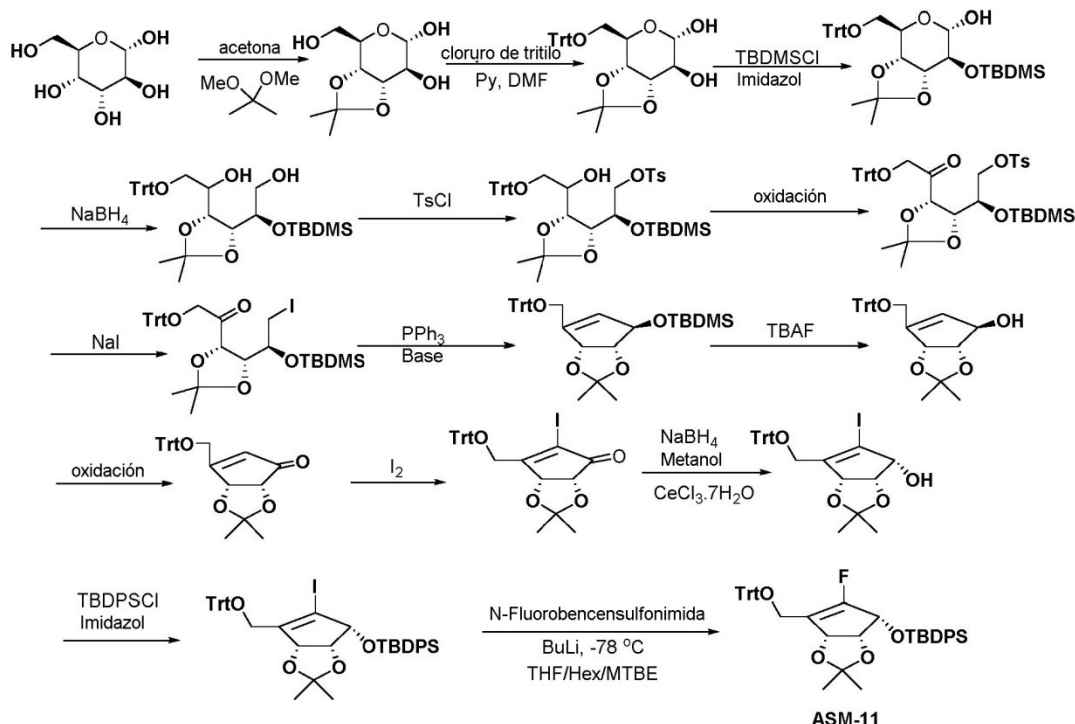


Síntesis con diferentes fuentes quirales

La presente síntesis también puede lograrse utilizando diferentes fuentes quirales como materiales de partida.

En el esquema 10 (a continuación), se utiliza (2S,3S,4R,5S,6R)-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-pirano-2,3,4,5-tetraol como material de partida quiral alternativo para generar ASM-11

Esquema 10



Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan con fines ilustrativos y no deben servir para limitar el alcance de la materia divulgada.

- 5 Los valores de IC₅₀ para las líneas celulares A549, SW1573 y SW1573/G utilizados en el presente documento son de 8,3 µM, 13,7 µM y 7,3 µM, respectivamente, como se indica en Peters y otros, "Metabolismo, mecanismo de acción y perfil de sensibilidad de la fluorociclopentenilcitosina (RX-3117)", Investigational New Drugs, diciembre de 2013, vol. 31, n.º 6, pp. 1444-1457 (disponible en línea en <http://link.springer.com/article/10.1007/s10637-013-0025-x>).

10 Ejemplo 9: Síntesis del monohidrato RX-3117

Preparación de INT14 a partir de ASM11 por reacción continua de las etapas 1 a 3 en reactores fijos

- ASM 11, terc-butil(((3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((triloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)oxi)difenilsilano, (37.65 kg, 1p, 1eq, 55 mol) se disolvió en 2-metil tetrahidrofurano (4,0 vol, 3,4 p). Se añadió TBAF (fluoruro de tetra-n-butilamonio) 1,0 M en THF (tetrahidrofurano, (1,61 vol, 1,45 p, 1,1 eq.) al recipiente de reacción en una porción (adición exotérmica suave controlada) durante 15 a 45 min, manteniendo de 18 a 23 °C. Se cargó el 2-metil tetrahidrofurano (1,0 vol, 0,9 p) en el recipiente como enjuague de la línea manteniendo de 18 a 23 °C y la solución resultante se agitó de 18 a 23 °C durante 6 h hasta completarse por RMN de ¹H. La mezcla de reacción se cargó con hidrogenato de sodio al 8% en peso (3,0 vol) y se agitó a 18-23 °C durante 5-10 min (precaución: exotermia leve) y se dejó que las fases se separaran y se eliminara la fase acuosa inferior (2 x 2,0 vol). La primera extracción con hidrógeno carbonatado de sodio al 8% p/p dio una capa acuosa lechosa y el tiempo de asentamiento prolongado no aclaró la emulsión. Las investigaciones mostraron que la emulsión se limitaba a la capa acuosa y tenía un bajo contenido orgánico, por lo que se continuó el procedimiento. La separación total de la primera extracción fue de 5 horas y 29 minutos. La segunda extracción con hidrogenocarbonato de sodio al 8% en peso se separó sin problemas, tardando sólo 52 minutos. La fase acuosa se extrajo con 2-metil tetrahidrofurano (2,0 vol, 1,7 p) y la línea se enjuagó con 2-metil tetrahidrofurano (2,0 vol, 1,7 p). La fase orgánica combinada que contenía INT12 se calentó a 40-50 °C y se concentró a unos 4 vol a 40-50 °C a presión reducida. Se tomaron muestras para su análisis y se analizaron por Karl-Fischer hasta que el contenido de agua fue ≤0,2% p/p. El procedimiento produjo 158,8 kg de peso neto de alcohol INT12 ASM11 en 2-metiltetrahidrofurano que contenía un 15,3% en peso de alcohol INT12 ASM11, lo que equivale a un rendimiento total del 99,0%. Se determinó un alcohol INT12 ASM11 ((3aS,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((triloxi)metilo)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-ol) con una pureza de área del 92,83% mediante análisis HPLC.

La solución INT12 se devolvió al recipiente, se enfrió a 0-5 °C y se cargó con trietilamina (0,41 vol, 0,30 p, 2,0 eq). Después de enjuagar la línea con 2-metiltetrahidrofurano (1,0 vol, 0,9 en peso), se cargó la solución con cloruro de

metanosulfonilo (0,17 vol, 0,25 en peso, 1,5 eq) diluido en 2-metiltetrahidrofurano (1,0 vol, 0,9 en peso) (mezclar con precaución en el recipiente de cabecera) manteniendo de 0 a 5°C durante al menos 30 min (Exotérmico). Se añadió más 2-metil tetrahidrofurano (0,5 vol, 0,4 p) como enjuague de la línea manteniendo de 0 a 5 °C. El contenido del recipiente se agitó de 0 a 5 °C hasta que la reacción se completó por ¹H NMR después de 1 hora. La muestra representativa se extrajo al cabo de 1 hora y, si fuera necesario, se sacaría del recipiente de reacción cada 2 horas aproximadamente y se analizaría para comprobar el INT12 restante. Después de comprobar el 100% de la conversión mediante análisis de RMN de ¹H, se cargó agua (4,0 vol) manteniendo de 0 a 10 °C y la mezcla de reacción se calentó hasta 18 a 23 °C y se agitó durante 5 a 10 min a 18 a 23 °C. La fase orgánica superior del recipiente se separó y se cargó con una solución de hidrogenocarbonato de sodio al 8% en peso (4,0 vol) manteniendo de 18 a 23 °C. La solución bifásica resultante se agitó a 18-23 °C durante 1 a 2 horas y la fase orgánica separada se cargó con cloruro de amonio acuoso al 20% en peso (2,0 vol) y 2-metil tetrahidrofurano (2,0 vol, 1,7 en peso). Según sea necesario, la temperatura se ajustó a 18-23 °C. El lavado con cloruro de amonio al 20% en peso dio lugar a una vigorosa evolución de gas, probablemente debido a una reacción con el hidrogenocarbonato de sodio residual de la etapa anterior. Después de agitar a 18 a 23 °C durante 5 a 10 min, la fase orgánica superior se separó y se cargó con agua purificada (2,0 vol) ajustada a 18 a 23 °C. La fase orgánica separada que contenía INT13 se concentró a presión reducida a 35 a 45 °C hasta *aprox.* 2 vol. Se realizó un muestreo para el análisis. El procedimiento produjo 78,4 kg de peso neto de ASM11-mesilato INT13 en 2-metiltetrahidrofurano que contenía un 34,9% en peso de ASM11-mesilato INT13, lo que equivale a un rendimiento total del 94,9%. Se determinó por análisis HPLC un ASM11-mesilato INT13 de 62,91% de pureza de área ((3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritoloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il metanosulfonato), con un 32,23% de área de subproducto TBDPS presente.

Continuamente, la solución INT13 se cargó con DMSO (3,8 vol, 4,2 p) y se calentó a 40 a 45 °C para concentrar la fase orgánica a ≤45 °C bajo presión reducida hasta que no se destiló más disolvente (2-metiltetrahidrofurano). La concentración se continuó durante 5 horas y 25 minutos y el IPC por RMN de ¹H mostró un contenido de 2-metiltetrahidrofuran del 8,3% en peso. Después de enfriar la solución a 27-33 °C, se cargó carbonato de cesio (1,2 en peso) y citosina (0,41 en peso). La mezcla de reacción se calentó a 33-37 °C y se agitó hasta completarla por HPLC. El muestreo para el análisis de la relación N/O-alquilación se realizó después de 24 horas y en los puntos de tiempo apropiados a partir del recipiente de reacción. Tras 33 horas y 47 minutos, la reacción se consideró completa con un resultado de CIP del 99,5% de conversión. La relación entre los isómeros N y O fue de 99,03:0,97. Al terminar, la mezcla se cargó con acetato de isopropilo (2,0 vol, 1,7 p) y agua purificada (4,0 vol, 4,0 p) manteniendo ≤50 °C (la adición de agua es exotérmica). Tras agitar de 5 a 15 minutos, se dejó reposar la mezcla bifásica durante 10 minutos y luego se separó la fase orgánica superior. La fase acuosa se reextrajo dos veces para recuperar todo el producto con acetato de isopropilo (2,0 vol, 1,7 p cada uno) agitando a 40-50 °C durante 5-15 minutos y volviendo a dejar reposar durante 10 minutos antes de separar. La fase orgánica combinada se enfrió hasta 25 a 30 °C y se cargó con ácido acético al 10% v/v (3,0 vol) y solución de salmuera al 26% p/p (1,0 vol) manteniendo 25 a 30 °C y la solución bifásica se agitó a 25 a 30 °C durante 30 a 60 min. La fase orgánica superior se lavó tres veces con ácido acético al 10% v/v (3,0 vol) y solución de salmuera al 26% p/p (1,0 vol) manteniendo 25 a 30 °C. En cada etapa de lavado, la solución orgánica superior se muestreó mediante análisis de RMN de ¹H. La fase orgánica se lavó de nuevo con una solución de salmuera al 3% en peso (3x2,0 vol) a 25-30 °C y se tomaron muestras del contenido de ácido acético mediante RMN de ¹H. La fase orgánica que contenía INT14 se calentó hasta 35 a 45 °C y se concentró a unos 5 vol a 35 a 45 °C a presión reducida. La solución se cargó con acetato de isopropilo (3,0 vol, 2,6 p) y se concentró hasta unos 5 vol a 35-45 °C a presión reducida. La solución se cargó de nuevo con acetato de isopropilo (5,0 vol, 4,4 p), se ajustó a 57 a 63 °C, se agitó a 57 a 63 °C durante 1,5 a 3 h y se comprobó por HPLC la cristalización/precipitación. La suspensión se enfrió a 35-45 °C y se concentró a unos 5 vol a 35-45 °C a presión reducida. La lechada se enfrió aún más hasta 18 a 23 °C durante 1,0 a 2,0 h y se cargó con n-heptano (7,0 vol, 4,8 p) manteniendo 18 a 23 °C durante 30 a 90 min. Después de 1 a 2 h a 18-23 °C y de 1 a 2 h a 0-5 °C, la suspensión se filtró a través de una tela de 20 µm y se lavó con n-heptano/acetato de isopropilo premezclado (5:1, 2x1,0 vol) a 0-5 °C. El producto que contenía INT14 se secó al vacío hasta 55 °C y se analizó por RMN de ¹H. Los criterios de aprobación fueron ≤2,0% p/p de acetato de isopropilo y ≤2,0% p/p de n-heptano. El procedimiento produjo un peso neto de 24,27 kg de INT14, 4-amino-1-((3aS,4S,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritoloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)pirimidina-2(1H)-ona, (45 mol, 93,25% de pureza), equivalente a un rendimiento total del 82% y del 64% en peso.

Preparación de RX-3117 monohidrato a partir de INT14 por reacción continua de la etapa 4 a la 5 en reactores fijos

INT14, 4-amino-1-((3aS,4S,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritoloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)pirimidin-2(1H)-one, (24,27 kg, 45 mol, 1,0 p) se cargó en un recipiente seguido de metanol (7,5 vol, 5,9 p) y la temperatura de la mezcla de reacción se ajustó a 18 a 23°C. Al recipiente de reacción se añadió HCl 2 M (1,1 vol, 1,2 eq) manteniendo la temperatura <50°C. La mezcla se calentó hasta 45 a 55°C y se agitó a 45 a 55°C (objetivo 50°C) durante 2 a 2,5h. Se anotó el volumen del recipiente y la mezcla de reacción se destiló a presión reducida manteniendo de 45 a 55°C y manteniendo el volumen constante mediante la adición de MeOH (5,0 vol, 4,0 p). La mezcla se muestreó y se continuó cargando MeOH (2,5 vol 2,0 p) manteniendo el volumen constante por destilación a 45 a 50°C hasta que el área ≤1,0% de acetónido intermedio estuvo presente por HPLC. Una vez completada la conversión, la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta 25 a 30 °C. La mezcla de reacción se concentró a 5

- volúmenes a presión reducida manteniendo de 35 a 45 °C. La mezcla de reacción se enfrió hasta 25 a 30 °C. Al recipiente de reacción se le cargó TBME (metil terc-butil éter) (5,0 vol, 3,7 p) y agua (5,0 vol) manteniendo 25 a 30 °C. La solución bifásica se agitó a 25 a 30 °C durante 10 a 20 min y las fases se separaron a 25 a 30 °C conservando la fase acuosa inferior. La fase inferior retenida se transfirió al recipiente y se recargó con TBME (5,0 vol, 3,7 p) manteniendo 25 a 30 °C. Tras agitar la solución bifásica a 25-30 °C durante 10-20 minutos, se separó la fase acuosa inferior. La fase acuosa inferior se devolvió al recipiente y la línea se enjuagó con agua para la inyección (0,5 vol, 0,5 p). La eliminación del alcohol tritílico se comprobó mediante un ensayo de RMN de ¹H con un contenido de alcohol tritílico del 0,3% en peso. Si el resultado del ensayo no era ≤0,5% en peso de alcohol tritílico, la fase acuosa se cargó con TBME (5,0 vol, 3,7 en peso) y se agitó a 25-30 °C durante 10-20 minutos, repitiéndose entonces la separación. La solución acuosa combinada se ajustó a una temperatura de 18 a 23 °C, se cargó con resina Ambersep 900 (forma OH) pretratada (5/6 del material tratado a granel) y se agitó durante 15 minutos para comprobar el pH. Si el pH era <8,0, se añadió más resina Ambersep 900 (forma OH) y se agitó la solución durante 30 a 45 min a 18 a 23 °C. La lechada se filtró y se lavó con agua para inyección (2x4,0 vol) durante 15 a 30 min por lavado. La torta de filtro de resina en el filtro se lavó con agua para inyección (3x4,0 vol) más durante 15 a 30 min por lavado hasta que se obtuvo un resultado de ≤1,0% por ensayo de HPLC en cada lavado. Los licores madre y los lavados obtenidos que contenían ≥1,0% se clarificaron mediante un filtro de 1µm. La solución se calentó hasta 40 a 45 °C y se concentró a 1,5 vol bajo presión reducida a 40 a 45 °C. Después de enfriar la solución acuosa hasta 18 a 23 °C durante 2 a 3 h y la mezcla se envejeció durante 60 min y se cargó con acetonitrilo (9,5 vol) manteniendo 18 a 23 °C a un ritmo aproximadamente constante durante 1,5 a 2 h. La suspensión se envejeció a 18 a 23 °C durante 2 h y se enfrió a 0 a 5 °C durante 90 min. El sólido se filtró a través de una tela de 20 µm y se lavó con MeCN/agua (5:1, 1,5 vol) y se secó en atmósfera de aire hasta que el contenido de MeCN es <400 ppm por GC. El procedimiento produjo 8,20 kg (99,83% de pureza) de peso neto de RX-3117 monohidrato, 4-amino-1-((1S,4R,5S)-2-fluoro-4,5-dihidroxi-3-(hidroximetil)ciclopent-2-en-1-il)pirimidina-2(1H)-ona 1H₂O, (29,8 mol, 99,83% de pureza), equivalente al 66% de rendimiento total y al 34% en peso.
- La FIG. 29 es una RMN de ¹H que muestra el RX-3117 hecho usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 9 RMN de ¹H (400 MHz, DMSOd₆), δ 7,40ppm, (d, J=7.3Hz, 1H) CH citosina, δ 7,20ppm, (d amplio, J=9,1Hz, 2H) NH₂, δ 5,74ppm, (d, J=7,3Hz, 1H) CH citosina, δ 5,30ppm, s amplio, 1H, CH, δ 5.15ppm, (d, J=7.1Hz, 1H) (OH), δ 5.00ppm, (d, J=6.1Hz, 1H) (OH), δ 4.80ppm, (q, J=5.3Hz, 1H)(OH), δ 4.48ppm, (q, J=5.3Hz, 1H) CH, δ 4.17ppm, (dd, J=9,1Hz, 3,8Hz, 1H) CH, δ 4,13ppm, (dt, J=6,1Hz, 5,8Hz, 1H) CH, δ 3,91ppm, (d amplio, J=12,9Hz, 2,8Hz, 1H) CH.
- La FIG. 30 es una RMN de ¹³C de RX-3117 realizada mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 9.
- La FIG. 31 es una RMN de ¹⁹F de RX-3117 realizada mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 9.
- La FIG. 32 es un espectro de masas de RX-3117 realizado mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 9. El espectro de masas se realizó utilizando el filtro ES+ que muestra la especie protonada de RX-3117 (M+H) así como un aducto de RX-3117 más sodio (M + Sodio) a m/z = 280,0 (una especie común observada durante este procedimiento de análisis). El sodio proviene del procedimiento de análisis, no del procedimiento de fabricación.
- La FIG. 33 es un espectro de masas de RX-3117 realizado mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 9. El espectro de masas se realizó utilizando el filtro ES- que muestra las especies M-H del RX-3117 durante el procedimiento de análisis. Los procedimientos de filtrado ES- y ES+ proporcionan conjuntamente pruebas completas del espectro de masas para RX-3117.
- Para verificar las propiedades cristalinas del material preparado según el procedimiento sintético a gran escala anterior, se realizó una comparación microscópica y con los cristales preparados mediante un procedimiento de alta pureza a escala de laboratorio, así como una comparación de los patrones de difracción de polvo de rayos X. FIG. 34 es una comparación microscópica del RX-3117 hecho según el procedimiento del Ejemplo 9 (fila superior) y preparado mediante un procedimiento a escala de laboratorio (fila inferior) bajo luz polarizada simple (columna izquierda) y luz polarizada cruzada (columna derecha). FIG. 35 son los datos de difracción de polvo de rayos X que comparan el RX-3117 hecho usando una escala de laboratorio (espectro superior) y el RX-3117 hecho usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 9 (espectro inferior). Como puede verse, no hay diferencias significativas en las estructuras cristalinas.
- Será evidente para los expertos en la materia que las realizaciones específicas de la materia divulgada pueden dirigirse a una o más de las realizaciones indicadas arriba y abajo en cualquier combinación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de 4-amino-1-((1S,4R,5S)-2-fluoro-4,5-dihidroxi-3-(hidroximetil)ciclopent-2-en-1-il)pirimidina-2(1H)-ona 1H₂O (RX-3117-MH), que comprende convertir terc-butil(((3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((triloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)oxi)difenilsilano (ASM11) en 4-amino-1-((3aS,4S,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((triloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)pirimidina-2(1H)-ona (INT14) en un procedimiento continuo con más de una etapa sin aislamiento de ningún intermedio, que comprende además convertir INT14 en 4-amino-1-((1S,4R,5S)-2-fluoro-4,5-dihidroxi-3-hidroximetil-ciclopent-2-enil)-1H-pirimidina-2-ona anhidra (RX-3117 anhidra), y convertir RX-3117 anhidra en RX-3117 monohidrato.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la conversión de terc-butil(((3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((triloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)oxi)difenilsilano (ASM11) a (3aS,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((triloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-ol (INT12) comprende las etapas de:
 - disolver el ASM11 en 2-metil tetrahidrofurano;
 - añadir fluoruro de tetra-n-butilamonio para formar INT12 en una solución de reacción; y
 - recuperar el INT12 en una fase orgánica,
 - en el que la recuperación de INT12 comprende opcionalmente las etapas de:
 - lavar la solución de reacción con una solución acuosa;
 - separar una extracción acuosa de la fase orgánica que tiene INT12;
 - lavar la extracción acuosa con 2-metil tetrahidrofurano para extraer INT12 de la extracción acuosa; y
 - combinar el INT12 extraído con la fase orgánica que tiene INT12.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la conversión de (3aS,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((triloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-ol (INT12) en (3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((triloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il metanosulfonato (INT13) comprende las etapas de:
 - añadir trietilamina y cloruro de metanosulfonilo en 2-metil tetrahidrofurano a la fase orgánica que tiene INT12 para formar INT13 en una segunda solución de reacción; y
 - recuperar INT13 en DMSO,
 - en el que la recuperación comprende opcionalmente las etapas de:
 - añadir el DMSO a la segunda solución de reacción con INT13; y
 - eliminar por destilación al menos el 90% en peso de 2-metil tetrahidrofurano.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la conversión de (3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((triloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il metanosulfonato (INT13) en 4-amino-1-((3aS,4S,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((triloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)pirimidina-2(1H)-ona (INT14) comprende las etapas de:
 - añadir 2,5 equivalentes de carbonato de cesio y citosina al INT13 en DMSO para formar la INT14 en una tercera solución de reacción, manteniendo opcionalmente una temperatura de reacción de aproximadamente 33 a 37 °C, en la que la INT14 tiene preferentemente una relación entre los isómeros N y O de más de aproximadamente 95:5.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, que comprende además:
 - la adición de un ácido a la tercera solución de reacción con INT14 para formar 4-amino-1-((1S,4R,5S)-2-fluoro-4,5-dihidroxi-3-(hidroximetil)ciclopent-2-en-1-il)pirimidina-2(1H)-ona (RX-3117); la carga de la mezcla de reacción con metanol y la destilación de la mezcla de reacción para eliminar el acetónido hasta que se detecte un área inferior al 1,0% aproximadamente del acetónido;
 - lavar la RX-3117 con metil terc-butil éter y agua para formar una fase orgánica y una fase acuosa que tenga RX-3117; en el que el lavado comprende opcionalmente:
 - separar la fase acuosa que tiene RX-3117 de la fase orgánica;
 - lavar la fase acuosa que tiene RX-3117 con metil terc-butil éter hasta que se detecte en la fase acuosa menos de aproximadamente el 0,5% p/p de alcohol tritílico;
 - añadir una resina aniónica básica a la fase acuosa que tiene RX-3117 para formar una lechada;
 - filtrar la lechada para retener un licor madre;
 - concentrar el licor madre para formar un concentrado; y
 - añadir acetonitrilo al concentrado para formar RX-3117-MH purificada
6. Un procedimiento continuo de preparación de 4-amino-1-((3aS,4S,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((triloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)pirimidina-2(1H)-ona (INT14) a partir de terc-butil(((3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((triloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)oxi)difenilsilano (ASM11), que comprende las etapas de:
 - disolver el ASM11 en 2-metil tetrahidrofurano;

añadir fluoruro de tetra-n-butilamonio para formar ((3aS,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritoloxi)metilo)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-ol) (INT12);
 añadir trietilamina y cloruro de metanosulfonilo en 2-metil tetrahidrofurano al INT12 para formar ((3aR,4R,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((triloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il metanosulfonato) (INT13); y
 añadir carbonato de cesio y citosina al INT13 para formar 4-amino-1-((3aS,4S,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritoloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)pirimidina-2(1H)-ona (INT14);
 en el que las etapas se realizan en uno o más reactores fijos sin aislamiento de INT12 o INT13.

7. Un procedimiento continuo de preparación de 4-amino-1-((1S,4R,5S)-2-fluoro-4,5-dihidroxi-3-(hidroximetil)ciclopent-2-en-1-il)pirimidina-2(1H)-ona 1H₂O (RX-3117-MH) a partir de 4-amino-1-((3aS,4S,6aR)-5-fluoro-2,2-dimetil-6-((tritoloxi)metil)-4,6a-dihidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-4-il)pirimidin-2(1H)-ona (INT14), que comprende las etapas de:

hacer reaccionar la INT14 con un ácido para formar 4-amino-1-((1S,4R,5S)-2-fluoro-4,5-dihidroxi-3-(hidroximetil)ciclopent-2-en-1-il)pirimidina-2(1H)-ona (RX-3117);
 lavar la RX-3117 con metil terc-butil éter y agua para formar una fase orgánica y una fase acuosa que tenga RX-3117;
 separar la fase acuosa que tiene RX-3117 de la fase orgánica;
 lavar la fase acuosa que tiene RX-3117 con metil terc-butil éter hasta que se detecte en la fase acuosa menos de aproximadamente el 0,5% p/p de alcohol tritílico;
 añadir una resina aniónica fuertemente básica a la fase acuosa que tiene RX-3117 para formar una lechada;
 filtrar la lechada para retener un licor madre;
 concentrar el licor madre para formar un concentrado;
 añadir acetonitrilo al concentrado para formar RX-3117-MH purificada; y
 aislar la RX-3117-MH purificada;
 en el que las etapas se realizan en uno o más reactores fijos.

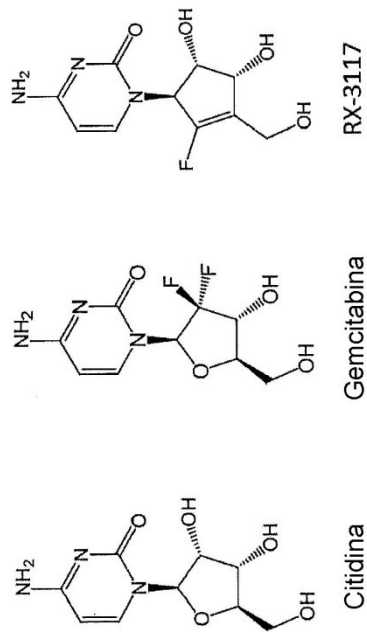


FIG. 14

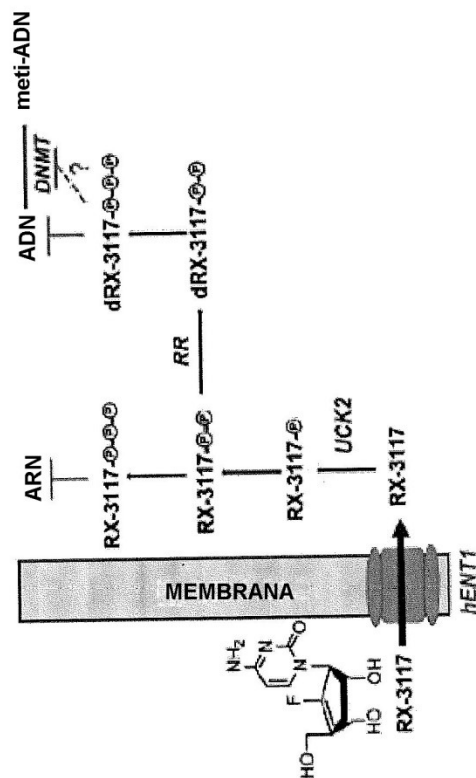
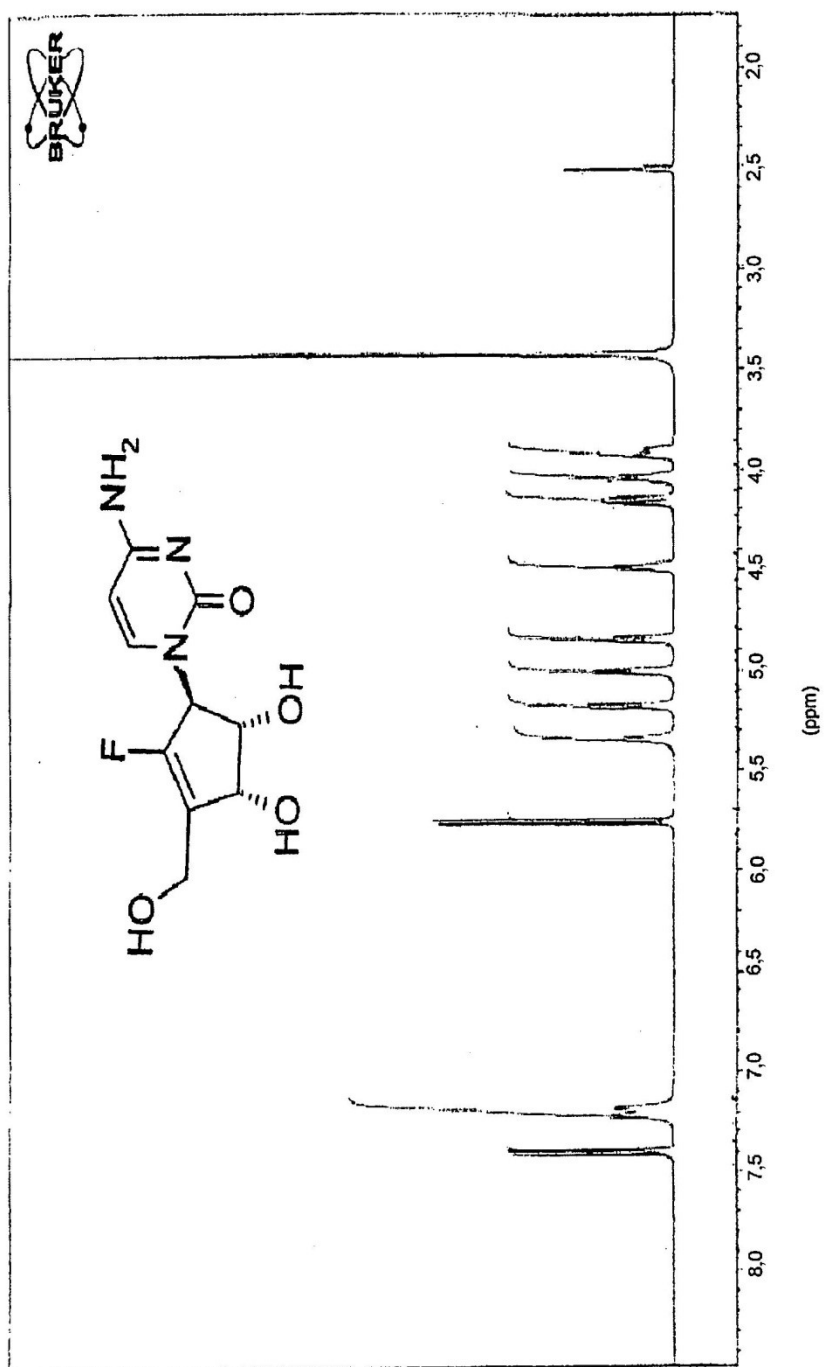


FIG. 21



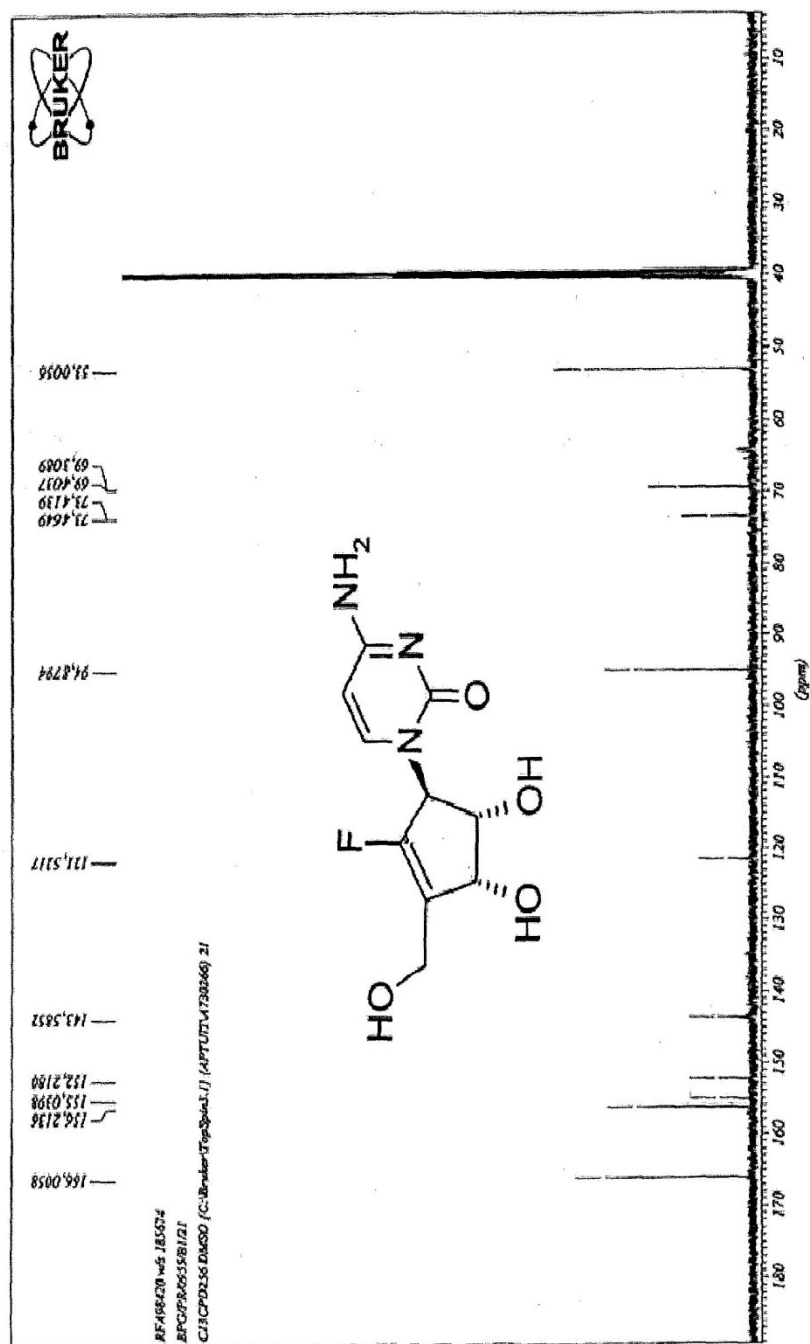


FIG. 30

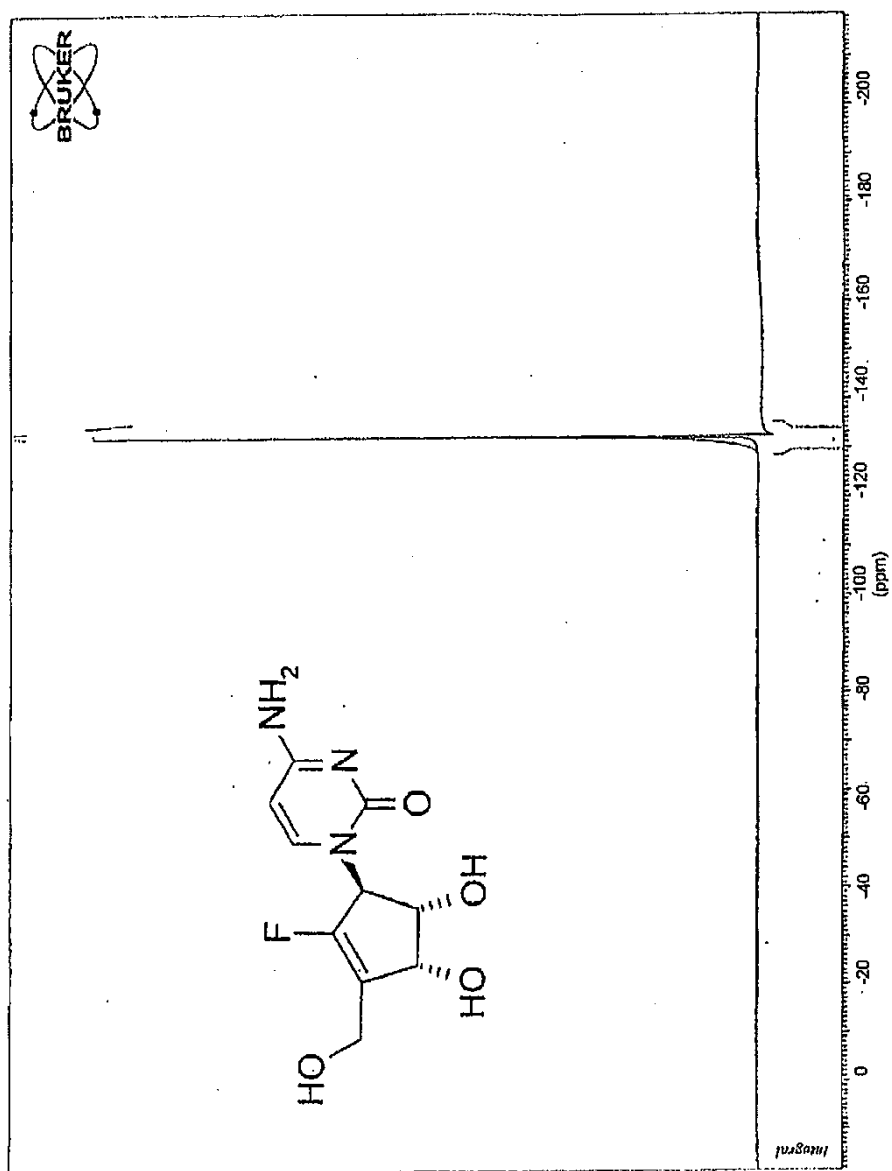


FIG. 31

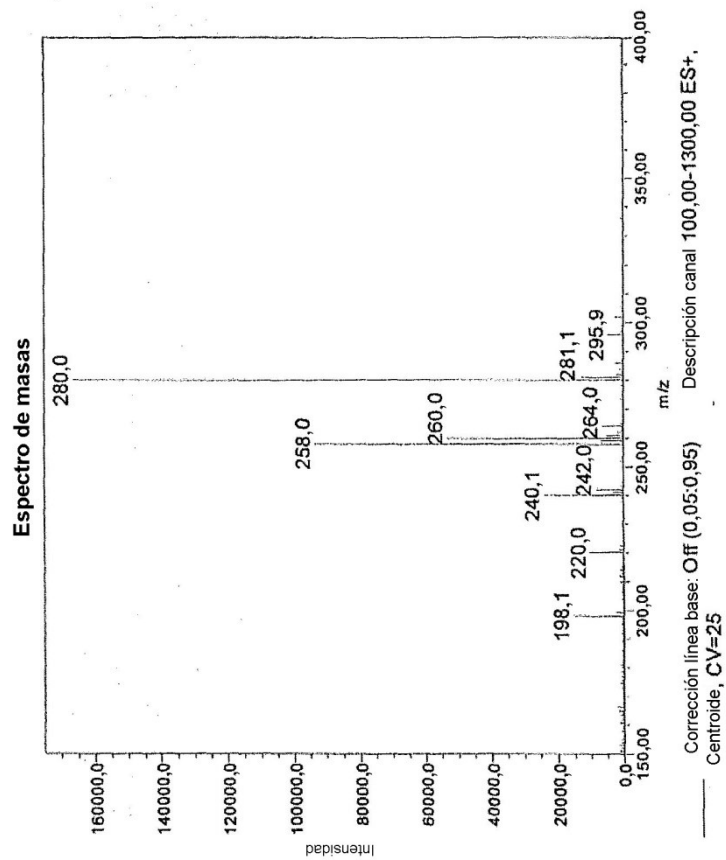


FIG. 32

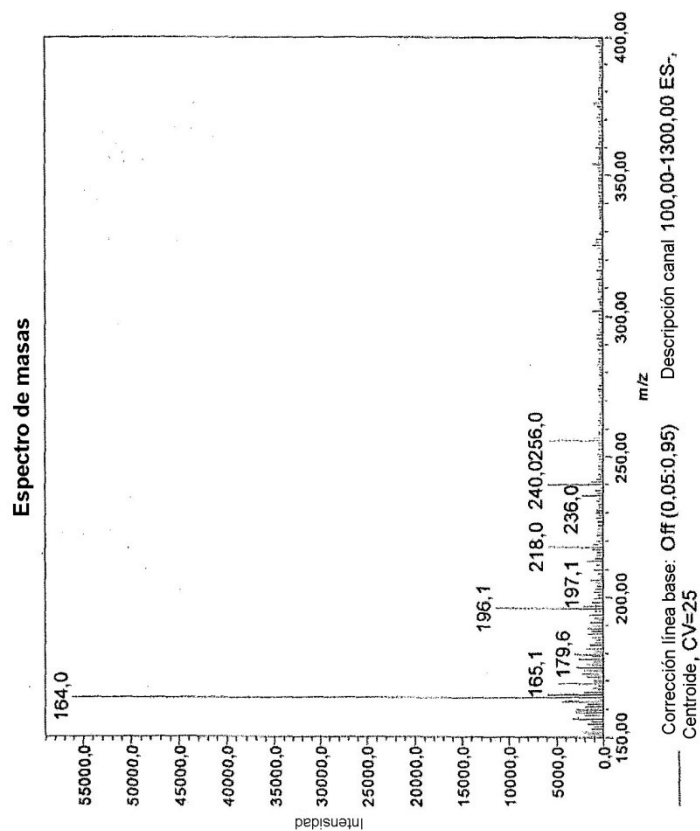


FIG. 33

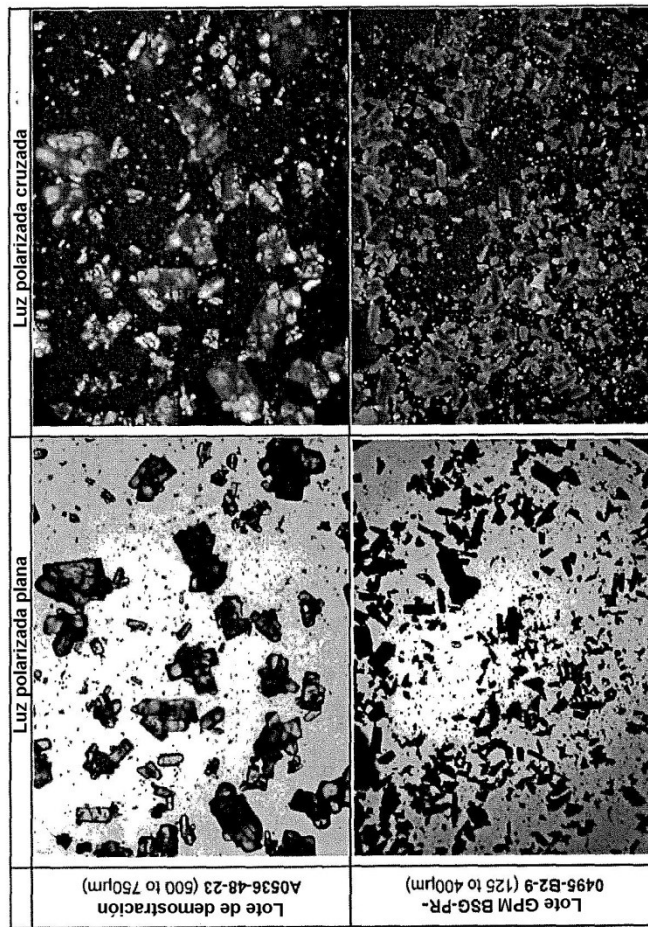


FIG. 34

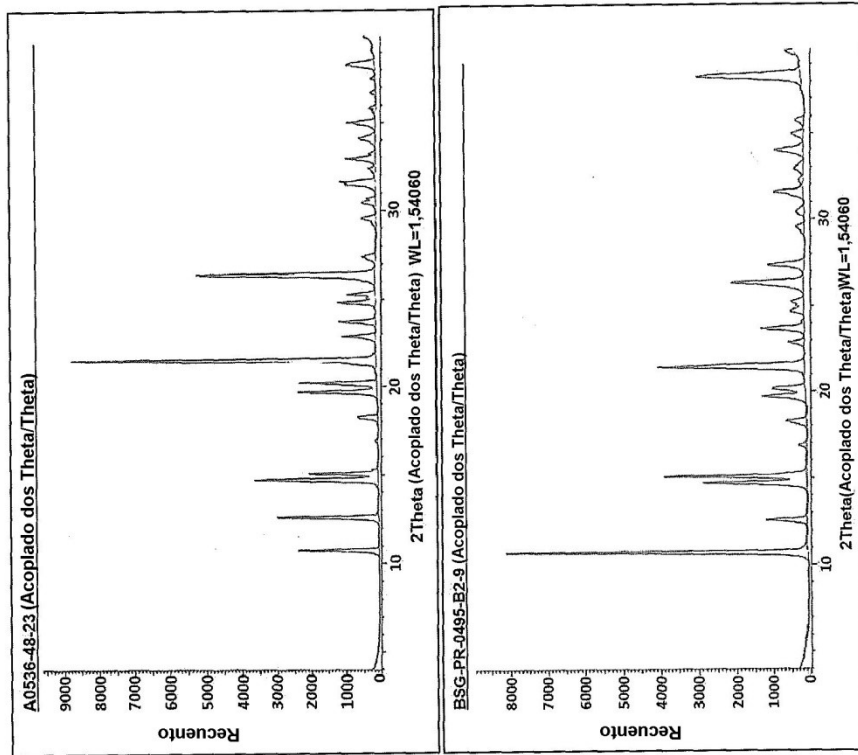


FIG. 35