

PROCESO PARA PREPARAR {6-[(DIETILAMINO)METIL]NAFTALEN-2-IL}METIL [4-(HIDROXICARBAMOIL) FENIL]CARBAMATO DE ALTA PUREZA

Descripción

El objeto de la presente invención es un proceso para obtener {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos con una alta pureza. Dicho proceso permite obtener un producto que tiene una cantidad de una única impureza desconocida igual o menor al 0,10 %, así como un producto que tiene una pureza superior al 99,5 %, preferiblemente igual o superior al 99,6 %.

Otro objeto de la presente invención es un método de HPLC para determinar la pureza del producto y sus posibles impurezas.

Estado de la técnica

El Givinostat®, también conocido como ITF2357, (Nombre IUPAC {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato es un ácido hidroxámico, utilizado en forma de hidrocloruro del mismo, en particular hidrocloruro monohidrato, que actúa como inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y ejerce su acción sobre las enzimas homónimas de clase I y II.

Givinostat muestra un perfil de actividad muy prometedor en mieloma múltiple y leucemia mielógena aguda, tanto in vitro como in vivo, y también actúa como agente antiinflamatorio e inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-1, y secreción de IL-6.

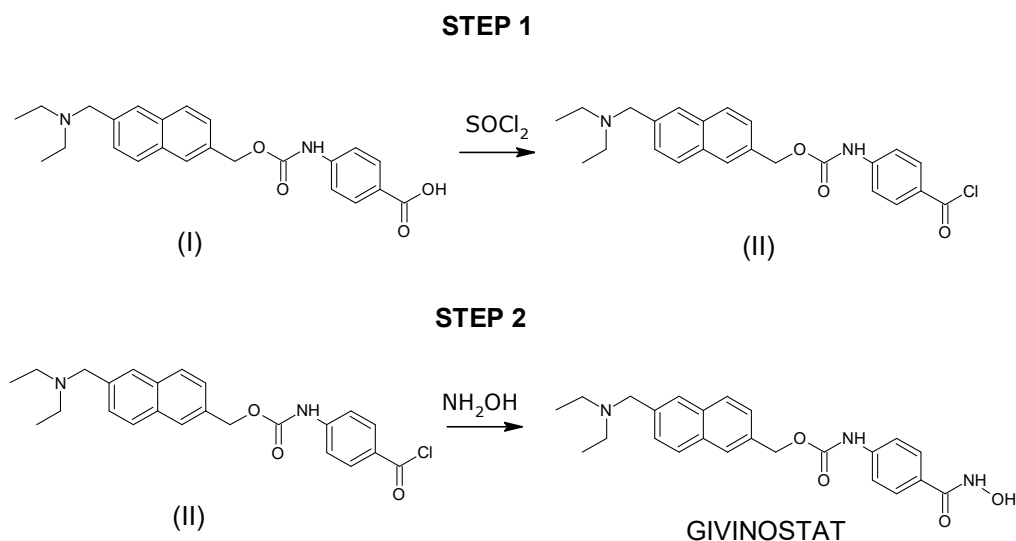
Givinostat se utiliza actualmente en múltiples estudios de fase III para enfermedades inflamatorias (distrofia muscular de Duchenne y Becker, artritis juvenil y policitemia vera) y en ensayos clínicos para cánceres de la sangre (mielomas y linfomas).

US 6.034.096 informa sobre la preparación de Givinostat, mientras que US 7.329.689 y WO2004/065355 abordan la preparación y caracterización de un polimorfo monohidrato del mismo.

US 8,518,988 describe la preparación y caracterización de un polimorfo anhidro de Givinostat.

Los métodos para preparar Givinostat que se describen en los documentos citados proporcionan, en primer lugar, la síntesis del cloruro de acilo (II) a partir del intermedio (I) (PASO 1), que luego se agrega como un sólido húmedo con THF a una solución de hidroxilamina en agua y THF. para generar el producto final (PASO 2), de acuerdo con el siguiente Esquema 1:

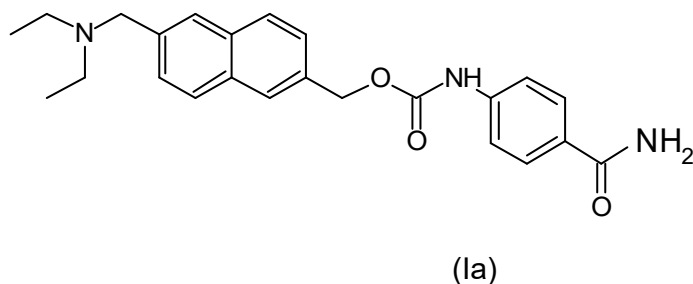
Esquema 1



Los documentos citados anteriormente no describen impurezas derivadas de la síntesis.

La literatura (A. Furlan, V. Monzani, L.L. Reznikov, F. Leoni, G. Fossati. D. Modena, P. Mascagni, C. A. Dinarello, *Mol. Med.* 2011, 17 (5-6) 353-362) aclara que el intermedio (I) (ITF2375) y la amida correspondiente (ITF2374) son los dos metabolitos principales in vivo de Givinostat (ITF2357), derivados de la biotransformación del grupo hidroxámico en ácido carboxílico y amida, respectivamente.

La amida (ITF2374) tiene la siguiente fórmula (Ia):



Por consiguiente, se justifica la presencia de intermedio (I) o amida (Ia) en el Givinostat, en cantidades superiores al 0,15 %, siendo estas impurezas calificadas.

Con base en las directrices vigentes en el campo de la farmacéutica, que prevén una descripción detallada del perfil de impurezas de los principios activos destinados para uso humano, el desarrollo de nuevos procesos para la producción de Givinostat de acuerdo con los estándares de calidad vigentes y la identificación de nuevas técnicas analíticas para determinar la pureza del Givinostat, de tal manera que permita la identificación de la presencia de cualquier impureza, es de fundamental importancia.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos del arte, las anotaciones y otras terminologías científicas utilizadas en este documento tienen los significados conocidos comúnmente por los versados en la materia a la que hace referencia esta descripción. En algunos casos, en el presente documento se definen términos con significados comúnmente conocidos para mayor claridad y/o referencia rápida; por tanto, la inclusión de tales definiciones en el presente documento no debe interpretarse como una diferencia sustancial con respecto a lo que generalmente se entiende en el arte.

El término “excipiente fisiológicamente aceptable” se refiere a una sustancia desprovista de cualquier efecto farmacológico y que no produce reacciones adversas cuando se administran a un mamífero, preferentemente un humano. Los excipientes fisiológicamente aceptables son bien conocidos en el arte y se describen, por ejemplo, en el *Manual de Excipientes Farmacéuticos*, sexta edición de 2009, incorporado aquí por referencia.

El término “excipiente farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sales que tienen la eficacia biológica y las propiedades del compuesto salificado y que no producen reacciones adversas cuando se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser sales orgánicas o inorgánicas; ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, carbonato, hidrocloreuro, hidrobromuro, sulfato, hidrogenosulfato, citrato, maleato, fumarato, trifluoroacetato, 2-naftalenosulfonato y para-toluenosulfonato. Para más información sobre las sales farmacéuticamente aceptables,

consulte el *Manual de sales farmacéuticas*, P. Stahl, C. Wermuth, WILEY-VCH, 127-133, 2008, incorporado aquí por referencia.

Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significa “que incluye, pero no se limita a”) y se deben considerar como un apoyo también para términos como “consiste esencialmente en”, “que consiste esencialmente en”, “consiste en” o “que consiste en”.

Los términos “consiste esencialmente en”, “que consiste esencialmente en” deben interpretarse como términos semicerrados, lo que significa que no se incluyen otros ingredientes que afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la invención (por lo tanto, se pueden incluir excipientes opcionales).

Los términos “consta de”, “que consta de” deben interpretarse como términos cerrados. El término “que tiene alta pureza” se refiere a una pureza superior al 99,5 %, preferiblemente igual o superior al 99,6 %.

Dentro del alcance de la presente descripción, con los términos Givinostat o ITF2357 se busca indicar la sal clorhidrato de {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato, particularmente hidrocloreto monohidrato (CAS n. 732302-99-7). La sal de hidrocloreto tiene, en cambio, un número CAS 199657-29-9 y la base libre tiene un número CAS 497833-27-9.

El término “halógeno” se refiere a flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br) o yodo (I).

El término “disolvente aprótico dipolar no sensible a la acidez” se refiere a un disolvente desprovisto de componentes sensibles a los ácidos. THF es un ejemplo de un disolvente sensible a los ácidos. El DMSO, el acetonitrilo,

la dimetilacetamida o la dimetilformamida, en cambio, son ejemplos de disolventes no sensibles a la acidez.

El término “impureza desconocida” se refiere a cualquier impureza desconocida presente en {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Breve descripción de la invención

Con referencia a los procesos para la preparación de Givinostat utilizados en el estado de la técnica, los inventores han observado que estos procesos proporcionan Givinostat con un contenido de impureza única desconocida superior al 0,10 %.

Por consiguiente, el solicitante, frente al problema de desarrollar un nuevo proceso para preparar Givinostat con un contenido de una impureza única desconocida igual o inferior al 0,10 % (% de área en el cromatograma de HPLC), que es el nivel esperado por ICH para impurezas desconocidas, cuando la dosis diaria del principio activo es inferior a 2 g, como en el caso de Givinostat.

Inesperadamente, se ha encontrado que en el PASO 1 (Esquema 1), es crítico realizar la reacción de halogenación del intermedio (I) en un disolvente desprovisto de componentes sensibles al ácido para reducir los equivalentes de agente halogenante necesarios para completar la reacción deseada, mientras se obtiene el intermedio (II) que tiene una cantidad de impurezas menor que la obtenida aplicando la técnica conocida.

De manera igualmente inesperada, los inventores encontraron que, en el PASO 2 (Esquema 1), el orden de adición del intermedio (II) y la

hidroxilamina es crítico para obtener un producto final que tenga una impureza única desconocida igual o menor al 0,10 % por área en el cromatograma de análisis de pureza relativa.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención hace referencia a un proceso para preparar {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo que tienen una cantidad de cualquier impureza única desconocida igual o inferior al 0,10 % y/o alta pureza.

En una realización preferida, el proceso de la presente invención permite obtener {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo que tienen una pureza superior al 99,5 %, preferiblemente igual o superior al 99,6 %.

De acuerdo con un segundo aspecto de la misma, la presente invención se refiere a {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, preferiblemente clorhidrato, más preferiblemente hidrocloruro monohidrato, que tiene una cantidad de cualquier impureza única desconocida igual o inferior al 0,10 % o que tiene una cantidad de cualquier impureza única distinta del intermedio (I) o amida (Ia) igual o inferior al 0,15 %, preferiblemente igual o inferior de 0,10 %.

De acuerdo con un tercer aspecto la misma, la presente invención se refiere a {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, preferiblemente clorhidrato, más preferiblemente clorhidrato monohidrato,

que tiene una pureza superior al 99,5 %, preferiblemente igual o superior al 99,6 %.

De acuerdo con un cuarto aspecto la misma, la presente invención se refiere a un nuevo método analítico de HPLC para determinar la pureza del {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo y detectar sus impurezas.

De acuerdo con un quinto aspecto la misma, la presente invención se refiere a {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, preferiblemente clorhidrato, más preferiblemente clorhidrato monohidrato, que tiene una cantidad igual o inferior al 0,10 % de una impureza desconocida a un RRT de $0,93 \pm 0,02$ y/o una impureza desconocida a un RRT de $1,21 \pm 0,02$ y/o una impureza desconocida a un RRT de $1,51 \pm 0,02$ y/o de una impureza desconocida a un RRT $1,75 \pm 0,02$, midiéndose el RRT utilizando el método de HPLC de acuerdo con la invención.

De acuerdo con un sexto aspecto la misma, la presente invención se refiere a un proceso para preparar {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, que comprende el método de HPLC para determinar la pureza de acuerdo con la invención.

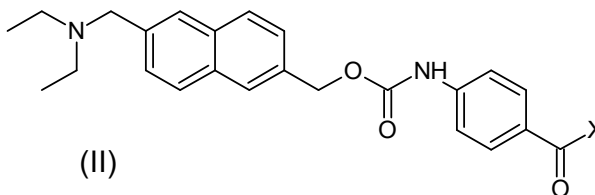
Descripción de las Figuras

La **Figura 1** muestra el cromatograma obtenido por el método HPLC de acuerdo con la invención, sobre una mezcla preparada *ad hoc* que contiene todas las impurezas típicas de Givinostat.

Descripción detallada de la invención

Un objeto de la presente invención es un proceso para preparar {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo que tienen una cantidad de cualquier impureza única desconocida igual o inferior al 0,10 %, en donde dicho proceso comprende los pasos de:

- i) preparar una solución o suspensión del compuesto de fórmula (II) en un disolvente orgánico:



en donde X es un halógeno, preferiblemente cloro;

- ii) añadir hidroxilamina a la solución o suspensión obtenida en el paso i).

Dentro del alcance de esta descripción, los pasos i) y ii) se denominarán **PASO 2** de acuerdo con el proceso de la invención.

En una realización preferida, el disolvente orgánico del paso i) en el ETAPA 2 se selecciona del grupo que comprende THF, metil-THF, dioxano, etilenglicol dimetiléter y bis(2-metoxietil) éter.

Preferiblemente, dicho disolvente orgánico se usa en una cantidad comprendida entre 1 y 100 partes en volumen por parte en peso del compuesto de fórmula (II).

Preferiblemente, dicho disolvente orgánico tiene un contenido de agua inferior al 0,5 %.

Preferiblemente, el paso ii) en el PASO 2 del proceso de acuerdo con la invención se lleva a cabo a temperatura ambiente.

En una realización preferida, el proceso de la presente invención (PASO 2) se caracteriza porque comprende, además, un paso iii) de aislar {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato como base libre o como sal farmacéuticamente aceptable, preferiblemente clorhidrato, más preferiblemente clorhidrato monohidrato.

En otra realización preferida, el compuesto de fórmula (II) se obtiene a partir del correspondiente ácido de fórmula (I) por reacción con un agente halogenante, preferiblemente un agente clorante (paso a), en un disolvente dipolar aprótico insensible a la acidez.

Preferiblemente, el compuesto de fórmula (II) se aísla de la mezcla de reacción mediante precipitación con disolvente orgánico, preferiblemente seguido de filtración (paso b).

Dentro del alcance de esta descripción, los pasos a) y b) se denominarán **PASO 1** de acuerdo con el proceso de la invención.

El disolvente insensible a la acidez es un disolvente desprovisto de componentes sensibles a los ácidos (por lo tanto, desprovisto de THF, por ejemplo). Esta característica del disolvente permite utilizar cantidades reducidas de agente halogenante comparado con el arte previo.

A modo de ejemplo, THF representa un disolvente sensible a los ácidos, ya que en condiciones ácidas puede degradarse y generar especies reactivas que pueden formar subproductos no deseados en la reacción de halogenación.

Preferiblemente, en el paso a) del PASO 1, dicho disolvente dipolar aprótico insensible a la acidez se selecciona entre DMSO, acetonitrilo, dimetilacetamida o dimetilformamida, más preferiblemente dimetilformamida.

Ejemplos de agentes clorantes que pueden usarse en el proceso de la presente invención son cloruro de tionilo (SOCl_2), tricloruro de fósforo (PCl_3), oxiclорuro de fósforo (POCl_3) o pentacloruro de fósforo (PCl_5). Alternativamente, pueden usarse los correspondientes agentes bromantes SOBr_2 , PBr_3 , POBr_3 o PBr_5 .

En una realización preferida del paso b) en el PASO 1, el disolvente orgánico usado para precipitar el compuesto (II) se selecciona de hidrocarburos alifáticos o aromáticos, éteres, ésteres o alcoholes, más preferiblemente tolueno o THF.

Otro objeto de la presente invención es {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo que tienen una cantidad de cualquier impureza única desconocida igual o inferior al 0,10 %, obtenible mediante aplicación con respecto a la técnica conocida únicamente del PASO 2, tal como se define anteriormente.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere a {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo que tienen una pureza superior al 99,5 %, preferiblemente igual o superior al 99,6 %, mediante aplicación con respecto a la técnica conocida tanto del PASO 1 como del PASO 2, tal como se definió anteriormente.

Otro objeto de la presente invención es {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, preferiblemente clorhidrato, más preferiblemente hidrocloreuro monohidrato, que tiene una cantidad de cualquier impureza única desconocida igual o inferior al 0,10 % o que tiene una cantidad de cualquier impureza única distinta del intermedio (I) o amida (Ia) igual o inferior al 0,15 %, preferiblemente igual o inferior de 0,10 %.

Otro objeto de la presente invención es {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, preferiblemente clorhidrato, más preferiblemente clorhidrato monohidrato, que tiene una pureza superior al 99,5 %, preferiblemente igual o superior al 99,6 %.

Otro objeto de la presente invención es {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, preferiblemente clorhidrato, más preferiblemente clorhidrato monohidrato, que tiene una cantidad igual o inferior al 0,10 % de una impureza desconocida a un RRT de $0,93 \pm 0,02$ y/o una impureza desconocida a un RRT de $1,21 \pm 0,02$ y/o una impureza desconocida a un RRT de $1,51 \pm 0,02$ y/o de una impureza desconocida a un RRT $1,75 \pm 0,02$, midiéndose el RRT utilizando el método de HPLC de acuerdo con la invención.

En una realización preferida, el RRT se mide usando el siguiente método de HPLC:

- Fase estacionaria: soporte a base de partículas de sílice que contienen cadenas de alquilo C18 y que tienen una carga de carbono inferior al 9 % en peso;

Fase Móvil A: Agua tamponada a pH 3,7-3,8

Fase Móvil B: Metanol tamponado a pH 3,7-3,8

utilizando el siguiente método de elución en gradiente:

Tiempo (min)	Eluyente A % (v/v)	Eluyente B % (v/v)
0	75	25
5	75	25
35	10	90
40	10	90
40,1	75	25
50 (tanda final)	75	25

Preferiblemente, se usa un tampón de formiato de amonio-ácido fórmico a un pH de 3,7-3,8.

Preferiblemente, se usa un detector UV de 263 nm.

Preferiblemente, la temperatura de la columna es de 25 ± 1 °C.

Preferiblemente, el volumen de inyección es de 5 µL.

Preferiblemente, la velocidad de flujo es de 0,25 mL/min.

Preferiblemente, la muestra del producto se diluye en DMSO.

Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil)fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, tal como se define arriba, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida de la composición farmacéutica, el principio activo está en forma de partículas micronizadas, que tienen un tamaño medio menor de 200 µm, preferiblemente entre 100 µm y 1 µm, más preferiblemente entre 50 µm y 5 µm.

Otro objeto de la presente invención es, también, un método para determinar la pureza del producto {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-

(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo que comprende eluir el producto a través de una columna de HPLC que tiene una fase estacionaria que contiene cadenas de alquilo unidas a un soporte inorgánico, por ejemplo sílice, y la posterior detección del mismo producto y sus impurezas utilizando un detector adecuado para medir la cantidad de analito que eluye de la columna, por ejemplo un detector de tipo UV, MS o RID.

En una realización preferida del proceso de acuerdo con la invención, dichas cadenas de alquilo son de tipo octadecilo, octilo o butilo (C18, C8 o C4), preferiblemente C18. En una realización aún más preferida, la fase estacionaria consiste en un soporte de sílice, derivatizado con cadenas de alquilo C18, que tiene una carga de carbono inferior al 9 % en peso.

Carga de carbono significa el contenido de carbono, como % en peso, de la fase estacionaria unida a la sílice. Las altas cargas de carbono (15-25 %) hacen que la superficie de la fase estacionaria sea más hidrófoba y que pueda retener las impurezas más hidrófobas, lo que hace imposible la correcta evaluación cuantitativa de las mismas.

Varias columnas de este tipo se encuentran disponibles en el mercado, como por ejemplo ACE 5 C18-300, Halo C18 (núcleo sólido), YMC-Pack OSD-A, BioBasic-18 PEEK. En una realización preferida, se utiliza una columna Halo C18-90 Å (código 95812-902 producido por Advanced Materials Technology).

Se pueden usar diferentes eluyentes seleccionados entre agua, un disolvente orgánico polar o una mezcla de los mismos con las combinaciones de fase estacionaria y detector descritas anteriormente.

Dicho disolvente orgánico polar es un alcohol C1-C4, preferiblemente metanol o acetonitrilo.

Preferiblemente, en el método de HPLC de la presente invención se pueden usar mezclas de agua y metanol, agua y acetonitrilo, opcionalmente con o sin un gradiente de elución, opcionalmente con o sin tampones. Preferiblemente, las mezclas mencionadas anteriormente se pueden usar con la adición de un tampón. Más preferiblemente, un tampón de formiato de amonio-ácido fórmico a un pH de 3,7-3,8.

En una realización preferida, como método de elución se utiliza un ciclo cromatográfico de acuerdo con el siguiente esquema:

Tiempo (min)	Eluyente A % (v/v)	Eluyente B % (v/v)
0	75	25
5	75	25
35	10	90
40	10	90
40,1	75	25
50 (ciclo final)	75	25

en donde Eluyente A significa agua y tampón de formiato de amonio-ácido fórmico a un pH de 3,7-3,8, y Eluyente B significa metanol y tampón de formiato de amonio-ácido fórmico a un pH de 3,7-3,8.

Otro objeto de la presente invención es, también, un proceso para preparar {6-[(dietilamino)metil]naftalen-2-il}metil [4-(hidroxicarbamoil) fenil]carbamato

y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, que comprende el método para determinar la pureza de acuerdo con la invención.

Los ejemplos expuestos en la siguiente sección experimental deben considerarse como ejemplos del proceso objeto de la presente invención y no constituyen una limitación al alcance de validez de la invención como tal.

PARTE EXPERIMENTAL

EJEMPLO 1 (comparativo)

Síntesis del Intermedio (II) de acuerdo con el Arte Previo

Se cargan 73 g (0,1796 moles) de Intermedio (I) y 1,12 L de THF seco en un reactor de 2 L previamente secado y bajo atmósfera inerte. La suspensión obtenida se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se baja la temperatura interna a 3 ± 5 °C y se añaden 64 g de cloruro de tionilo (0,538 moles) durante 5 minutos, luego la mezcla de reacción se calienta a temperatura de reflujo y se sigue agitando durante aproximadamente 1 hora. Se añaden 2 g de DMF seca y la mezcla se agita durante 4 horas más a la misma temperatura. A continuación, la mezcla de reacción se concentra a una presión reducida hasta obtener un volumen residual de aproximadamente 0,3 L. Luego, se cargan 0,35 L de tolueno y se concentra nuevamente la mezcla. Esta operación se repite una vez más. Luego de enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se agrega THF seco (0,7 L) y se agita la mezcla durante aproximadamente 30 minutos. A continuación, se filtra el precipitado blanco del Intermedio (II) y se lava con THF seco. El producto húmedo (107 g) se almacena a 5 °C y se utiliza tal cual.

EJEMPLO 2 (comparativo)

Síntesis de Givinostat de acuerdo con el proceso del estado del arte
(Experimento TT180)

Se cargan 125 mL de THF seco y 60 mL de agua en un reactor de 1 L, previamente secado y bajo atmósfera inerte. Se añade hidroxilamina acuosa (21 g, 50 % p/p) a esta solución y la mezcla resultante se enfría a 5 °C. Se cargan 19 g de Intermedio (II) húmedo del Ejemplo 1 (correspondientes a 13 g del material de partida, Intermedio (I)) en una sola porción y se aumenta gradualmente la temperatura interna hasta 20 ± 3 °C. Se observa una disolución gradual y se sigue agitando la mezcla resultante durante 30-40 minutos. A continuación, se agrega agua (55 mL) y luego se agrega lentamente una solución acuosa de HCl 6N (aproximadamente 60 g) hasta alcanzar un pH <2, mientras se mantiene la temperatura interna a 20 ± 3 °C. Luego, se elimina el THF bajo presión reducida hasta que el volumen total se reduce aproximadamente a la mitad y se observa un precipitado blanco. La mezcla se enfría a 10 °C y se sigue agitando a esta temperatura durante 30 minutos. El producto se aísla mediante filtración al vacío y se lava con agua. Se obtienen 16,4 g de Givinostat crudo húmedo.

Se suspende Givinostat crudo en una solución de NaHCO₃ (6,5 g) en 285 mL de agua a 20 ± 3 °C, luego se agrega THF (265 mL) y se observa una disolución gradual. La solución resultante se agita durante 30 minutos y luego se agrega acetato de etilo (132 mL). Después de 15 minutos, se detiene la agitación y se deja que se separen las dos fases. Se descarta la fase acuosa y se trata la fase orgánica con HCl al 37 %, agitando vigorosamente hasta alcanzar un pH <2. La suspensión resultante se agita

durante 30 minutos, luego se aísla el precipitado mediante filtración al vacío y se lava con THF. Se obtienen 17 g de Givinostat puro húmedo.

El producto se seca en estufa a 30 °C bajo presión reducida durante 16 horas. Se obtienen 7,2 g de Givinostat puro seco, con una pureza del 98,8 % y que muestra la presencia de una impureza desconocida al 0,23 %.

EJEMPLO 3

Síntesis de Givinostat de acuerdo con el proceso del arte previo para el PASO 1 y el proceso de la invención para el PASO 2 (experimento TT177)

En un reactor de 1 L, previamente secado y bajo atmósfera inerte, se suspenden 29,3 g de Intermedio (II) húmedo del Ejemplo 1 (correspondientes a 20 g de Intermedio de materia prima (I)) en 192 mL de THF seco y se lleva la temperatura interna a 20 ± 3 ° C. Se añade hidroxilamina acuosa (32 g, 50 % p/p) en una sola porción y se sigue agitando la mezcla durante 30-40 minutos. A continuación, se agrega agua (176 mL) y se observa una disolución gradual del precipitado. Se agrega lentamente una solución acuosa de HCl 6N (aproximadamente 93 g) hasta alcanzar un pH < 2, mientras se mantiene la temperatura interna a 20 ± 3 °C. Luego, se elimina el THF bajo presión reducida hasta que el volumen total se reduce aproximadamente a la mitad y se observa un precipitado blanco. La mezcla se enfría a 10 °C y se sigue agitando a esta temperatura durante 30 minutos. El producto se aísla mediante filtración al vacío y se lava con agua. Se obtienen 29 g de Givinostat crudo húmedo.

Se suspende Givinostat crudo húmedo en una solución de NaHCO₃ (10 g) en 408 mL de agua a 20 ± 3 °C, luego se agrega THF (408 mL) y se observa una disolución gradual. La solución resultante se agita durante 30 minutos y

luego se agrega acetato de etilo (204 mL). Después de 15 minutos, se detiene la agitación y se deja que se separen las dos fases. Se descarta la fase acuosa y se trata la fase orgánica con HCl al 37 %, agitando vigorosamente hasta alcanzar un pH <2. La suspensión resultante se agita durante 30 minutos, luego se aísla el precipitado mediante filtración al vacío y se lava con THF. Se obtienen 31 g de Givinostat puro húmedo.

El producto se seca en estufa a 30 °C bajo presión reducida durante 16 horas. Se obtienen 15,6 g de Givinostat puro seco. El análisis de pureza por HPLC muestra que el producto no contiene impurezas desconocidas en cantidades superiores al 0,10 %.

EJEMPLO 4

Síntesis de Givinostat de acuerdo con el proceso del arte previo para el PASO 1 y el proceso de la invención para el PASO 2 (experimento TT183)

En un reactor de 1 L, previamente seco y bajo atmósfera inerte, se suspenden 29,3 g de Intermedio (II) húmedo del Ejemplo 1 (correspondientes a 20 g de Intermedio de materia prima (I)) en 192 mL de THF seco y se lleva la temperatura interna a 20 ± 3 °C. Se añade hidroxilamina acuosa (32 g, 50 % p/p) vertiéndola durante 15 minutos y se sigue agitando la mezcla durante 30-40 minutos. A continuación, se agrega agua (176 mL) y se observa una disolución gradual del precipitado. Se agrega lentamente una solución acuosa de HCl 6N (aproximadamente 91 g) hasta alcanzar un pH < 2, mientras se mantiene la temperatura interna a 20 ± 3 °C. Luego, se elimina el THF bajo presión reducida hasta que el volumen total se reduce aproximadamente a la mitad y se observa un precipitado blanco. La mezcla se enfría a 10 °C y se sigue agitando a esta temperatura

durante 30 minutos. El producto se aísla mediante filtración al vacío y se lava con agua. Se obtienen 36 g de Givinostat crudo húmedo.

Se suspende Givinostat crudo húmedo en una solución de NaHCO_3 (10 g) en 408 mL de agua a 20 ± 3 °C, luego se agrega THF (408 mL) y se observa una disolución gradual. La solución resultante se agita durante 30 minutos y luego se agrega acetato de etilo (204 mL). Después de 15 minutos, se detiene la agitación y se deja que se separen las dos fases. Se descarta la fase acuosa y se trata la fase orgánica con HCl al 37 %, agitando vigorosamente hasta alcanzar un pH <2. La suspensión resultante se agita durante 30 minutos, luego se aísla el precipitado mediante filtración al vacío y se lava con THF. Se obtienen 27 g de Givinostat puro húmedo.

El producto se seca en estufa a 30 °C bajo presión reducida durante 16 horas. Se obtienen 15,4 g de Givinostat puro seco. El análisis de pureza por HPLC muestra que el producto no contiene impurezas desconocidas en cantidades superiores al 0,10 %.

EJEMPLO 5

Síntesis de Givinostat de acuerdo con el proceso del arte previo para el PASO 1 y el proceso de la invención para el PASO 2. Escala industrial

En un reactor de 1 L, previamente secado y bajo atmósfera inerte, se suspenden 50,0 kg de Intermedio (II) húmedo (correspondientes a 40 g de Intermedio de materia prima (I)) en 400 mL de THF seco y se lleva la temperatura interna a 20 ± 3 °C. Se añade hidroxilamina acuosa (67,2 kg, 50 % p/p) vertiéndola durante 15 minutos y se sigue agitando la mezcla durante 30-40 minutos. A continuación, se agrega agua (447 L) y se observa una disolución gradual del precipitado. Se agrega lentamente una solución

acuosa de HCl 6N (aproximadamente 170 kg) hasta alcanzar un pH < 2, mientras se mantiene la temperatura interna a 20 ± 3 °C. Luego, se elimina el THF bajo presión reducida hasta que el volumen total se reduce aproximadamente a la mitad y se observa un precipitado blanco. La mezcla se enfría a 10 °C y se sigue agitando a esta temperatura durante 30 minutos. El producto se aísla mediante filtración al vacío y se lava con agua. Se obtienen 60 kg de Givinostat crudo húmedo.

Se suspende el Givinostat crudo húmedo en una solución compuesta por NaHCO₃ (21 kg) en 860 L de agua y 860 L de THF a 20 ± 3 °C, observándose una disolución gradual. La solución resultante se agita durante 30 minutos y luego se agrega acetato de etilo (440 L). Después de 15 minutos, se detiene la agitación y se deja que se separen las dos fases. Se descarta la fase acuosa y se trata la fase orgánica con HCl al 37 %, agitando vigorosamente hasta alcanzar un pH <2. La suspensión resultante se agita durante 30 minutos, luego se aísla el precipitado mediante filtración al vacío y se lava con THF. Se obtienen 58 kg de Givinostat puro húmedo.

El producto se seca en estufa a 30 °C bajo presión reducida durante 16 horas. Se obtienen 35 kg de Givinostat puro seco. El análisis de pureza por HPLC muestra que el producto no contiene impurezas desconocidas en cantidades superiores al 0,10 % y que tiene una pureza general superior al 99,5 %.

EJEMPLO 6 (experimento TT259)

Síntesis de Givinostat de acuerdo con el proceso de la invención (PASO 1 + PASO 2)

STEP 1: Síntesis del Intermedio (II)

Se cargan 100 g (0,2460 moles) de Intermedio (I) y 300 mL de dimetilformamida en un reactor de 3 L, previamente secado y bajo atmósfera inerte. La suspensión así obtenida se agita a 20-25 °C durante 30 minutos. Se agregan 40 g (0,3362 moles) de cloruro de tionilo, observándose una ligera exotermia, que se contiene para mantener la mezcla de reacción a 20-25 °C. La suspensión obtenida se mantiene a 20-25 °C durante otras 2 horas, luego se realizan dos ciclos de vacío y se restablece la presión con nitrógeno, para eliminar los gases producidos por la reacción. Luego se añaden 2000 mL de THF, manteniendo la mezcla a 20-25 °C durante 1 hora. A continuación, se filtra la suspensión en un buchner y se lava con 300 ml de THF. Se almacena el producto húmedo (133 g) a 5 °C y se utiliza tal cual.

PASO 2: Síntesis de Givinostat

Se cargan 133 g del Intermedio (II) del PASO 1 y 960 mL de THF en un reactor de 3 L, previamente secados y bajo atmósfera inerte. La suspensión obtenida se agita y se termostatiza a 12-18 °C. Se añaden 160 g (2,424 moles) de una solución acuosa de hidroxilamina al 50 % p/p a la suspensión (la reacción es exotérmica y la temperatura de la mezcla va de 15° C a 28 °C). Luego se termostatiza a 17-23 °C y se mantiene en estas condiciones durante 40'.

A continuación, manteniendo la misma temperatura, se agregan 1100 mL de agua desionizada, observándose la disolución gradual del precipitado. Al final, se añaden 220 g de solución acuosa de HCl al 15 % p/p, hasta alcanzar un pH de la mezcla de 1,2-1,8. La mezcla se sigue agitando durante 30 minutos a 17-23 °C, luego se concentra a presión reducida mientras se mantiene la temperatura interna de 25 °C hasta un volumen residual de

aproximadamente 1400 mL. Luego se restablece la presión y se cargan 1000 mL de agua desionizada. A continuación, se enfría la mezcla a 7-13 °C y se sigue agitando durante 1 hora. La suspensión se filtra lavando con 400 mL de agua desionizada acidificada con 1,2 g de HCl al 37 %.

El filtrado húmedo se vuelve a cargar en el reactor en el que se añaden 5 kg de bicarbonato de sodio, 1000 ml de agua desionizada y 1000 ml de THF. La mezcla se agita y se calienta a 47-53 °C, manteniéndola en estas condiciones durante 3 horas. A continuación, se enfría la mezcla a 17-23 °C y se deja que se sedimenten las fases. La fase acuosa separada se vuelve a extraer con 500 mL de acetato de etilo. A continuación, se combinan los extractos orgánicos y se añaden a estos 200 mL de HCl al 37 %, agitando fuertemente y observándose la precipitación del producto. Se sigue agitando la mezcla por 30 minutos; a continuación, se filtra y se lava el panel con 400 mL de THF.

El filtrado húmedo se vuelve a cargar en el reactor en el que se añaden 5 kg de bicarbonato de sodio, 1000 ml de agua desionizada y 1000 ml de THF. Se agita la mezcla a 17-23 °C, manteniendo estas condiciones durante 30 minutos. Luego se añaden 500 mL de acetato de etilo a la mezcla a 17-23 °C, agitando durante 15 minutos. Se deja que se sedimenten las fases y la fase orgánica separada se filtra en un microfiltro de 10 micrones. A continuación, se lava el reactor y las líneas con una mezcla de 120 mL de THF y 60 mL de acetato de etilo, y se añaden 200 mL de HCl al 37 % a las fases orgánicas combinadas, observándose la precipitación del producto. Se sigue agitando la mezcla por 30 minutos; a continuación, se filtra y se lava el panel con 400 mL de THF. El producto se descarga (157 g) y se seca al

vacío (< 50 mbar) a 25-35 °C durante 15 horas. Se obtienen 107 g de producto final.

EJEMPLO 7 (experimento TT267)

Síntesis de Givinostat de acuerdo con el proceso de la invención (PASO 1 + PASO 2)

Se repite una preparación de Intermedio (II), que luego se transforma en Givinostat, tal como se describe en el Ejemplo 6. Al final del proceso se obtienen 105 g de producto.

EJEMPLO 8 (experimento TT287)

Síntesis de Givinostat de acuerdo con el proceso de la invención (PASO 1 + PASO 2)

Se cargan 100 g (0,2460 moles) de Intermedio (I) y 300 mL de dimetilformamida en un reactor de 3 L, previamente secado y bajo atmósfera inerte. La suspensión obtenida se agita a 20-25 °C durante 30 minutos. A continuación, se agregan 40 g (0,3362 moles) de cloruro de tionilo, observándose una ligera exotermia contenida para mantener la mezcla de reacción a 20-25 °C. La suspensión obtenida se mantiene a 20-25 °C durante otras 2 horas, luego se realizan dos ciclos de vacío y se restablece la presión con nitrógeno, para eliminar los gases producidos por la reacción. Luego se agregan 2000 mL de tolueno, manteniendo la mezcla a 20-25 °C durante 1 hora. A continuación, se filtra la suspensión en un buchner y se lava con 300 ml de tolueno. El producto húmedo (133 g) se almacena a 5 °C y se utiliza tal cual.

Se cargan 133 g del Intermedio (II) de la preparación descrita y 960 mL de THF en un reactor de 3 L, previamente secados y bajo atmósfera inerte. La

suspensión obtenida se agita y se termostatiza a 12-18 °C. Se añaden 160 g (2,424 moles) de una solución acuosa de hidroxilamina al 50 % p/p a la suspensión (la reacción es exotérmica y la temperatura de la mezcla va de 15 °C a 28 °C). Luego se termostatiza a 17-23 °C y se mantiene en estas condiciones durante 40'.

A continuación, manteniendo la misma temperatura, se agregan 1100 mL de agua desionizada, manteniendo la temperatura a 17-23 °C y observándose la disolución gradual del precipitado. Al final, se añaden 220 g de solución acuosa de HCl al 15 % p/p, hasta alcanzar un pH de la mezcla de 1,2-1,8. Se sigue agitando durante 30 minutos a 17-23 °C, luego se concentra a presión reducida mientras se mantiene la temperatura interna a 25 °C hasta alcanzar un volumen residual de aproximadamente 1400 mL. Se restablece la presión y se cargan 1000 mL de agua desionizada. A continuación, se enfría a 7-13 °C y se sigue agitando durante 1 hora. La suspensión se filtra lavando con 400 mL de agua desionizada acidificada con 1,2 g de HCl al 37 %.

El filtrado húmedo se vuelve a cargar en el reactor en el que se añaden 5 kg de bicarbonato de sodio, 1000 ml de agua desionizada y 1000 ml de THF. La mezcla se agita y se calienta a 47-53 °C, manteniendo estas condiciones durante 3 horas. A continuación, se enfría la mezcla a 17-23 °C y se deja que se sedimenten las fases. La fase acuosa separada se vuelve a extraer con 500 mL de acetato de etilo. A continuación, se combinan los extractos orgánicos y se añaden a estos 200 mL de HCl al 37 %, agitando fuertemente y observándose la precipitación del producto. Se sigue agitando la mezcla

por 30 minutos; a continuación, se filtra y se lava el panel con 400 mL de THF.

El filtrado húmedo se vuelve a cargar en el reactor en el que se añaden 5 kg de bicarbonato de sodio, 1000 ml de agua desionizada y 1000 mL de THF. Se agita la mezcla a 17-23 °C, manteniendo estas condiciones durante 30 minutos. Luego se añaden 500 mL de acetato de etilo a la mezcla a 17-23 °C, agitando durante 15 minutos. Se deja que se sedimenten las fases y la fase orgánica separada se filtra en un microfiltro de 10 micrones. A continuación, se lava el reactor y las líneas con una mezcla de 120 mL de THF y 60 mL de acetato de etilo, y se añaden 200 mL de HCl al 37 % a las fases orgánicas combinadas, observándose la precipitación del producto. Se sigue agitando la mezcla por 30 minutos; a continuación, se filtra y se lava el panel con 400 mL de THF. El producto se descarga (157 g) y se seca al vacío (< 50 mbar) a 25-35 °C durante 15 horas. Se obtienen 107 g de producto final.

EJEMPLO 9

Método de HPLC para determinar la pureza de Givinostat y sus impurezas

Condiciones operativas	
Cromatografía:	Shimadzu LC (o equivalente)
Detector:	UV
Columna:	Halo C18-90 Å (250 x 2,1 µm (Código 95812-902, Advanced materials Technology)
Temperatura de la columna	25 ± 1°C
Volumen de inyección:	5 µL
Fase Móvil:	Fase A: 1000 mL de agua + 1,23 g de formiato de amonio + 0,6 ml de ácido fórmico

	Fase B: 1000 ml de metanol + 1,23 g de formiato de amonio + 0,6 ml de ácido fórmico Sonicar las fases durante 10-15 min. Ver gradiente (tabla que se muestra a continuación)
Velocidad de flujo:	0,25 mL/min
Longitud de onda	UV de 263/nm
Diluyente	DMSO

Tiempo (min)	Eluyente A % (v/v)	Eluyente B % (v/v)
0	75	25
5	75	25
35	10	90
40	10	90
40,1	75	25
50 (ciclo final)	75	25

Preparación de la muestra

Pese con precisión unos 20 mg de muestra de ITF2357, transfírela a un matraz de 100 mL y llénelo hasta el volumen con DMSO (conc. 0,20 mg/mL).

En la **Figura 1** se muestra un cromatograma típico obtenido por el método HPLC de acuerdo con la invención, en una mezcla preparada *ad hoc* que contiene todas las impurezas típicas del producto.

EJEMPLO 11

Análisis de pureza para Givinostat obtenido con el proceso del arte previo (Ejemplo 2), con el proceso conocido en la técnica para el PASO 1 y proceso de la invención para el PASO 2 (Ejemplos 3 y 4) y con el proceso de la invención tanto para el PASO 1 como para el PASO 2 (Ejemplos 6, 7 y 8)

Tabla 1

Experimento		RRT 0,93 ±0,02 (17,6 min)	RRT 1 [Givinost at] (18,9 min)	RRT 1,08 ±0,02 [Amida (la)] (20,4 min)	RRT 1,21 ±0,02 (22,9 min)	RRT 1,27 ±0,2 [Int.(I)] (24,0 min)	RRT 1,51 ±0,02 (28,5 min)	RRT 1,75 ±0,02 (33,1 min)
TT 180 Ejemplo 2 (estado de la técnica)	acoplamiento fino	0,15	96,75	--	0,70	1,50	---	0,73
	crudo	0,21	96,84	--	0,43	1,81	---	0,57
	puro	0,03	98,83	--	0,23	0,73	0,06	0,06
TT 177 Ejemplo 3 (invención, solo PASO 2)	acoplamiento fino	0,14	97,66	--	0,25	1,11		0,68
	crudo	0,14	97,94	--	0,17	1,11	---	0,57
	puro	0,02	99,35	0,02	0,09	0,42	0,05	0,05
TT 183 Ejemplo 4 (invención, solo PASO 2)	acoplamiento fino	0,12	98,34	--	0,28	0,64	---	0,61
	crudo	0,12	98,43	--	0,20	0,68	---	0,54
	puro	--	99,41	--	0,07	0,29	0,05	0,05
TT 259 Ejemplo 6 (invención, PASO 1 + PASO 2)	acoplamiento fino	0,13	98,97	--	0,49	0,36	---	---
	crudo	0,25	98,83	--	0,42	0,46	---	---
	puro	---	99,62	--	---	0,38	---	---
TT 267 Ejemplo 7 (invención, PASO 1 + PASO 2)	acoplamiento fino	0,11	98,98	--	0,51	0,40	---	---
	crudo	0,11	98,90	--	0,52	0,44	---	---
	puro	---	99,61	--	---	0,39	---	---
TT 287 Ejemplo 8 (invención, PASO 1 + PASO 2)	acoplamiento fino	0,12	98,86	--	0,47	0,55	---	---
	crudo	0,13	98,82	--	0,48	0,57	---	---
	puro	---	99,57	--	---	0,43	---	---

Particularmente, la Tabla 1 muestra los tiempos de retención relativos de Givinostat (RRT 1), metabolito amida (Ia) (RRT 1.08), intermedio (I) (RRT 1.27) e impurezas desconocidas, evaluados por el análisis HPLC descrito en el Ejemplo 9.

El experimento TT 180 (Ejemplo 2) se refiere a la repetición del proceso utilizado en el arte previo, mientras que los experimentos TT 177 (Ejemplo 3) y TT 183 (Ejemplo 4) se refieren a experimentos en los que el método de la presente invención se aplica con respecto al PASO 2, en el que se añade una solución acuosa de hidroxilamina al 50 % a una solución de intermedio (II) producido de acuerdo con la técnica conocida, disuelto en THF.

Es evidente, a partir del análisis de los datos de pureza en la Tabla 1, que el orden de adición inverso (hidroxilamina a intermedio (II)) en comparación con el estándar (intermedio (II) a hidroxilamina) permite obtener una reducción de todas las impurezas desconocidas por debajo del 0,10 % con base en el producto de reacción final. Viceversa, usando el proceso estándar, una impureza resulta estar muy por encima del límite de 0,10 %.

Otro aspecto crítico para limitar la formación de impurezas es la cantidad de agua contenida en la mezcla que contiene el intermedio (II) a la que se añade hidroxilamina, que debe limitarse al 0,5 % con base en el peso de la mezcla. Por otro lado, el tiempo de adición de hidroxilamina no constituye una limitación mientras que, a diferencia del método del arte previo, el método de la presente invención permite operar a temperatura ambiente en lugar de a 5 °C.

En los Ejemplos 6, 7 y 8, se han aplicado tanto las innovaciones de la presente invención, con respecto al PASO 1 como al PASO 2. Quedará

claro, a partir de los valores indicados en la tabla, que Givinostat se obtiene con una pureza superior al 99,5 %, preferiblemente igual o superior al 99,6 %, y que no se detectan impurezas desconocidas (límite de detección del método 0,02 %).