

Optimización de proceso y escalado de VIREST. Un nuevo principio activo para el tratamiento de conjuntivitis virales.

L. Gandolfi, D. Fischer, C. García, E. Elhalem, M. Córdoba, M.J. Comin
Programa de Fortalecimiento de la Cadena de Valor de la Industria Farmacéutica y Farmoquímica
INTI Química
gandolfi@inti.gov.ar

Introducción

Virest es un nuevo compuesto con actividad antiviral y antiinflamatoria desarrollado por investigadores de la Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA. (Michelini *et al*, 2008) La sustancia fue patentada en la Argentina, USA y UE, y su desarrollo como medicamento lo realiza el Instituto Massone, una empresa farmacéutica de capitales nacionales. (Ramirez *et al*, 2009) El rol del INTI fue el desarrollo de un proceso de síntesis a escala que permitió obtener material suficiente para la realización de ensayos preclínicos en animales.

Este nuevo principio activo se presenta como una opción efectiva para tratar la conjuntivitis viral, para la cual aún no existe tratamiento específico, evitando el uso de corticoides y sus efectos adversos.

Este proyecto es uno de los pioneros en el país para el desarrollo de un fármaco "de novo" con capitales nacionales y que surge de la conexión entre grupos de investigación de instituciones públicas y la Industria Nacional.

Objetivo

Desarrollo de un proceso simple, escalable, eficiente y robusto para la producción de VIREST en escala multigramo.

Descripción

La metodología sintética desarrollada a escala laboratorio (1-2 g) por los investigadores de FCEyN-UBA involucraba dos pasos a partir de un análogo del estigmatano comercial (MPC, Figura 1), con un rendimiento global de 54% y pureza de producto final $\geq 99\%$. Las condiciones utilizadas no eran compatibles con un cambio de escala.

Primer Paso: Oxidación de Oppenauer. Obtención del Intermediario 1 (I-1). Consiste en la oxidación a cetona de un alcohol secundario presente en MPC por acción de isopropóxido de aluminio y N-metilpiperidona.

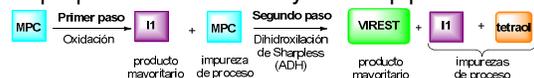


Figura 1: Representación esquemática de la síntesis de VIREST. MPC: material de partida comercial, I1: intermediario 1

Segundo Paso: Dihidroxilación de Sharpless. Obtención de VIREST.

Se basa en una reacción de dihidroxilación asimétrica de Sharpless (ADH) en donde uno de los dos alquenos de I1 es transformado estereoselectivamente al diol *syn* por acción oxidativa de un reactivo de Os (catalítico) en presencia de un auxiliar quiral y un agente reoxidante (ARox) obteniéndose VIREST. Esta mezcla de reactivos se la denomina ADmix (Figura 2).

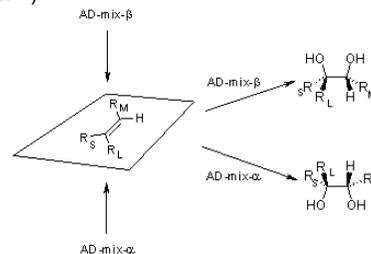


Figura 2. Dihidroxilación asimétrica de Sharpless (ADH) En este trabajo se describen las modificaciones realizadas al proceso de laboratorio original para convertirlo en un proceso escalable.

Resultados

Metodología de Trabajo: Partiendo del procedimiento informado por el solicitante, se diseñó una serie de ensayos que nos permitieron detectar las variables claves de proceso y optimizarlas hasta llegar a un procedimiento sencillo, eficiente y fácil de escalar. En cada caso se comparó la relación del producto mayoritario de reacción vs. las impurezas principales de proceso de cada crudo obtenido por RMN ¹H.

Optimización y escalado primer paso: Oxidación.

Se diseñaron ocho experimentos que nos permitieron lograr notables mejoras respecto del proceso original.

Principales mejoras de proceso logradas:

Reducción de costos y simplificación:

- ❖ Reemplazo de solvente de reacción anhidro por solvente calidad ACS y disminución del 38 % del volumen.

- ❖ Ahorro energético: reducción de tiempos de enfriamiento y calentamiento. Eliminación de la

operación de destilación a sequedad de la fase orgánica. Eliminación de formación de emulsiones.

❖ Reducción de los volúmenes de soluciones de lavado (60%).

▶ **Estandarización de proceso:**

❖ Definición de puntos de detención y de control de proceso.

❖ Definición de volumen de solvente de recristalización logrando reproducibilidad en esta operación.

❖ Desarrollo de método HPLC-IR para el análisis de pureza del intermediario 1.

Se logró obtener el **intermediario 1** puro (**≥99 %**) con muy buen **rendimiento (81%)** a través de un proceso simplificado, robusto y reproducible. **Escala alcanzada: 100 g.**

Optimización y escalado segundo paso: Dihidroxilación de Sharpless.

Cambios cruciales incorporados que permitieron lograr un proceso escalable:

▶ **Reemplazo del agente reoxidante (ARox):**

El uso del ARox descrito en el proceso original (ARox1) no era compatible con el escalado: se generaban subproductos y grandes cantidades de sales que complicaban las operaciones del tratamiento de reacción. En base a antecedentes bibliográficos, se encontró una alternativa a este reactivo: ARox2, y se ensayó su performance. Se encontraron condiciones de reacción con ARox2 que conducían a resultados similares a las obtenidas con en el proceso original, pero con tiempos de reacción más largos y menor selectividad.

▶ **Maximización de la conversión y la regioselectividad de la reacción:**

Las principales impurezas de este paso consistían en el intermediario 1 (I-1) y el tetraol (producto de la sobreoxidación de VIREST, Figura 1). A fin de definir el punto final de reacción, se realizó un estudio cinético que mostró que en una primera etapa, la velocidad de formación de tetraol se mantenía constante pero, una vez consumido el compuesto de partida (I-1) aumentaba la pendiente de la curva de tetraol en detrimento de la de VIREST, indicando ese momento como punto de corte de reacción (Fig.3)

▶ **Cambio de T reacción**

Con el objeto de disminuir los tiempos del proceso, se realizaron experimentos a distintas T lográndose reducir al quinto los tiempos de reacción termostatizando el sistema a 45°C.

▶ **Cambio del work up y método de purificación:**

Se incorporó el uso de Na₂SO₃ en lugar de NaHSO₃ como agente reductor del Os remanente durante el *work up* y se obtuvieron crudos recristalizables. Se realizó una búsqueda de solvente y se optimizó el método de recristalización logrando obtener VIREST con una alta pureza (>98%, HPLC) eliminando

la cromatografía en columna utilizada en el proceso original que resulta altamente costosa para aplicar en escala multigramo y en producción.

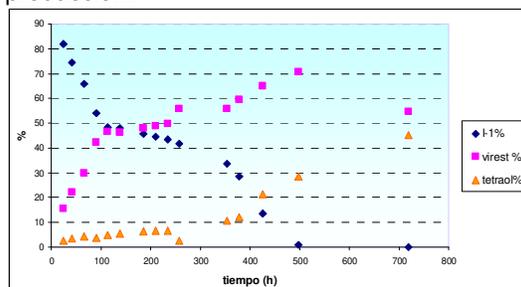


Figura 3. Estudio cinético del segundo paso. Concentraciones relativas medidas por RMN

▶ **Preparación de estándar secundario y desarrollo de método HPLC-DAD:**

Hasta el momento no existía método de análisis HPLC de VIREST. Desarrollamos un método de cuantificación de pureza por HPLC-DAD (240nm) contra patrón secundario de VIREST sintetizado en el laboratorio, que nos permitió analizar la pureza de los lotes de VIREST producidos.

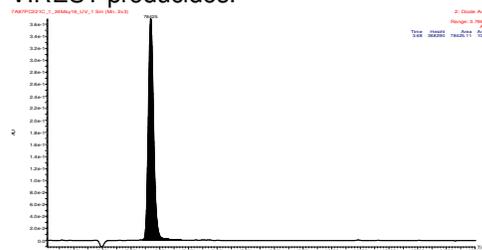


Figura 4. Cromatograma de VIREST lote 20 G con detección UV a 240nm

Conclusiones

- ✓ Se desarrolló un proceso robusto, escalable y reproducible para la síntesis de VIREST.
- ✓ El proceso desarrollado permitió producir un lote de 20 g de VIREST con 98.1% de pureza (HPLC) y un rendimiento global de 37 % que permitió avanzar en los estudios preclínicos de la droga.
- ✓ Ensayos preclínicos realizados con VIREST sintetizado, demostraron que actúa contra la mayoría de las conjuntivitis virales y reduce la inflamación sin generar los efectos colaterales de los corticoides.
- ✓ Actualmente la droga también está siendo estudiada en otras aplicaciones.

Bibliografía

- Michelini, F. M., Ramírez, J. A., Berra, A., Galagovsky, L. R., & Alché, L. E. (2008). Anti-herpetic and anti-inflammatory activities of two new synthetic 22 , 23-dihydroxylated stigmastane derivatives. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 111, 111–116. doi:10.1016/j.jsbmb.2008.05.005
- Ramirez, J. A., Michelini, F. M., Galagovsky, L. R., Berra, A., & Alche. (2009). WO2009007895A2.