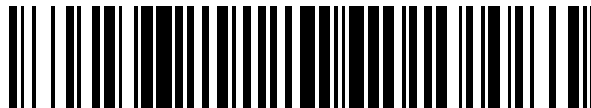


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 779**

51 Int. Cl.:

**C07H 19/12** (2006.01)

**C07H 1/00** (2006.01)

**A61K 31/706** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2009 E 09791228 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 2324042**

54 Título: **Proceso para preparar un producto intermedio de azacitidina**

30 Prioridad:

**21.01.2009 US 146112 P**

**14.05.2009 US 178309 P**

**06.08.2008 US 86606 P**

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

**12.04.2013**

73 Titular/es:

**SICOR, INC. (100.0%)**

**19 Hughes**

**Irvine, CA 92618, US**

72 Inventor/es:

**BIGATTI, ETTORE;**

**LUX, GIOVANNA;**

**PAIOCCHI, MAURIZIO;**

**GIOLITO, ANDREA y**

**TOSI, SIMONE**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 400 779 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

Proceso para preparar un producto intermedio de azacitidina

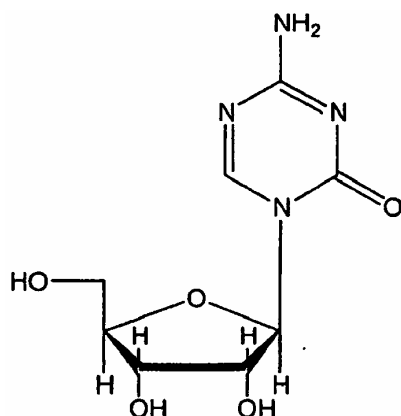
5 **Campo de la invención**

La invención abarca un proceso para preparar un producto intermedio de 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2-(1H)-ona (5-azacitidina), 4-amino-1-(2,3,5-tri-éster-β-D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona, usando ácido prótico como catalizador.

10

**Antecedentes de la invención**

La 5-azacitidina, 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona, un compuesto que tiene la estructura química,



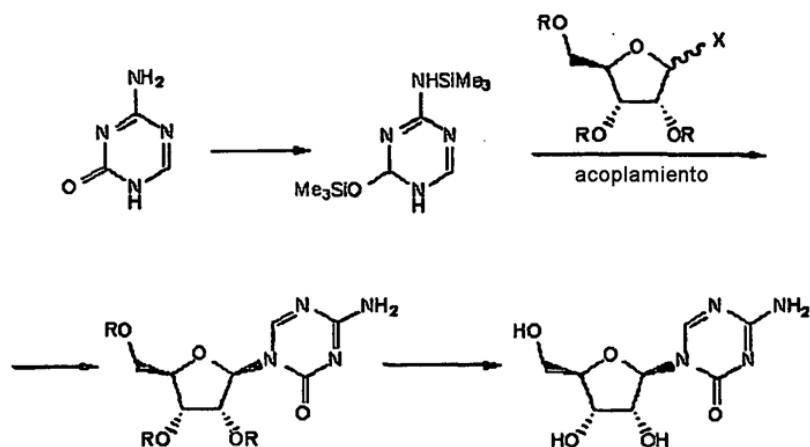
15

es un fármaco antineoplásico que presenta actividad frente a, por ejemplo, leucemia, linfoma y diversos tumores sólidos. La 5-azacitidina actúa también como inhibidor de la ADN metiltransferasa y se aprobó para el tratamiento de síndromes mielodisplásicos, una familia de trastornos de la médula ósea. Está comercializándose con el nombre VIDAZA<sup>®</sup> por Pharmion.

20

La preparación de 5-azacitidina mediante acoplamiento de 5-azacitosina sililada con un resto azúcar se notifica en la patente estadounidense n.º 3.817.980 y en la patente estadounidense n.º 7.038.038.

25 El proceso puede ilustrarse mediante el siguiente esquema,



30

en el que, en la patente estadounidense n.º 3.817.980, R es benzoílo y X es O-acetilo, y el proceso de acoplamiento se realiza usando ácidos de Lewis metálicos, tales como SnCl<sub>4</sub>, TiCl<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, como catalizadores (el rendimiento notificado de este proceso es del 54,1%); en la patente estadounidense n.º 7.038.038, R es acetilo y X es O-acetilo, y el proceso de acoplamiento se realiza usando ácidos de Lewis no metálicos como catalizadores. (El rendimiento notificado de este proceso es del 44,9%); y en M. W. Winkley y R. K. Robins, J. Org. Chem., 35, 491 (1970); X es Br, R es acetilo y el proceso se realiza sin ácido de Lewis (el rendimiento notificado de este proceso es del 34%).

35

Se sabe que el uso de ácidos de Lewis metálicos provoca contaminación del producto final con trazas del metal que se forman, tal como se notifica en la patente estadounidense n.º 7.038.038. Además, todos los procesos dan como

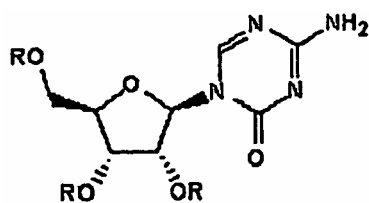
resultado bajos rendimientos de la 5-azacitidina final.

El documento US 4 082 911 da a conocer un proceso para la preparación de nucleósidos por medio de un catalizador de éster de trialquilsililo.

La invención descrita en el presente documento se refiere a un proceso mejorado para la preparación de 5-azacitidina con rendimiento superior, mediante su producto intermedio, 4-amino-1-(2,3,5-triéster-β-D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona, que se prepara mediante acoplamiento de 5-azacitosina sililada con haluro-resto azúcar en presencia de un ácido prótico en lugar de ácidos de Lewis.

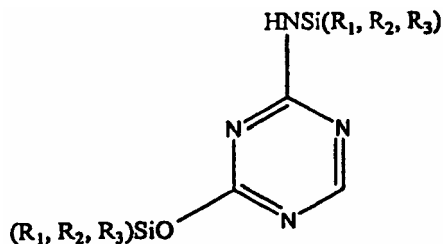
**Sumario de la invención**

En una realización, la presente invención abarca un proceso para preparar un producto intermedio de 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona ("5-azacitidina"), 4-amino-1-(2,3,5-tri-éster-β-D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona, de fórmula I:



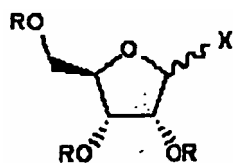
I

que comprende hacer reaccionar una 5-azacitosina sililada de fórmula II,



II

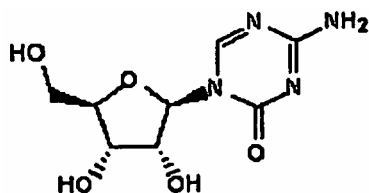
un resto azúcar que tiene la fórmula III:



III

y un ácido prótico; en el que R es un resto acilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> sustituido o no sustituido R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son cada uno independientemente H o un grupo alquilo y X es un halógeno.

En otra realización, la presente invención abarca un proceso para preparar 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona ("5-azacitidina") de fórmula IV:



IV

que comprende preparar el producto intermedio de 5-azacitidina de fórmula I según el proceso de la presente invención y convertirlo en 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona ("5-azacitidina").

5

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un patrón de PXRD de 4-amino-1-(2,3,5-tri-O-acetil-β-D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona.

10 La figura 2 muestra un termograma de DSC de 4-amino-1-(2,3,5-tri-O-acetil-β-D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona.

La figura 3 muestra un patrón de PXRD de 2-(trimetilsililamino)-4-(trimetilsililoxi)-s-triazina.

15 La figura 4 muestra un termograma de DSC de 2-(trimetilsililamino)-4-(trimetilsililoxi)-s-triazina.

La figura 5 muestra un patrón de PXRD de 5-azacitosina.

La figura 6 muestra un espectro de FTIR de 5-azacitosina.

20 La figura 7 muestra un cromatograma de HPLC de 5-azacitidina disuelta en DMSO.

La figura 8 muestra un cromatograma de HPLC de 5-azacitidina disuelta en DMPU.

25 La figura 9 muestra un cromatograma de HPLC de 5-azacitidina disuelta en agua.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un proceso mejorado para la preparación de 5-azacitidina con rendimiento superior, mediante su producto intermedio, 4-amino-1-(2,3,5-tri-éster-β-D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona.

30

Tal como se usa en el presente documento en relación con una cantidad medida, el término "aproximadamente" se refiere a la variación en la cantidad medida que esperaría el experto en la técnica que realiza la medición y que procede con un nivel de cuidado proporcional al objetivo de la medición y la precisión del aparato de medición que está usándose.

35

Tal como se usa en el presente documento, los términos "pureza" y "puro" se refieren a la pureza química de un compuesto que puede contener otros compuestos químicos como impurezas en los que el compuesto particular está presente en una cantidad de al menos aproximadamente el 80%, preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 99%, lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 99,5% en peso. Normalmente, la pureza puede medirse mediante HPLC, por ejemplo mediante el método de HPLC proporcionado por la presente invención.

40

Tal como se usa en el presente documento, el término "acilo" se refiere a un radical que tiene la fórmula general R<sup>n</sup>C(O)-, en la que R<sup>n</sup> es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo, aralquilo, heteroalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo.

45

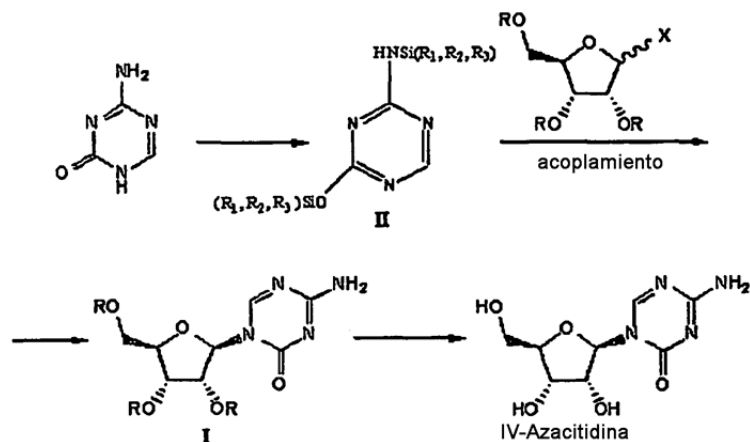
Tal como se usa en el presente documento, el término "aralquilo" solo o como parte de otro sustituyente se refiere a un radical en el que un grupo arilo está sustituido sobre un radical de grupo alquilo. Los grupos aralquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naptobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y similares.

50

El proceso de la presente invención aplica un ácido prótico en la etapa de acoplamiento, en lugar de ácidos de Lewis metálicos o no metálicos. La mezcla de reacción de acoplamiento puede usarse en la siguiente etapa sin retirar el ácido. Si se desea, el ácido prótico puede retirarse mediante extracción con una base en comparación con la dificultad de retirar los ácidos de Lewis metálicos del producto final. Además, los ácidos próticos son relativamente más baratos en comparación con ácidos de Lewis metálicos o no metálicos, dando como resultado por tanto un proceso rentable que también puede aplicarse a gran escala.

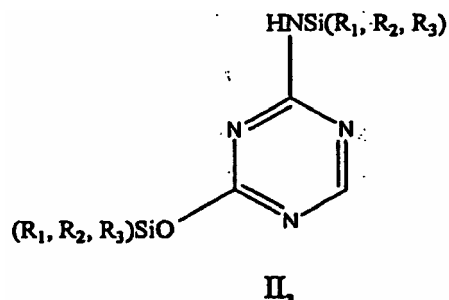
55

El proceso puede ilustrarse mediante el siguiente esquema:

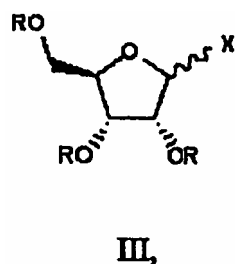


5 en el que R es un resto acilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> sustituido o no sustituido, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son independientemente H o un grupo alquilo y X es un halógeno.

10 La preparación de producto intermedio de 5-azacitidina de fórmula I comprende hacer reaccionar 5-azacitosina sililada de fórmula II



15 un resto azúcar de fórmula III



20 y un ácido prótico, en el que R es un resto acilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> sustituido o no sustituido, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son cada uno independientemente H o un grupo alquilo y X es un halógeno..

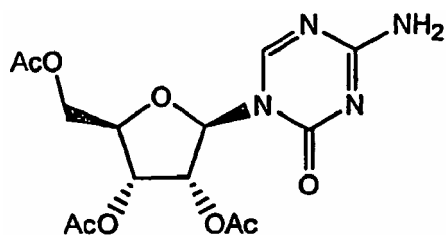
25 Preferiblemente, el resto acilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> está sustituido con un alquilo ramificado o alifático, o con un grupo bencilo.

Preferiblemente, el resto acilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> es C(O)CH<sub>3</sub> o C(O)fenilo (es decir, R es C(O)CH<sub>3</sub> o C(O)fenilo), lo más preferiblemente, C(O)CH<sub>3</sub>.

30 Preferiblemente, el grupo alquilo en R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> de fórmula II es un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, más preferiblemente, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, lo más preferiblemente, R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub>= R<sub>3</sub>= metilo.

Preferiblemente, el halógeno es o bien Cl o bien Br.

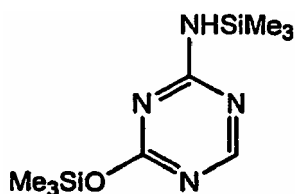
Cuando R es C(O)CH<sub>3</sub>, el compuesto de fórmula I corresponde a 4-amino-1-(2,3,5-tri-O-acetil-β-D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona, que tiene la siguiente fórmula,



Preferiblemente, la 4-amino-1-(2,3,5-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona obtenida de la fórmula anterior correspondiente a la fórmula I es cristalina.

- 5 La 4-amino-1-(2,3,5-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona cristalina se caracteriza por datos seleccionados del grupo que consiste en: un patrón de PXRD que tiene picos a aproximadamente 8,2, 10,9, 13,0, 13,3, 14,3, 16,4, 17,2, 20,4, 21,3, 23,7, 24,4, 25,1 y  $27,4 \pm 0,2$  grados  $2\theta$ , y un patrón de PXRD tal como se representa en la figura 1.
- 10 La 4-amino-1-(2,3,5-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona cristalina puede caracterizarse además por datos seleccionados del grupo que consiste en: un termograma de DSC que tiene un pico endotérmico a aproximadamente  $158^{\circ}\text{C}$ , y un termograma de DSC tal como se representa en la figura 2.

15 Cuando  $R_1 = R_2 = R_3 =$  metilo, el compuesto de fórmula II corresponde a 2-(trimetilsililamino)-4-(trimetilsililoxi)-s-triazina de la siguiente fórmula,



Preferiblemente, la 2-(trimetilsililamino)-4-(trimetilsililoxi)-s-triazina es cristalina.

- 20 La 2-(trimetilsililamino)-4-(trimetilsililoxi)-s-triazina cristalina se caracteriza por datos seleccionados del grupo que consiste en: un patrón de PXRD que tiene picos a aproximadamente 11,6, 13,7, 16,6, 19,9, 25,2, 26,0, 26,9, 27,8, 29,1, 30,7, 32,1, 35,2 y  $38,2 \pm 0,2$  grados  $2\theta$ , y un patrón de PXRD tal como se representa en la figura 3.
- 25 La 2-(trimetilsililamino)-4-(trimetilsililoxi)-s-triazina cristalina puede caracterizarse además por datos seleccionados del grupo que consiste en: un termograma de DSC que tiene un pico endotérmico a aproximadamente  $352^{\circ}\text{C}$ , y un termograma de DSC tal como se representa en la figura 4.

30 En una realización preferida, la presente invención abarca la preparación del producto intermedio de 5-azacitidina de fórmula I combinando una primera mezcla que comprende la 5-azacitosina sililada de fórmula II, una segunda mezcla que comprende el resto azúcar de fórmula III y un ácido prótico para obtener una mezcla de reacción, que comprende dicho producto intermedio de fórmula I.

35 En alguna realización, el ácido prótico está presente en una cantidad catalítica, preferiblemente, el ácido prótico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,9 mol/mol, con respecto a la 5-azacitosina sililada de fórmula II.

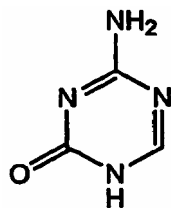
Preferiblemente, el ácido prótico en los procesos de la invención es ácido triflico.

40 La primera mezcla comprende la 5-azacitosina sililada de fórmula II y un disolvente orgánico. Los ejemplos para disolventes orgánicos adecuados incluyen pero no se limitan a acetonitrilo, cloruro de metileno y 1,2-diclorometano, preferiblemente, el disolvente orgánico es acetonitrilo.

45 La preparación de la 5-azacitosina sililada de fórmula II comprende el uso de un disolvente orgánico en lugar de usar el agente de sililación caro también como disolvente. Por tanto, se usa sólo un exceso de estequiométrico a pequeño del agente de sililación, que es caro.

50 Preferiblemente el agente de sililación tiene la siguiente fórmula  $(R_1R_2R_3)\text{Si-NH-Si}(R_1R_2R_3)$ , en la que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son independientemente H o alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_4$ . Más preferiblemente, el agente de sililación es hexametildisilazano (HMDS).

La primera mezcla se proporciona combinando 5-azacitosina que tiene la siguiente fórmula,



5 con el agente de sililación y un disolvente para obtener una primera suspensión; calentando la primera suspensión para obtener una disolución, evaporando la disolución para obtener un residuo, y combinando el residuo y el disolvente orgánico, preferiblemente acetonitrilo, para obtener dicha mezcla que comprende 5-azacitosina sililada de fórmula II.

10 Preferiblemente, la 5-azacitosina de partida es cristalina.

La 5-azacitosina cristalina se caracteriza por datos seleccionados del grupo que consiste en: un patrón de PXRD que tiene picos a aproximadamente 11,6, 13,7, 16,6, 19,9, 25,2, 26,0, 26,9, 27,8, 29,1, 30,7, 32,1, 35,2 y  $38,2 \pm 0,2$  grados  $2\theta$ , y un patrón de PXRD tal como se representa en la figura 5.

15 La 5-azacitosina cristalina puede caracterizarse además por datos seleccionados del grupo que consiste en: un espectro de FTIR que tiene bandas a aproximadamente 3375, 3172, 2617, 1732, 1661, 1624, 1515, 1471, 1445, 1350, 1269, 1222, 1145, 1006, 984, 901, 813, 796, 773 y  $610 \text{ cm}^{-1}$ , y un espectro de FTIR tal como se representa en la figura 6.

20 Los ejemplos para disolventes orgánicos adecuados usados para preparar la 5-azacitosina sililada de fórmula II incluyen pero no se limitan a un hidrocarburo aromático, preferiblemente un hidrocarburo aromático  $\text{C}_{6-9}$ , más preferiblemente tolueno.

25 El agente de sililación está presente entre una cantidad estequiométrica y un pequeño exceso por cantidad de 5-azacitosina. Preferiblemente, se hacen reaccionar de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 mol, más preferiblemente, de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 1,6 equivalentes molares del agente de sililación por equivalente molar de 5-azacitosina.

30 Opcionalmente, la primera mezcla comprende también un catalizador tal como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Se calienta la primera suspensión para obtener una disolución. Preferiblemente, se calienta la primera suspensión hasta una temperatura de aproximadamente  $80^\circ\text{C}$  a aproximadamente  $120^\circ\text{C}$ . Más preferiblemente, se calienta la primera suspensión hasta una temperatura de aproximadamente  $104^\circ\text{C}$  a aproximadamente  $120^\circ\text{C}$ .

35 Preferiblemente, se calienta la primera suspensión durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 horas, más preferiblemente, durante aproximadamente 4 horas.

40 Opcionalmente, la disolución puede calentarse adicionalmente para garantizar la formación de la 5-azacitosina sililada. Preferiblemente, la disolución puede calentarse adicionalmente durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 horas, más preferiblemente, durante aproximadamente 4 horas.

Tal como se mencionó anteriormente, se evapora la disolución para dar un residuo.

45 Puede repetirse el proceso de evaporación varias veces, antes de combinar el residuo con el disolvente orgánico. Preferiblemente, el disolvente orgánico es acetonitrilo.

Habitualmente, antes de cada etapa de evaporación se combina el residuo obtenido con un disolvente para obtener una disolución y se evapora esta disolución. Preferiblemente, el disolvente es un hidrocarburo aromático, más preferiblemente un hidrocarburo aromático  $\text{C}_{6-9}$ , lo más preferiblemente tolueno.

50 Cuando X es Cl y R es  $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ , el resto azúcar de fórmula III es cloruro de 2,3,5-tri-O-acetil-ribofuranosilo, y puede prepararse por ejemplo según el proceso descrito en A. Piskala y F. Storm, Nucl. Acid Chem. 1, 435 (1978).

55 La segunda mezcla puede ser una disolución del resto azúcar de fórmula III en un disolvente orgánico. Los ejemplos para disolventes orgánicos adecuados incluyen pero no se limitan a acetonitrilo, cloruro de metileno y 1,2-diclorometano, preferiblemente, el disolvente orgánico es acetonitrilo.

Además, la mezcla de reacción que comprende todos los reactantes, tras combinar las mezclas primera y segunda y un ácido prótico, se agita preferiblemente durante un periodo de aproximadamente 6 a 30 horas, más

preferiblemente durante de aproximadamente 20 a 26 horas, lo más preferiblemente durante de aproximadamente 22 a 24 horas permitiendo la formación de la 4-amino-1-(2,3,5-tri-éster-β-D-ribosil)-s-triazin-2-(1H)-ona intermedia de fórmula I.

5 Preferiblemente, se realiza la agitación a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C, más preferiblemente, a una temperatura de aproximadamente 23°C a aproximadamente 27°C, lo más preferiblemente, a una temperatura de aproximadamente 24°C a aproximadamente 26°C.

10 Antes de convertir la 4-amino-1-(2,3,5-tri-éster-β-D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona intermedia obtenida de fórmula I en 5-azacitidina, se concentra la mezcla de reacción que la contiene para obtener un residuo que comprende la 4-amino-1-(2,3,5-tri-éster-β-D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona intermedia de fórmula I, que reacciona con una base para neutralizar el ácido prótico.

15 Opcionalmente, antes de hacer reaccionar el residuo con la base, se disuelve en un disolvente orgánico no miscible en agua, proporcionando una disolución que entonces reacciona con una disolución acuosa de la base. Los ejemplos para disolventes orgánicos no miscibles en agua adecuados incluyen pero no se limitan a un éster o hidrocarburo alifático halogenado, preferiblemente, el hidrocarburo alifático halogenado es un hidrocarburo alifático halogenado C<sub>1-3</sub> y el éster es un éster C<sub>1-6</sub>. Más preferiblemente, el hidrocarburo alifático halogenado C<sub>1-3</sub> es CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o CHCl<sub>3</sub>, y el éster C<sub>1-6</sub> es AcOEt.

20 Preferiblemente, la base es una base inorgánica. Los ejemplos para base inorgánica adecuada incluyen pero no se limitan a NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KHCO<sub>3</sub>, NaOH y NH<sub>4</sub>OH. Más preferiblemente, la base es bicarbonato de sodio.

25 Habitualmente, la reacción con la base proporciona una mezcla. Esta mezcla se filtra proporcionando un filtrado, que entonces se concentra para proporcionar un aceite que comprende la 4-amino-1-(2,3,5-tri-éster-β-D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona intermedia de fórmula I.

30 Entonces, el producto intermedio de fórmula I obtenido puede convertirse en 5-azacitidina. Normalmente, la conversión se realiza retirando los grupos protectores acetilados. La retirada puede realizarse haciendo reaccionar el producto intermedio de fórmula I con una base, por ejemplo tal como se notifica en el presente documento en el ejemplo 1 o mediante el procedimiento descrito en la patente estadounidense n.º 7.038.038. El rendimiento de 5-azacitidina según el proceso de la invención es de al menos el 65%, preferiblemente al menos el 69%.

35 Normalmente, se analiza entonces la pureza de la 5-azacitidina obtenida.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención.

### Ejemplos

40 Método de HPLC para monitorizar la pureza de la azacitidina:

Columna: C18 de sílice de fase inversa (octadecilo; 5 μm, 250 x 4,6 mm o equivalente),

45 Fase móvil A: 15 mM de fosfato de potasio dibásico y 15 mM de formiato de amonio en agua, ajuste con ácido ortofosfórico diluido (10 ml de ácido ortofosfórico al 85% hasta 100 ml de agua) a pH 7,0 ± 0,1.

Fase móvil B: Fase A/acetonitrilo 60:40 (v/v)

Gradiente:

50

Tiempo (min.)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	100	0
30	95	5
50	55	45
55	50	50
80	50	50

Tiempo de ejecución: 50 minutos.

Tiempo tras la ejecución: 15 minutos.

55

Velocidad de flujo: 0,7 ml/min.



Detector:  $\lambda = 235 \text{ nm}$  (ref. = 450 nm. BW=80 nm).

Temperatura de la columna: 15°C.

5

Volumen de inyección: 2  $\mu\text{l}$ .

Diluyente A: Dimetilsulfóxido (DMSO)

10 Diluyente B: 1,3-Dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU)

Temperatura del inyector automático: La temperatura del inyector automático debe mantenerse por encima de 20°C para evitar la congelación del DMSO cuando se usa como disolvente.

15 PXRD

Se realizó la difracción de XRD en un difractómetro de polvo de rayos X: difractómetro de polvo PanAlytical X'pert Pro equipado con un detector multicanal X'celerator, longitud activa del detector 2,122 mm, tubo de Cu, radiación de CuK $\alpha$ ,  $\lambda = 1,541874 \text{ \AA}$ ; soporte de muestras de acero inoxidable con placa de silicio de fondo cero. Parámetros de exploración: intervalo 4-40 grados dos-theta; exploración continua; tamaño de etapa 0,0167 grados; velocidad de exploración 6 grados/min. Antes del análisis se trituraron suavemente las muestras por medio de un almirez y mano de almirez con el fin de obtener un polvo fino. Se ajustó la muestra triturada en una cavidad del soporte de muestras y se alisó la superficie de la muestra por medio de un portaobjetos de vidrio microscópico.

20

25 DSC

Se realizaron mediciones de DSC en un calorímetro diferencial de barrido DSC823e (Mettler Toledo). Se usaron crisoles de 40  $\mu\text{l}$  con PIN para la preparación de muestras. El peso de muestra habitual era de 1,5 - 4 mg. Programa: intervalo de temperatura de 25°C - 300°C, 10°C/min., flujo de nitrógeno de 50 ml/min.

30

IR

Se recogieron espectros de FTIR por medio de un espectrómetro Nicolet Nexus. Se usó la técnica de ATR para la medición con los siguientes ajustes:

35

Intervalo:	4000 - 550 $\text{cm}^{-1}$ ;
Número de exploraciones de la muestra:	64;
Resolución:	4,000 $\text{cm}^{-1}$ ;
Apodización:	Happ-Genzel;
Ganancia de la muestra:	8,0;
Formato final:	Absorbancia

Se midió el cristal de ATR vacío como fondo en las mismas condiciones en las que estaban las muestras. Entonces se restó automáticamente el registro resultante de los espectros de las muestras.

40 Se usaron los métodos experimentales mencionados anteriormente para medir los diversos parámetros en los ejemplos a continuación.

Ejemplo 1: Síntesis de 5-azacitidina

45 Se calentó a reflujo una suspensión de 5-azacitosina (10 g; 0,089 mol), hexametildisilazano (22 g; 0,13 mol),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,2 g; 2 mmol) y tolueno (40 g) ( $T_{\text{ext.}} 130^\circ\text{C}$ ;  $T_{\text{mez.}} 108\text{-}114^\circ\text{C}$ ). Tras aproximadamente 4 h. la mezcla se volvió una disolución y se sometió a reflujo la reacción durante 4 h adicionales. Se evaporó la disolución a vacío hasta dar un aceite, que se diluyó con tolueno (50 g) y se evaporó la disolución resultante a vacío hasta dar un residuo. Se suspendió éste último en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (60 g) obteniendo una suspensión (mezcla A).

50

Se suspendió tetracetato de  $\beta$ -D-ribofuranosa (34,4 g; 0,11 mol) en tolueno (150 g) y se añadió cloruro de acetilo (1,7 g; 0,02 mol). Se agitó la mezcla a 20-25°C y se burbujeó gas HCl (5,46 g; 0,15 mol) a lo largo de aproximadamente 8 h (IPC mediante eluyente de CCF:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acetona 95:5; EM residual <5%).

55 Se evaporó la mezcla de reacción (disolución) a vacío (baño externo 50°C) hasta dar un residuo aceitoso, que entonces se disolvió en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (102 g) obteniendo una disolución (mezcla B).

Se vertió la disolución de cloruro de 2,3,5-tri-O-acetil-D-ribofuranosilo en CH<sub>3</sub>CN (mezcla B) en la suspensión de bis-trimetilsilil-azacitosina en CH<sub>3</sub>CN (mezcla A) a lo largo de 10 min. y se añadió ácido tríflico (5,4 g; 0,04 mol).

5 Se agitó la mezcla resultante a 20-25°C durante 20-25 h, entonces se concentró hasta dar un residuo. Se disolvió éste último en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 g) y se trató la disolución resultante con una mezcla de NaHCO<sub>3</sub> (7,5 g; 0,09 mol) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9,5 g; 0,09 mol) en H<sub>2</sub>O (100 g) y se agitó vigorosamente durante 30 min.

10 Se filtró la mezcla sobre una torta Dicalite, entonces se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 g).

Se recogieron las fases orgánicas y se concentraron a vacío (50°C) hasta dar un residuo aceitoso.

15 Se disolvió éste último en MeOH (250 g) y se filtró la mezcla resultante (pequeña cantidad de sal).

Se añadió MeONa al 25%/MeOH (3,9 g; 0,02 mol) disuelto en MeOH (60 g) a lo largo de 30 min.

Se agita la mezcla resultante a 20-25°C durante 1,5 h. Se filtraron los cristales y se lavaron con MeOH (300 g).

20 Se secó el sólido húmedo a vacío a 60°C durante 15 h proporcionando 5-azacitidina como un sólido blanquecino.

Rendimiento: 69% pureza > 98% de área mediante HPLC.

#### Ejemplo 2: Síntesis de 5-azacitidina

25 Se calentó a reflujo una suspensión de 5-azacitosina (10 g; 0,089 mol), hexametildisilazano (22 g; 0,13 mol), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 g; 2 mmol) y tolueno (40 g) (T<sub>ext.</sub> 130°C; T<sub>mez.</sub> 108-114°C). Tras aproximadamente 4 h, la mezcla se volvió una disolución y se sometió la reacción a reflujo durante 4 h adicionales. Se evaporó la disolución a vacío hasta dar un aceite, que se diluyó con tolueno (50 g) y se evaporó la disolución resultante a vacío hasta dar un residuo. Se suspendió éste último en CH<sub>3</sub>CN (60 g) obteniendo una suspensión (mezcla A).

30 Se suspendió tetracetato de β-D-ribofuranosa (34,4 g; 0,11 mol) en tolueno (150 g) y se añadió cloruro de acetilo (1,7 g; 0,02 mol). Se agitó la mezcla a 20-25°C y se burbujó gas HCl (5,46 g; 0,15 mol) a lo largo de aproximadamente 8 h (IPC mediante eluyente de CCF: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetona 95:5; EM residual <5%).

35 Se evaporó la mezcla de reacción (disolución) a vacío (baño externo 50°C) hasta dar un residuo aceitoso, que entonces se diluyó en CH<sub>3</sub>CN (102 g) obteniendo una disolución (mezcla B).

40 Se vertió la disolución de cloruro de 2,3,5-tri-O-acetil-D-ribofuranosilo en CH<sub>3</sub>CN (mezcla B) en la suspensión de bis-trimetilsilil-azacitosina en CH<sub>3</sub>CN (mezcla A) a lo largo de 10 min. y se añadió ácido tríflico (5,4 g; 0,04 mol).

45 Se agitó la mezcla resultante a 20-25°C durante 20-25 h, y entonces se concentró hasta dar un residuo. Se disolvió éste último en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 g) y se trató la disolución resultante con una mezcla de NaHCO<sub>3</sub> (7,5 g; 0,09 mol) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9,5 g; 0,09 mol) en H<sub>2</sub>O (100 g) y se agitó vigorosamente durante 30 min.

Se filtró la mezcla sobre una torta de Dicalite, entonces se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 g).

50 Se recogieron las fases orgánicas y se concentraron a vacío (50°C) hasta dar un residuo aceitoso.

Se disolvió éste último en MeOH (240 g) y se filtró la mezcla resultante (pequeña cantidad de sal).

Se añadió MeONa al 25%/MeOH (15,4 g; 0,07 mol) disuelto en MeOH (250 g) a lo largo de 5 min.

55 Se agita la mezcla resultante a 20-25°C durante 1,5 h. Se filtraron los cristales y se lavaron con MeOH (300 g).

Se secó el sólido húmedo a vacío a 60°C durante 15 h proporcionando 5-azacitidina como un sólido blanquecino.

Rendimiento: 69% pureza > 99% de área mediante HPLC.

#### Ejemplo 3: Síntesis de 5-azacitidina sin tratamiento final básico acuoso

65 Se calentó a reflujo una suspensión de 5-azacitosina (10 g; 0,089 mol), hexametildisilazano (22 g; 0,13 mol), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 g; 2 mmol) y tolueno (40 g) (T<sub>ext.</sub> 130°C; T<sub>mez.</sub> 108-114°C). Tras aproximadamente 4 h, la mezcla se volvió una disolución y se sometió la reacción a reflujo durante 4 h adicionales. Se evaporó la disolución a vacío hasta dar un aceite, que se diluyó con tolueno (50 g) y se evaporó la disolución resultante a vacío hasta dar un

residuo. Se suspendió éste último en CH<sub>3</sub>CN (60 g) obteniendo una suspensión (mezcla A).

Se suspendió tetracetato de β-D-ribofuranosa (34,4 g; 0,11 mol) en tolueno (150 g) y se añadió cloruro de acetilo (1,7 g; 0,02 mol). Se agitó la mezcla a 20-25°C y se burbujeó gas HCl (5,46 g; 0,15 mol) a lo largo de aproximadamente 8 h (IPC mediante eluyente de CCF: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetona 95:5; EM residual <5%).

Se evaporó la mezcla de reacción (disolución) a vacío (baño externo 50°C) hasta dar un residuo aceitoso, que entonces se diluyó en CH<sub>3</sub>CN (102 g) obteniendo una disolución (mezcla B).

Se vertió la disolución de cloruro de 2,3,5-tri-O-acetil-D-ribofuranosilo en CH<sub>3</sub>CN (mezcla B) en la suspensión de bis-trimetilsilil-azacitosina en CH<sub>3</sub>CN (mezcla A) a lo largo de 10 min. y se añadió ácido triflico (5,4 g; 0,04 mol).

Se agitó la mezcla resultante a 20-25°C durante 20-25 h, y entonces se concentró hasta dar un residuo.

Se disolvió éste último en MeOH (240 g) y se filtró la mezcla resultante (pequeña cantidad de sal).

Se añadió MeONa al 25%/MeOH (15,4 g; 0,02 mol) disuelto en MeOH (250 g) a lo largo de 5 min.

Se agita la mezcla resultante a 20-25°C durante 1,5 h. Se filtraron los cristales y se lavaron con MeOH (300 g).

Se secó el sólido húmedo a vacío a 60°C durante 15 h proporcionando 5-azacitidina como un sólido blanquecino.

Rendimiento: 75%, pureza > 99% de área mediante HPLC.

#### Ejemplo 4: Preparación de 4-amino-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona cristalina

Se calentó una mezcla de guanilurea (1,02 g; 0,01 mol), DMF (5 ml) y ortoformiato de etilo (3 ml) a 155°C durante 1,5 h y entonces se dejó reposar a temperatura ambiente durante la noche. Se filtró la suspensión y se lavó el sólido con H<sub>2</sub>O (5 ml). Se recristalizó 5-azacitosina en H<sub>2</sub>O.

#### Ejemplos 5: Preparación de 2-(trimetilsililamino)-4-(trimetilsililoxi)-s-triazina cristalina

Se calentó a reflujo una mezcla de 5-azacitosina (11,2 g; 0,1 mol), hexametildisilazano (35 ml) y sulfato de amonio (0,2 g) (baño de aceite 160°C) durante 8 h. Se evaporó el exceso de hexametildisilazano a vacío obteniendo un residuo que se trituró con tolueno seco (50 ml) y se evaporó el disolvente a presión reducida. Se pulverizó el residuo y se secó a vacío en un evaporador rotatorio a 60°C durante 1 h proporcionando el compuesto del título como un sólido blanco (25,0 g; 0,097 mol; rendimiento del 98%).

#### Ejemplo 6: Preparación de 4-amino-1-(2,3,5-tri-O-acetil-β-D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona cristalina (triacetato de azacitidina)

Se suspendió tetracetato de β-D-ribofuranosa (34 g; 0,11 mol) en tolueno y se añadió cloruro de acetilo (1,7 g; 0,02 mol).

Se agitó la mezcla a 20-25°C y se burbujeó gas HCl (5,46 g; 0,15 mol) a lo largo de 8 h. Se concentró la mezcla de reacción a vacío hasta dar un residuo (cloro-azúcar).

Se calentó a reflujo una suspensión de 5-azacitosina (10 g; 0,09 mol), hexametildisilazano (40 g; 0,13 mol), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 g; 0,002 mol) y tolueno (40 g) (T= 108-114°C) durante 8 h.

Se concentró la mezcla de reacción a vacío hasta dar un residuo (sililazacitosina).

Se añadió una disolución del cloro-azúcar (0,15 mol) en MeCN en una mezcla de silil-azacitosina (0,11 mol) en MeCN y se añadió ácido triflico (5,36 g; 0,036 mol).

Se agitó la mezcla resultante a 20-25°C durante 20-25 h, y entonces se concentró hasta dar un residuo. Se disolvió éste último en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 g) y se trató la disolución resultante con una mezcla de NaHCO<sub>3</sub> (7,5 g; 0,09 mol) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9,5 g; 0,09 mol) en H<sub>2</sub>O (100 g) y se agitó vigorosamente durante 30 min.

Se filtró la mezcla sobre una torta Dicalite, entonces se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Se recogieron las fases orgánicas, se lavaron con agua (2 x 25 g) y se concentraron a vacío hasta dar un residuo aceitoso.

Se purificó el residuo aceitoso mediante cromatografía (gel de sílice; eluyente: EtOAc). Se concentraron las fracciones recogidas a vacío hasta dar un pequeño volumen y se precipitó mediante adición de diisopropil éter

(130 ml). Se separó por filtración el sólido, se lavó con diisopropil éter (100 ml) y se secó a vacío a 40°C (15,3 g; 0,041 mol; rendimiento del 46%).

Ejemplo 7: Cristalización de 5-azacitidina

5 Procedimiento: Se suspendió 5-azacitidina bruta (10 g; ensayo de HPLC 78%; 0,036 mol) en DMPU (70 ml) y se calentó la mezcla resultante hasta 50°C durante 30 min. Se enfrió la mezcla hasta 20-25°C, se mantuvo a la misma temperatura durante 1 hora y entonces se filtró. Se lavó el sólido con DMPU (10 ml). Se suspende la muestra húmeda en i-PrOH (100 ml) y se calienta hasta 65-75°C durante 1 h y entonces se filtra. Se lava el sólido con i-PrOH  
10 caliente (30 ml) y se seca a vacío a 60°C. Se obtuvo 5-azacitidina (6 g; 0,025 mol) como un sólido blanco. Rendimiento: 69%.

Ejemplo 8: Cálculo de azacitidina mediante el método de PLC

15 Se determina el tiempo de retención relativo (trr) de cada pico según el tiempo de retención relativo de 5-azacitidina.

Cromatograma de la disolución A de muestra obtenido (diluyente A - DMSO) - Integración de picos de impurezas con un trr no inferior a 0,5

20 En el cromatograma de la disolución A de muestra, obtenido con DMSO como diluyente, se calcula el valor en porcentaje de picos conocidos y desconocidos mediante el método de integración automático (porcentaje de área) con los siguientes criterios:

25 - Ignorar cualquier pico con un tiempo de retención relativo inferior a 0,5 (por debajo de trr 0,5 es cuando eluye el DMSO).

Cromatograma de la disolución B de muestra (diluyente B - DMPU) - Integración de picos de impurezas con un trr inferior a 0,5

30 En el cromatograma de disoluciones B de muestra, obtenido con DMPU como diluyente, se calcula el valor en porcentaje de picos conocidos y desconocidos mediante el método de integración automático (porcentaje de área) con los siguientes criterios:

35 - Integrar todos los picos con un tiempo de retención relativo inferior a 0,5 y el pico debido a 5-azacitidina.

Cálculo:

Para DMSO: Impurezas que tienen un tiempo de retención no inferior a 0,5, tal como se representa en la figura 7.

40 Trr de impureza 1,52=0,04%

Trr de impureza 1,64=0,07%

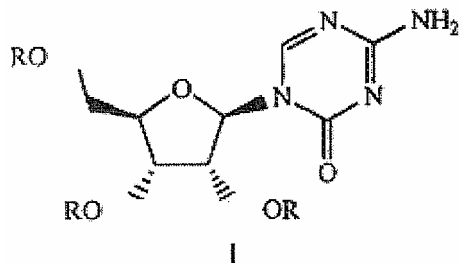
Para DMPU: Impurezas que tienen tiempo de retención inferior a 0,5, tal como se representa en la figura 8.

45 Trr de impureza 0,34=0,09%

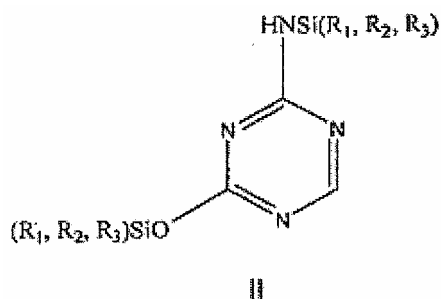
Pureza de azacitidina = 100-0,09-0,04-0,07 = 99,80% de área de HPLC

## REIVINDICACIONES

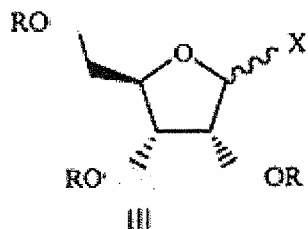
1. Proceso para preparar un producto intermedio de 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona ("5-azacitidina"), 4-amino-1-(2,3,5-tri-éster-β-D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona, de fórmula I:



que comprende hacer reaccionar una 5-azacitosina sililada de fórmula II,



un resto azúcar que tiene la fórmula III:



15 y un ácido prótico; en el que R es un resto acilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> sustituido o no sustituido, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son cada uno independientemente H o un grupo alquilo y X es un halógeno.

20 2. Proceso según la reivindicación 1, en el que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.

3. Proceso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que X es Cl o Br.

4. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el resto acilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> está sustituido con un grupo alquilo ramificado o alifático, o con un grupo bencilo.

25 5. Proceso según la reivindicación 4, en el que el resto acilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> es C(O)CH<sub>3</sub> o C(O)fenilo.

6. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto intermedio de 5-azacitidina de fórmula I se prepara combinando una primera mezcla que comprende la 5-azacitosina sililada de fórmula II, una segunda mezcla que comprende el resto azúcar de fórmula III y un ácido prótico para obtener una mezcla de reacción, que comprende dicho producto intermedio de fórmula I.

7. Proceso según la reivindicación 6, en el que el ácido prótico está presente en una cantidad catalítica.

35 8. Proceso según la reivindicación 7, en el que el ácido prótico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,9 mol/mol, con respecto a la 5-azacitosina sililada de fórmula II.

9. Proceso según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que el ácido prótico es ácido tríflico.

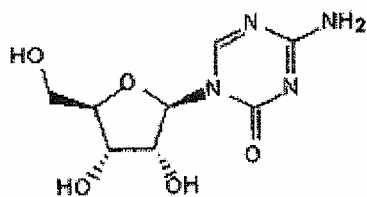
10. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la primera mezcla comprende la 5-azacitosina sililada de fórmula II y un disolvente orgánico.

5 11. Proceso según la reivindicación 10, en el que el disolvente orgánico es acetonitrilo, cloruro de metileno o 1,2-diclorometano.

12. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que la segunda mezcla es una disolución del resto azúcar de fórmula III en un disolvente orgánico.

10 13. Proceso según la reivindicación 12, en el que el disolvente orgánico es acetonitrilo, cloruro de metileno o 1,2-diclorometano.

14. Proceso para preparar 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona ("5-azacitidina") de fórmula IV:



IV

15 que comprende preparar el producto intermedio de 5-azacitidina de fórmula I según la reivindicación 1 y convertirlo en 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona ("5-azacitidina").

20 15. Proceso según la reivindicación 14, en el que, antes de convertir la 4-amino-1-(2,3,5-tri-éster-β-D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona intermedia obtenida de fórmula I en 5-azacitidina, se concentra la mezcla de reacción que la contiene para obtener un residuo que comprende la 4-amino-1-(2,3,5-tri-éster-β-D-ribosil)-s-triazin-2(1H)-ona intermedia de fórmula I, que reacciona con una base.

25 16. Proceso según la reivindicación 15, en el que opcionalmente, antes de hacer reaccionar el residuo con la base, se disuelve en un disolvente orgánico no miscible en agua, proporcionando una disolución que reacciona entonces con una disolución acuosa de la base.

30 17. Proceso según la reivindicación 16, en el que el disolvente orgánico no miscible en agua es un éster o hidrocarburo alifático halogenado.

18. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 y 17, en el que la base es una base inorgánica.

35 19. Proceso según la reivindicación 18, en el que la base inorgánica se selecciona del grupo que consiste en NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KHCO<sub>3</sub>, NaOH y NH<sub>4</sub>OH.

Patrón de PXRD de 4-amino-1-(2,3,5-tri-O-acetil-β-D-riboseil)-s-triazin-2(1H)-ona

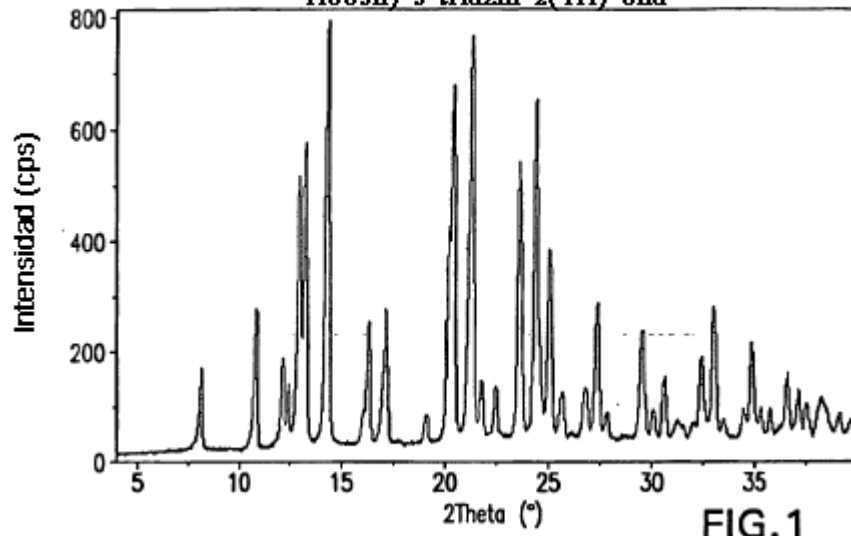


FIG. 1

Termograma de DSC de 4-amino-1-(2,3,5-tri-O-acetil-β-D-riboseil)-s-triazin-2(1H)-ona

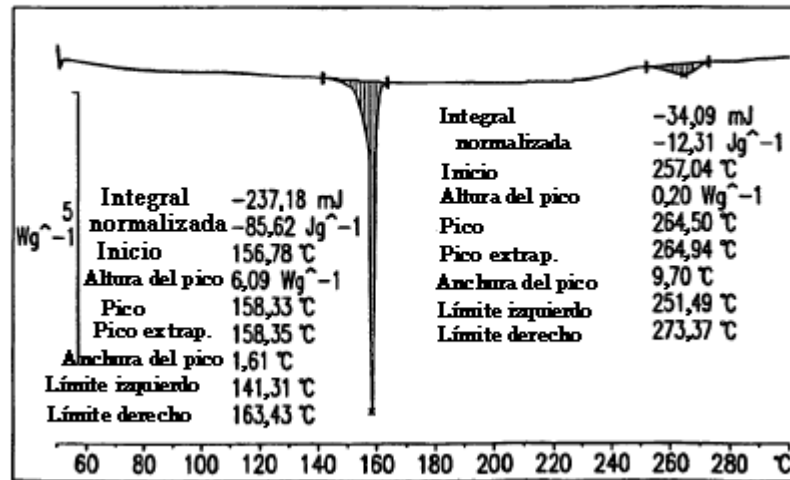


FIG. 2

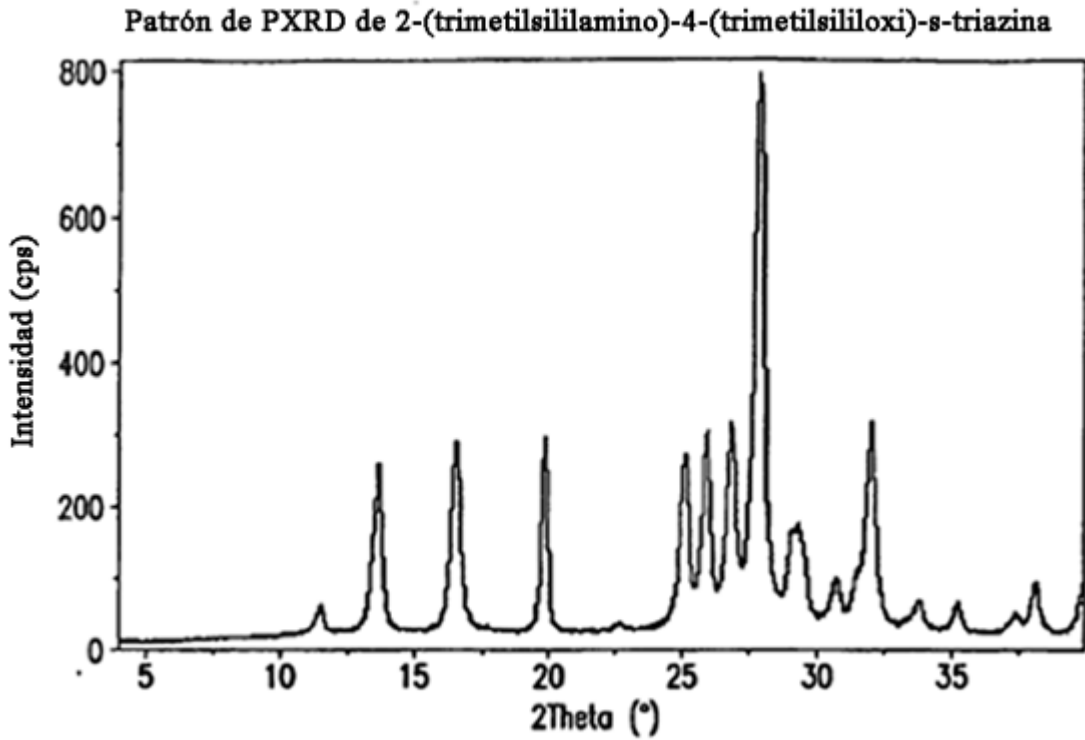


FIG.3

Termograma de DSC de 2-(trimetilsililamino)-4-(trimetilsililoxi)-s-triazina

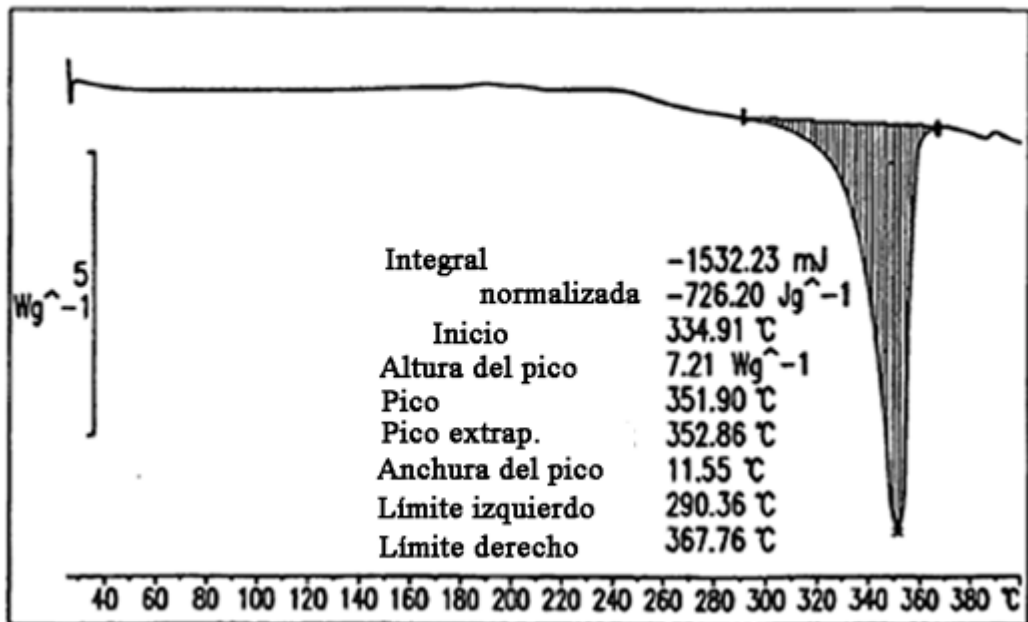


FIG.4



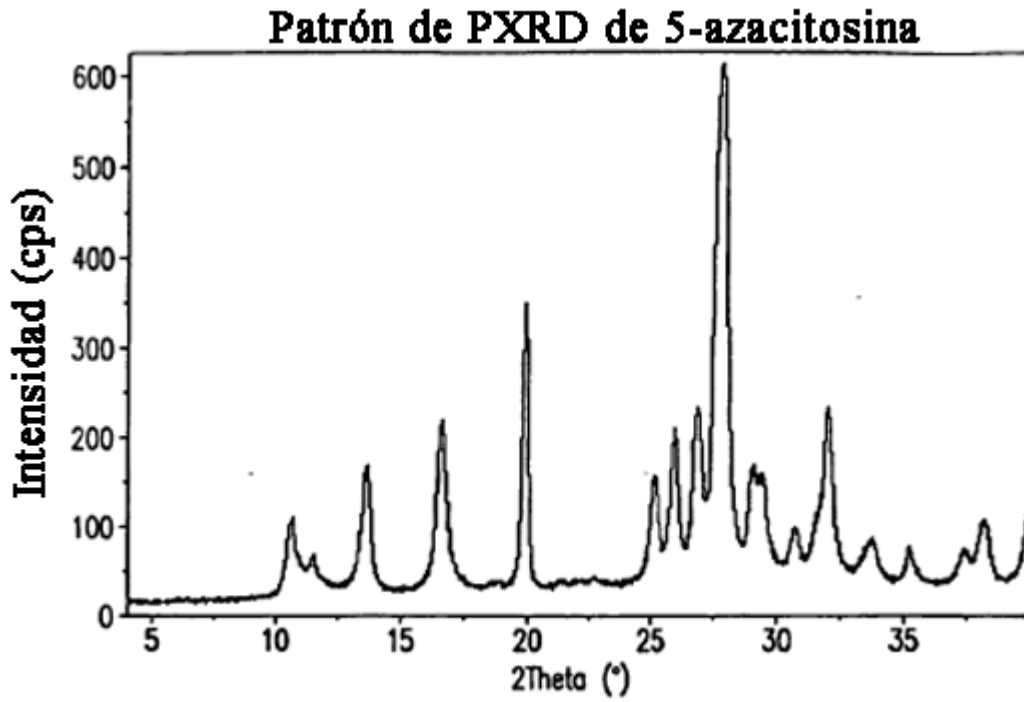


FIG.5

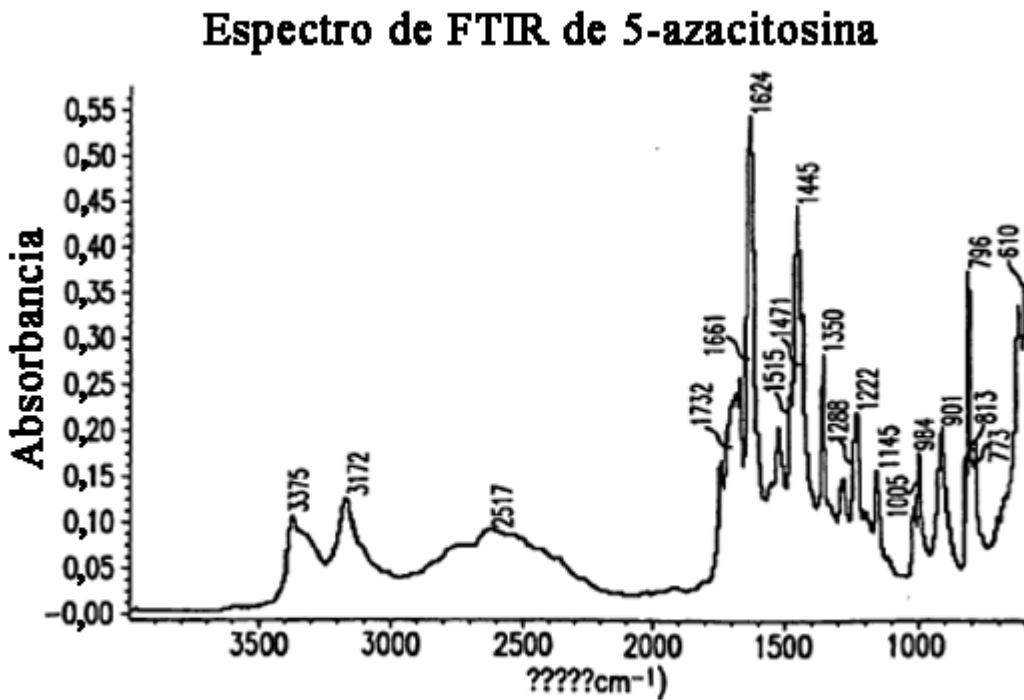


FIG.6

Cromatograma de HPLC de azacitidina disuelta en DMSO.

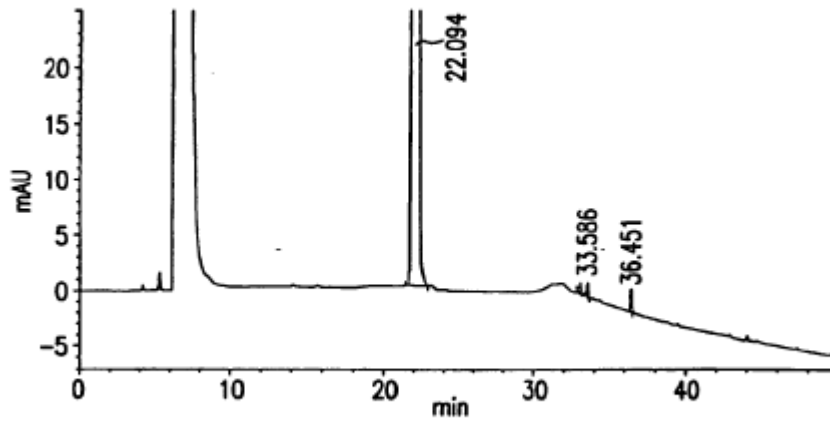


FIG.7

Cromatograma de HPLC de azacitidina disuelta en DMPU

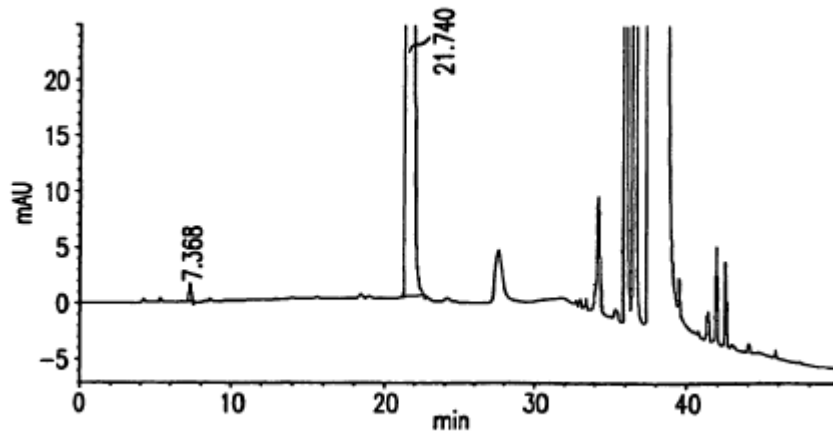


FIG.8

Cromatograma de HPLC de azacitidina disuelta en agua

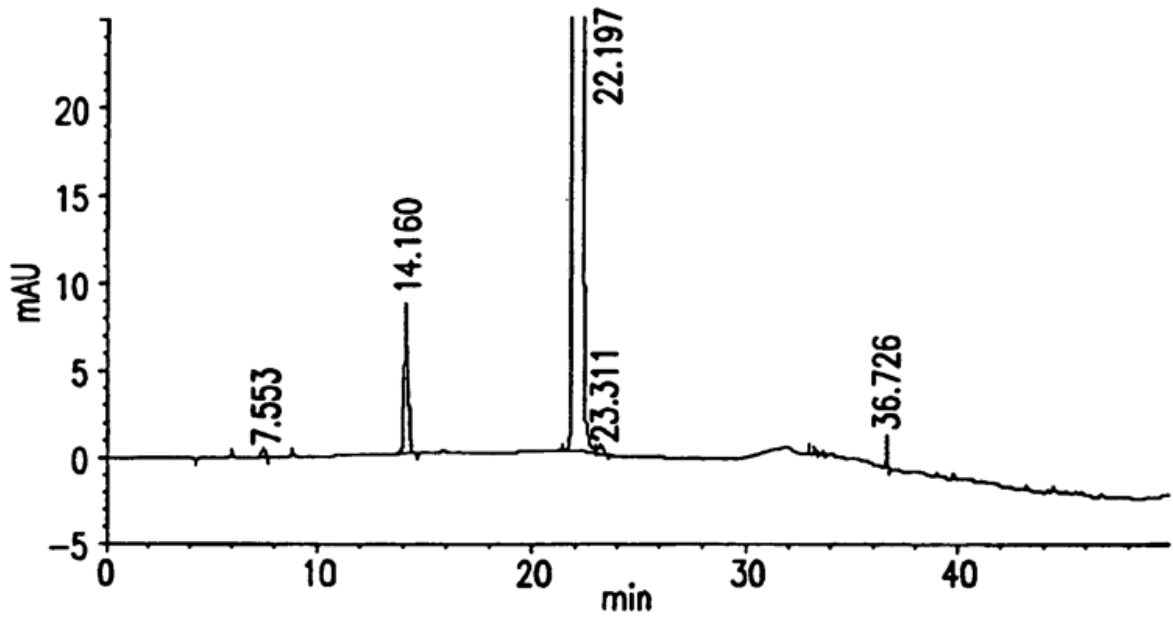


FIG.9