



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 456 896**

⑫ Int. Cl.:
C07D 405/04 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2011 E 11154854 (1)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2371825**

④ Título: **Procedimiento para la síntesis de azacitidina y decitabina**

⑩ Prioridad:
30.03.2010 IT MI20100524

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2014

⑩ Titular/es:
**CHEMI SPA (100.0%)
Via Dei Lavoratori, 54
20092 Cinisello Balsamo (MI), IT**

⑩ Inventor/es:
**DE FERRA, LORENZO;
ZENONI, MAURIZIO;
TURCHETTA, STEFANO;
ANIBALDI, MAURO;
AMMIRATI, ETTORE;
BRANDI, PAOLO y
BERARDI, GIORGIO**

⑩ Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

ES 2 456 896 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

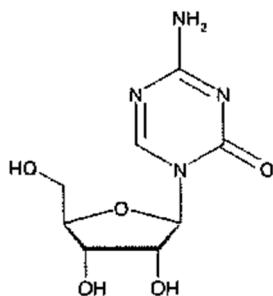
Procedimiento para la síntesis de azacitidina y decitabina

La invención se refiere a la síntesis de azacitidina (denominada también amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2(1*H*)-ona) y decitabina (denominada también 4-amino-1-(2-desoxi-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2(1*H*)-ona).

5 Técnica anterior en el campo de la invención

Se usan varios fármacos con una estructura química análoga a la de los nucleósidos naturales en el campo de los fármacos antivíricos y antitumorales.

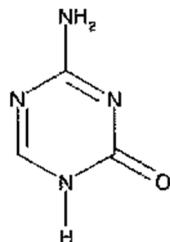
La azacitidina, con una fórmula estructural que se indica a continuación,



AZACITIDINA 1

es una fármaco antitumoral eficaz para el tratamiento del síndrome mielodisplásico (MDS) y fue el primer fármaco aprobado por la FDA para esta enfermedad.

15 Se informó de la síntesis del mismo, basada en la construcción del anillo de s-triazina comenzando a partir de un azúcar convenientemente sustituido, por primera vez en Collect. Czech. Chem. Commun. 29, 2060 (1964) y también se informó en el documento US335038S. Los esquemas sintéticos que prevén la silylación de azacitosina, con una fórmula estructural que se indica a continuación,

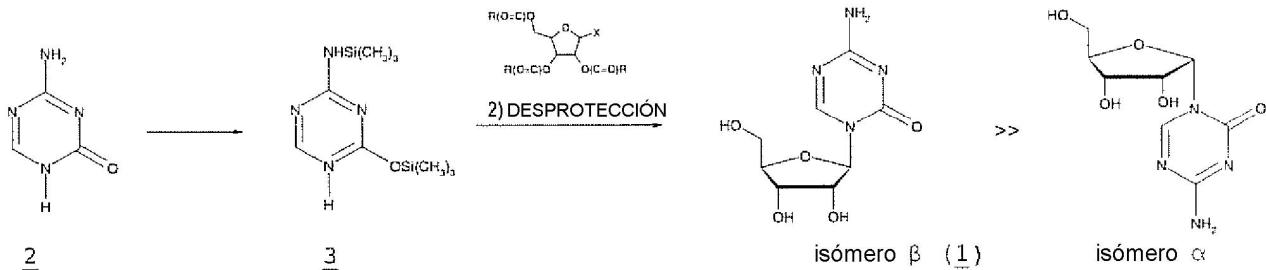


AZACITOSINA 2

y el posterior acoplamiento con derivados de ribosa, permiten preparar la azacitidina con un número bajo de etapas.

20 Normalmente, se emplea un derivado de D-ribosa con un grupo aciloxi en la posición 2 que determina, de acuerdo con la regla de Baker, una buena selectividad en favor del isómero β en la reacción de acoplamiento, de acuerdo con el esquema de síntesis indicado a continuación.

1) ACOPLAMIENTO CON



En la literatura científica y de patente se indican varios procedimientos experimentales que siguen este enfoque sintético.

La síntesis de azacitidina haciendo reaccionar azacitosina silitada 3 con bromuro de tri-O-acetyl-D-ribofuranosil se describe en J. Org. Chem. 35, 491 (1970). El rendimiento indicado es igual a un 34 % que se reduce a un 11 % después de la cristalización. Dichos rendimientos, en combinación con el uso de un reactivo difícil de manejar como el derivado de bromuro de ribosa, hace q este procedimiento sea inadecuado para preparar la azacitidina a escala comercial.

Vorbrüggen y Niedballa en J. Org. Chem. 39, 3672 (1974) y el documento US3S17980 describen un procedimiento para la preparación de azacitidina protegida con un rendimiento de un 81 %. El artículo no indica el rendimiento después de la desprotección. El procedimiento prevé la silitación de azacitosina con una mezcla de hexametildisilazano (HMDS) y cloruro de trimetilsililo (TMSCl) en piridina. Al final de la reacción, se retiran el exceso de los reactivos y la piridina para evitar la inactivación del catalizador de acoplamiento (véase, Vorbrüggen y Niedballa J. Org. Chem. 39, 3654 (1974)).

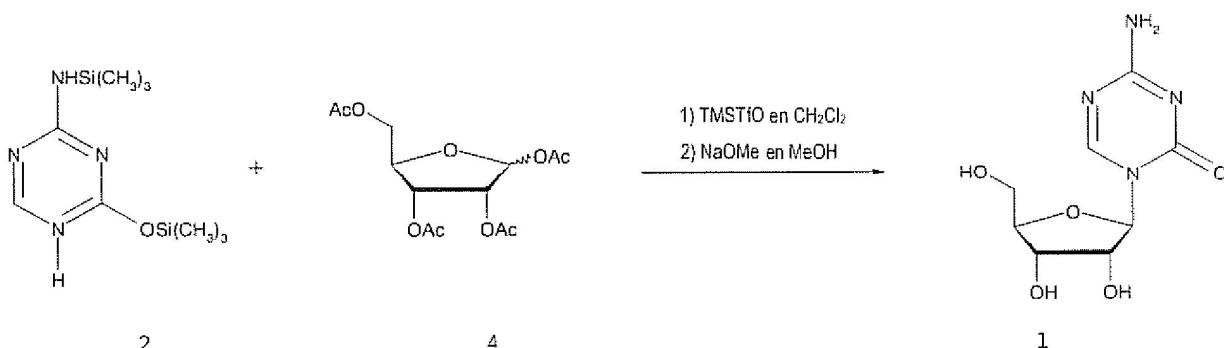
Esta operación se realiza por medio de destilación a vacío hasta que se obtiene un líquido que cristaliza y que se lava con benceno.

Considerando las dificultades que se encuentran cuando se trata y se agita un residuo de destilación que se solidifica y los problemas relacionados con el uso de disolventes perjudiciales para la salud tales como benceno, queda claro que dichas operaciones pueden encontrar aplicación exclusivamente en una preparación de laboratorio a pequeña escala.

Otra desventaja observada siguiendo este procedimiento, que prevé el uso de tetracloruro de estaño como catalizador de acoplamiento, radica en el hecho de que es difícil mantener el nivel de estaño residual en la azacitidina final en niveles aceptables.

Una contribución a la solución de estos problemas de síntesis de azacitidina se indica en el artículo de Piskala y Sorm (Nucleic Acid Chemistry 435 (1978)): en este caso, se usa tolueno, que es un disolvente menos tóxico, cuando se purifica la azacitosina silitada en lugar de benceno. Además, los autores usan cloruro de tri-O-benzoil-D-ribofuranosilo en acetonitrilo, sin añadir catalizadores, para la posterior reacción de acoplamiento. Sin embargo, aún existe la dificultad representada por la retirada de hexametildisilazano (HMDS) usado en exceso en la reacción de silitación, llevada a cabo incluso en este caso hasta que se obtiene un residuo y adicionalmente, por el tratamiento de la reacción de acoplamiento, en la que se prevé el uso de una espátula de laboratorio para disgregar la mezcla de reacción en pequeñas partes. Claramente, dichos procedimientos no son escalables en la producción de azacitidina para uso farmacéutico.

El documento US7038038 describió el siguiente procedimiento: se hace reaccionar tetraacetil-D-ribosa (4) con la azacitosina silitada (3), obtenida a su vez haciendo reaccionar (dos horas) azacitosina con hexametildisilazano (HMDS) en presencia de sulfato de amonio con calor (véase el esquema de síntesis indicado a continuación).



30

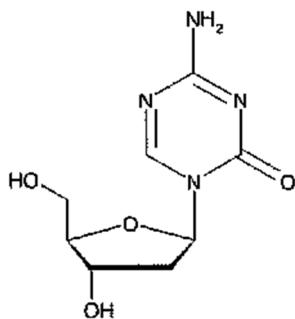
2

4

1

Antes del acoplamiento con tetraacetilribosa, se retira el exceso de agente de silitación por destilación al residuo. La reacción de acoplamiento se produce en diclorometano, prevé el uso de trimetilsililtriflato (TMSOTf) como catalizador y tiene una duración de dos horas. Por último, se produce la retirada de grupos acetilo haciendo reaccionar con metilato de sodio en metanol. Dicho procedimiento permite la producción de azacitidina con un rendimiento de un 44,9 %, pero tampoco es adecuado para la producción de azacitidina a escala comercial debido a la necesidad de retirar el exceso de HMDS hasta que se obtiene una mezcla pastosa, que es difícil de agitar. Se puede encontrar un intento de resolver dicho problema en el mismo documento (US7038038) indicado en los ejemplos 5 y 6: se realiza la reacción de silitación con una mezcla de reactivos (HMDS y cloruro de trimetilsililo) en acetonitrilo; a la mezcla de reacción que contiene la nucleobase silitada, se le añade TMSOTf como catalizador de acoplamiento y el derivado tetracetilo de ribosa, para obtener una azacitosina protegida. Aunque representa una simplificación de la síntesis, dicho procedimiento da lugar a un incremento en la duración de las reacciones (veinte horas tanto para la silitación como para el acoplamiento) y a una disminución en el rendimiento que es igual a un 41,3 % para un producto bruto, con una pureza o rendimiento de transformación en azacitidina del nivel farmacéutico requerido para el uso de la misma como ingrediente activo para uso humano, que no se indican.

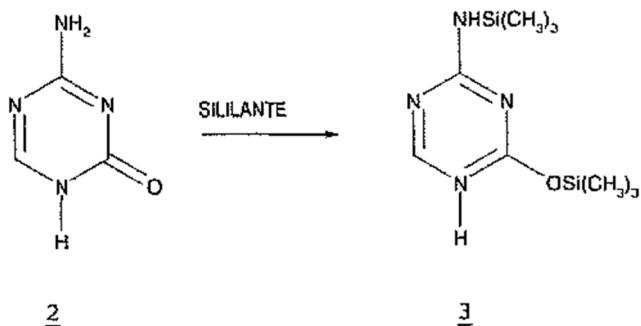
45 La base nitrogenada azacitosina 2 se usa como material de partida incluso para la síntesis de otro fármaco, decitabina 5, con una principal indicación que es el síndrome de mielodisplasia (MDS).



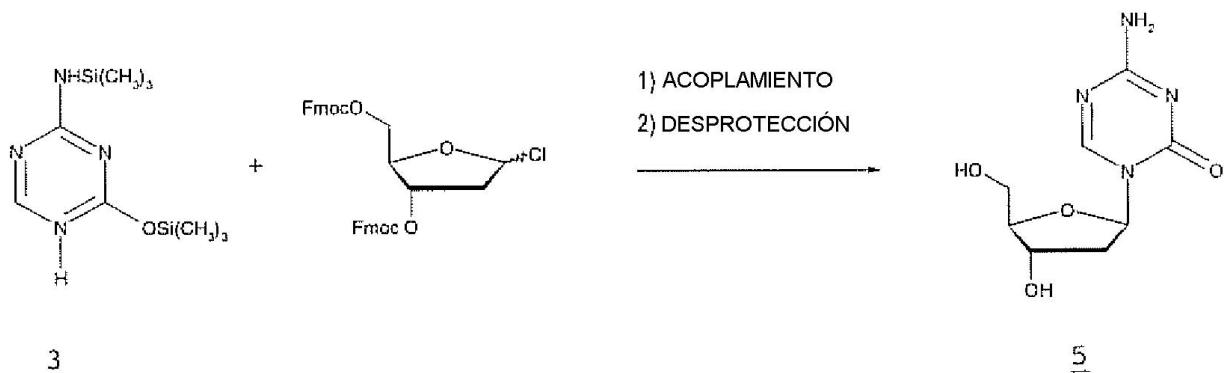
DECITABINA 5

- Los problemas descritos con respecto a la síntesis de azacitidina también se observan en el caso de decitabina con una complicación adicional que deriva del hecho de que la ausencia del grupo hidroxilo en la posición 2' de decitabina no permite aprovecharse de la mayor selectividad hacia el isómero β en la reacción de acoplamiento cuando está presente un grupo hidroxilo acilado en esa posición (regla de Baker).
- 5

El uso del derivado 3 obtenido por medio de la doble silylación a partir de azacitosina 2 (de acuerdo con el esquema indicado a continuación) incluso para la preparación de decitabina, está presente en la literatura.



- 10 También en este caso, para evitar posibles interferencias en las posteriores etapas del procedimiento, se retiran todos los componentes volátiles presentes al final de la reacción por destilación (véase, por ejemplo, los documentos US3S17980, EP2048151 y WO20090S6687). Dicho procedimiento no es adecuado para la producción a nivel industrial considerando que el residuo, durante la concentración, tiende a solidificarse y por tanto los sistemas de agitación podrían operar irregularmente o se podrían dañar. En la síntesis de decitabina indicada en J. Org. Chem. 51, 3211(1986) la azacitosina bis-silylada se añade a la mezcla de reacción. Incluso esta operación, que requiere el manejo de una sustancia sensible al 15 contacto con la humedad ambiente, apenas es aplicable en una escala de producción.



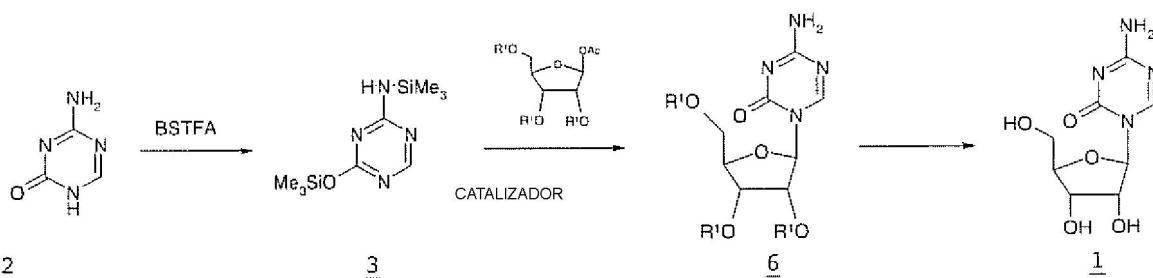
- En el documento US2010/0036112 se describe un procedimiento para la síntesis de azacitidina, que comprende la reacción de silylación de azacitosina con hexametildisilazano (HMDS), la reacción de acoplamiento del intermedio silylado así obtenido con 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranosa en acetonitrilo, y la posterior reacción de desprotección del producto de la reacción de acoplamiento para obtener la azacitidina. La reacción de silylación se realiza directamente en un gran exceso molar de hexametildisilazano, en consecuencia, con costes de producción altos; además, el intermedio silylado así obtenido se debe aislar antes de someterse a la posterior reacción de acoplamiento en acetonitrilo, con un incremento adicional de los costes de producción.
- 20

Por tanto, es evidente que los procedimientos disponibles comercialmente para la síntesis de nucleósidos que derivan de azacitosina todavía revela problemas sin resolver relacionados con su posible uso a nivel industrial.

Descripción de la invención

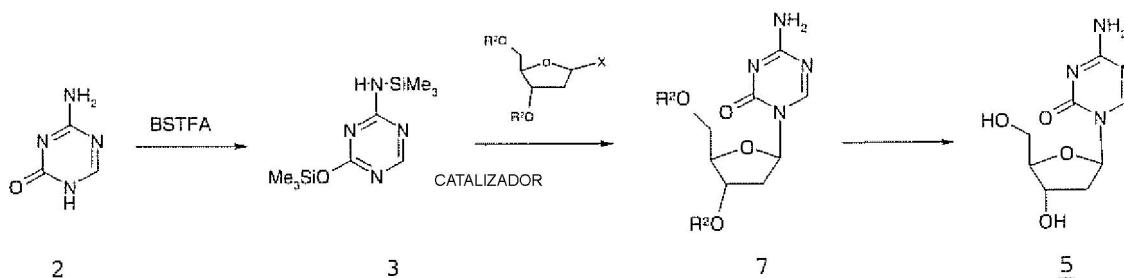
5 Con la presente invención se descubrió por primera vez un procedimiento para la síntesis de azacitidina y decitabina adecuado para una escala de producción comercial que puede permitir que los productos se aíslen con buenos rendimientos y con una alta pureza, sin tener que usar un gran exceso molar de reactivos de silitación y la operación de retirar el exceso de reactivos de silitación aún presentes al final de la reacción. Todas las operaciones del procedimiento objeto de la presente invención son adecuadas para la producción a escala comercial de azacitidina y decitabina y se 10 pueden realizar convenientemente de forma secuencial evitando las etapas de tratamiento y aislamiento de los intermedios con la consecuente reducción de la duración del procedimiento y una mejora en la productividad.

El modo de realización de la presente invención consiste en la preparación de azacitidina de acuerdo con el siguiente esquema.



En el que Ac representa acetilo y R¹ se selecciona preferentemente de entre acetilo y/o benzoilo.

15 El correspondiente esquema para la síntesis de decitabina es como sigue.



En el que R² se selecciona preferentemente de entre acetilo, p-toluoilo, p-cloro-benzoilo y/o p-nitro-benzoilo y X se selecciona preferentemente de entre un grupo alcoxi, un grupo aciloxi o un halógeno, preferentemente un grupo metoxi, un grupo acetiloxi o un átomo de cloro.

20 Sorprendentemente, se descubrió que, al usar N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA) como reactivo de silitación de la base nitrogenada azacitosina **2**, para obtener la azacitosina silitada **3**, es posible completar la reacción de silitación a baja temperatura y en períodos de tiempo cortos usando un bajo exceso molar de BSTFA. Además, se descubrió que, sin tener que reemplazar el disolvente y sin tener que retirar el exceso de agente de silitación o los subproductos de reacción de los mismos, es posible realizar directamente la posterior reacción de acoplamiento añadiendo simplemente el derivado de azúcar y el catalizador a la mezcla de la reacción de silitación. Incluso, esta segunda reacción transcurre en 25 condiciones moderadas y su terminación se produce en pocas horas.

Una característica distintiva de la presente invención, que implica una simplificación ventajosa del procedimiento de producción tanto de azacitidina como de decitabina, radica en el hecho de que la azacitosina silitada **3** no se aísla.

Además, la reacción de desprotección final se puede realizar sin tener que aislar necesariamente el nucleósido protegido, 30 sino alcalinizando directamente mediante el uso de un reactivo adecuado, tal como, por ejemplo, metilato de sodio o amoníaco, la mezcla de la reacción de acoplamiento previa después de realizar un cambio adecuado de disolvente.

De forma alternativa, evitando aún el aislamiento del nucleósido protegido, se pueden usar las condiciones descritas en la técnica anterior, tales como, por ejemplo, la desprotección usando metilato de sodio en metanol o amoníaco en metanol, después de un tratamiento acuoso simple.

35 Se pueden usar varios disolventes no silitados apróticos orgánicos entre diclorometano, dicloroetano y/o acetonitrilo para la reacción de silitación y acoplamiento para implementar el presente procedimiento; preferentemente, se usa

- 5 diclorometano y/o acetonitrilo como disolvente. La proporción entre la cantidad de disolvente orgánico y la de los sustratos que quedan por reaccionar es de 3 a 100 partes en volumen (litros) de disolvente orgánico por cada parte en peso (kilogramo) de azacitosina. El procedimiento objeto de la presente invención permite evitar la pérdida de reactivo de silylación típica de los procedimientos usados actualmente; de hecho, se puede usar una cantidad ligeramente mayor de moles con respecto a la proporcionada para la doble silylación de azacitosina. Preferentemente, se pueden usar de 2 a 3 moles de BSTFA por mol de azacitosina, aún más preferentemente se usan de 2,2 a 2,5 por mol de azacitosina.
- 10 Otro aspecto particularmente útil de este procedimiento reside en el hecho de que se minimiza el manejo de la azacitosina silylada, que es un compuesto inestable en contacto con agua y humedad atmosférica.
- 15 La reacción de silylación se puede realizar a temperaturas de entre 0° y la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción, preferentemente entre 25 °C y dicha temperatura de reflujo, aún más preferentemente a una temperatura por debajo de 100 °C.
- 20 Al operar en las condiciones de reacción del presente procedimiento, la reacción de silylación de azacitosina se completa en pocas horas y normalmente dicha terminación se produce en menos de cuatro horas.
- 25 En la reacción de acoplamiento se usan derivados de D-ribofuranosa con la función hidroxilo acetilada para la implementación del presente procedimiento para la síntesis de azacitidina. Entre estos, se pueden usar de forma conveniente los derivados comerciales 1,2,3,5-tetra-O-acetil-D-ribofuranosa o 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoyl-D-ribofuranosa; más preferentemente se usa 1,2,3,5-tetra-O-acetil-D-ribofuranosa.
- 30 Se pueden usar derivados de D-2-desoxiribofuranosa que tienen un grupo saliente en la posición 1 y las otras funciones hidroxilo aciladas para la síntesis de decitabina.
- 35 20 El grupo saliente en la posición 1 puede ser un grupo alcoxi, un grupo aciloxi o un halógeno, más preferentemente puede ser un grupo metoxi, un grupo acetiloxi o un cloro, aún más preferentemente cloro. Para proteger las otras funciones hidroxilo de la desoxiribosa se pueden usar convenientemente entre el grupo acilo, el grupo acetilo, el grupo p-toluoílo, el grupo p-clorobenzoílo y el grupo p-nitro-benzoílo; se puede usar preferentemente el grupo p-toluoílo y el grupo p-cloro-benzoílo. Preferentemente, los productos comerciales usados para la síntesis de decitabina son 1-cloro-3,5-di-p-toluoíl-2-desoxi-D-ribofuranosa y 1-cloro-3,5-bis-p-clorobenzoíl-2-desoxi-D-ribofuranosa.
- 40 35 La presencia de un catalizador ácido de Lewis facilita la reacción de acoplamiento. Son preferentes los catalizadores empleados normalmente en este tipo de reacción, tales como tetracloruro de estaño, tetracloruro de titanio, cloruro de cinc, eterato trifluoruro de boro, trimetilsililtriflato y trimetilsililnonaflato. El trimetilsililtriflato (TMSTfO) es particularmente preferente en la reacción de acoplamiento.
- 45 30 Incluso para la reacción de acoplamiento, la temperatura de reacción puede estar comprendida entre 0° y la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción, preferentemente entre 25 °C y dicha temperatura de reflujo, aún más preferentemente por debajo de 100 °C. En las condiciones de reacción indicadas, la reacción transcurre en un periodo de tiempo corto y típicamente se completa en menos de cuatro horas tanto en el caso de azacitidina como en el caso de decitabina.
- 50 35 Para ambos productos, al final de la reacción de acoplamiento es posible avanzar directamente hasta la reacción de desprotección final simplemente reemplazando el disolvente de reacción usado para el acoplamiento con el disolvente de la reacción de desacilación, que preferentemente puede ser un alcohol C₁-C₄, preferentemente metanol.
- 40 Dicho procedimiento es sumamente práctico y particularmente ventajoso porque permite evitar el uso de soluciones acuosas en toda la secuencia sintética. Dicho resultado es particularmente significativo considerando la rápida degradación del anillo de triazina presente en la molécula objeto de la presente invención en contacto con agua (véase, por ejemplo, J. Med. Chem. 21, 204 (1978)).
- 45 De forma alternativa, al final de la reacción de acoplamiento, se puede lavar la mezcla de reacción usando soluciones acuosas tamponadas siguiendo las enseñanzas de la literatura (por ejemplo, véase, J. Org. Chem. 35, 491 (1970), J. Org. Chem. 39, 3672 (1974) y el documento US7038038).
- 50 Sin tener que avanzar hasta el aislamiento del intermedio nucleósido protegido y purificación del mismo por cromatografía y/o por cristalización, independientemente del tipo de tratamiento adoptado al final de la reacción de acoplamiento, la síntesis se completa por desprotección en un alcohol C₁-C₄, preferentemente en metanol, con amoníaco o metilato de sodio, de acuerdo con los procedimientos previamente conocidos en la técnica (tales como, por ejemplo, J. Org. Chem. 35, 491 (1970), J. Org. Chem. 39, 3672 (1974) y el documento US703803S).
- En el caso de azacitidina, al usar metanol como disolvente en la reacción de desprotección, se produce su cristalización directamente durante la reacción para obtener, con rendimientos que exceden el 35 % y que incluso exceden el 75 %, una azacitidina de buena calidad (pureza HPLC > 90 %). Una única recristalización de las mezclas DMSO/metanol da lugar a una azacitidina con una pureza de HPLC ≥ 99,8 %.

Incluso en el caso de decitabina, si se usa metanol como disolvente en la reacción de desprotección, se produce la cristalización del producto directamente durante la reacción para obtener, con rendimientos que exceden el 30 %, una decitabina de alta calidad (pureza HPLC > 99 %).

5 La combinación de la simplicidad del procedimiento con la alta calidad de los productos obtenidos y el alto rendimiento del procedimiento hace que la presente invención sea particularmente ventajosa para la preparación de azacitidina y decitabina a escala comercial.

Los ejemplos que siguen tienen el fin de ilustrar algunos de los posibles modos de realización de la presente invención y no deben interpretarse como restrictivos de la misma.

Ejemplos

10 Ejemplo 1. Preparación de azacitidina.

Se añaden 34,7 ml de BSTFA a una suspensión de 6,3 g de azacitosina en 126 ml de diclorometano. Se lleva la mezcla a temperatura de reflujo y se agita durante 90 minutos. A la solución limpida se añaden 11,35 ml de trimetilsililtriflato y a continuación una solución de 16,7 g de 1,2,3,5-tetra-O-acetil-D-ribofuranosa en 33 ml de diclorometano, en aproximadamente diez minutos. Se mantiene el reflujo y la agitación durante dos horas, se enfriá hasta temperatura ambiente y se vierte sobre una solución de 9,5 g de bicarbonato de sodio en 330 ml de agua. Se agita durante diez minutos, se ajusta el pH a pH = 4,5 usando ácido acético. Se deja que repose, se separan las fases, se lava la fase acuosa dos veces usando 125 ml de diclorometano para cada lavado. Se combinan las fases orgánicas que están ahnídridas tratándolas con cloruro de calcio anhídrido. Se lleva a cabo la concentración a baja presión hasta que se obtiene un residuo viscoso. Se recupera el residuo con 250 ml de metanol, se concentra una vez más a baja presión hasta que se obtiene un residuo viscoso. Se añaden 250 ml de metanol, se calienta hasta 50 °C y se añaden 10 ml de una solución al 10 % de metilato de sodio en metanol. Se agita durante 1 hora, se enfriá hasta temperatura ambiente, se agita para completar la precipitación y se filtra el sólido lavándolo sobre el filtro con metanol.

Se obtienen 6,5 g de azacitidina con una pureza HPLC (UV 254 nm) de un 93,8 % después de secar a baja presión.

Ejemplo 2. Preparación de azacitidina.

25 Se añaden 34,7 ml de BSTFA a una suspensión de 6,3 g de azacitosina en 126 ml de acetonitrilo. Se lleva la mezcla a 50 °C y se agita durante 90 minutos. A la solución limpida se añaden 11,35 ml de trimetilsililtriflato y a continuación una solución de 16,7 g de 1,2,3,5-tetra-O-acetil-D-ribofuranosa en 33 ml de acetonitrilo, en aproximadamente diez minutos. Se mantiene la agitación durante 75 minutos, se enfriá hasta temperatura ambiente y se vierte lentamente sobre una mezcla constituida por 500 ml de diclorometano y 330 ml de agua en la que se habían disuelto previamente 9,5 g de bicarbonato de sodio. Se lleva a cabo la agitación durante 15 minutos y se ajusta el pH a pH = 4,5 usando ácido acético. Se deja que la mezcla repose y se separan las fases. Se lava la fase acuosa dos veces usando 125 ml de diclorometano para cada lavado. Se combinan las fases orgánicas que están ahnídridas tratándolas con cloruro de calcio anhídrido. Se lleva a cabo la concentración a baja presión hasta que se obtiene un residuo viscoso. Se recupera el residuo con 250 ml de metanol, se concentra una vez más a baja presión hasta que se obtiene un residuo viscoso. Se añaden 250 ml de metanol, se calienta hasta 50 °C y se añaden 15 ml de una solución al 10 % de metilato de sodio en metanol. Se agita durante 1 hora, se enfriá hasta temperatura ambiente, se agita para completar la precipitación y se filtra el sólido lavándolo sobre el filtro con metanol.

Se obtienen 8,5 g de azacitidina con una pureza HPLC (UV 254 nm) de un 98,7 % después de secar a baja presión.

Ejemplo 3. Preparación de azacitidina.

40 Se añaden 34,7 ml de BSTFA a una suspensión de 6,3 g de azacitosina en 126 ml de diclorometano. Se lleva la mezcla a temperatura de reflujo y se agita durante 90 minutos. A la solución limpida se añaden 62 ml de una solución 1 M de tetracloruro de estaño en diclorometano y a continuación una solución de 16,7 g de 1,2,3,5-tetra-O-acetil-D-ribofuranosa en 33 ml de diclorometano, en aproximadamente diez minutos. Se mantienen el reflujo y la agitación durante 75 minutos, se enfriá hasta temperatura ambiente y se vierte sobre una solución de 9,5 g de bicarbonato de sodio en 330 ml de agua. 45 Se agita durante diez minutos, se ajusta el pH a pH = 4,5 usando hidróxido de sodio al 30 % en agua. Se deja que repose, se filtra en filtro de tierra y se separan las fases, se lava la fase acuosa dos veces usando 125 ml de diclorometano para cada lavado. Se combinan las fases orgánicas que están ahnídridas tratándolas con cloruro de calcio anhídrido. Se lleva a cabo la concentración a baja presión hasta que se obtiene un residuo viscoso. Se recupera el residuo con 250 ml de metanol, se concentra una vez más a baja presión hasta que se obtiene un residuo viscoso. Se añaden 250 ml de metanol, se calienta hasta 50 °C y se añaden 10 ml de una solución al 10 % de metilato de sodio en metanol. Se agita durante 1 hora, se enfriá hasta temperatura ambiente, se agita para completar la precipitación y se filtra el sólido lavándolo sobre el filtro con metanol.

50 Se obtienen 5,2 g de azacitidina con una pureza HPLC (UV 254 nm) de un 96,5 % después de secar a baja presión.

Ejemplo 4. Preparación de azacitidina.

- Se añaden 34,7 ml de BSTFA a una suspensión de 6,3 g de azacitosina en 126 ml de acetonitrilo. Se lleva la mezcla a 50 °C y se agita durante 90 minutos. A la solución límpida se añaden 7 ml de tetracloruro de titanio y a continuación una solución de 16,7 g de 1,2,3,5-tetra-O-acetil-D-ribofuranosa en 33 ml de acetonitrilo, en aproximadamente diez minutos. Se mantiene la agitación durante 120 minutos, se enfriá hasta temperatura ambiente y se vierte lentamente sobre una mezcla constituida por 500 ml de diclorometano y 330 ml de agua en la que se habían disuelto previamente 9,5 g de bicarbonato de sodio. Se lleva a cabo la agitación durante 15 minutos y se ajusta el pH a pH = 4,5 usando hidróxido de sodio al 30 % en agua. Se filtra sobre un filtro de tierra, se deja que la mezcla repose y se separan las fases. Se lava la fase acuosa dos veces usando 125 ml de diclorometano para cada lavado. Se combinan las fases orgánicas que están ahnídridas tratándolas con cloruro de calcio anhídrido. Se lleva a cabo la concentración a baja presión hasta que se obtiene un residuo viscoso. Se recupera el residuo con 250 ml de metanol, se concentra una vez más a baja presión hasta que se obtiene un residuo viscoso. Se añaden 250 ml de metanol, se calienta hasta 50 °C y se añaden 15 ml de una solución al 10 % de metilato de sodio en metanol. Se agita durante 1 hora, se enfriá hasta temperatura ambiente, se agita para completar la precipitación y se filtra el sólido lavándolo sobre el filtro con metanol.
- 15 Se obtienen 4,7 g de azacitidina con una pureza HPLC (UV 254 nm) de un 97,2 % después de secar a baja presión.

Ejemplo 5. Preparación de azacitidina.

- Se añaden 34,7 ml de BSTFA a una suspensión de 6,3 g de azacitosina en 126 ml de acetonitrilo. Se lleva la mezcla a 50 °C y se agita durante 90 minutos. A la solución límpida se añaden 11,35 ml de trimetilsililtriflato y a continuación una suspensión de 29,0 g de 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoyl-D-ribofuranosa en 50 ml de acetonitrilo, en aproximadamente diez minutos. Se mantiene la agitación durante 75 minutos, se enfriá hasta temperatura ambiente y se vierte lentamente sobre una mezcla constituida por 500 ml de diclorometano y 330 ml de agua en la que se habían disuelto previamente 9,5 g de bicarbonato de sodio. Se lleva a cabo la agitación durante 15 minutos y se ajusta el pH a pH = 4,5 usando ácido acético. Se deja que la mezcla repose y se separan las fases. Se lava la fase acuosa dos veces usando 125 ml de diclorometano para cada lavado. Se combinan las fases orgánicas que están ahnídridas tratándolas con cloruro de calcio anhídrido. Se lleva a cabo la concentración a baja presión hasta que se obtiene un residuo viscoso. Se recupera el residuo con 250 ml de metanol, se concentra una vez más a baja presión hasta que se obtiene un residuo viscoso. Se añaden 250 ml de metanol, se calienta hasta 50 °C y se añaden 15 ml de una solución al 10 % de metilato de sodio en metanol. Se agita durante 1 hora, se enfriá hasta temperatura ambiente, se agita para completar la precipitación y se filtra el sólido lavándolo sobre el filtro con metanol.
- 30 Se obtienen 5,4 g de azacitidina con una pureza HPLC (UV 254 nm) de un 94,1 % después de secar a baja presión.

Ejemplo 6. Preparación de azacitidina.

- Se añaden 34,7 ml de BSTFA a una suspensión de 6,3 g de azacitosina en 126 ml de diclorometano. Se lleva la mezcla a temperatura de reflujo y se agita durante 90 minutos. A la solución límpida se añaden 11,35 ml de trimetilsililtriflato y a continuación una solución de 16,7 g de 1,2,3,5-tetra-O-acetil-D-ribofuranosa en 33 ml de diclorometano, en aproximadamente diez minutos. Se mantienen el reflujo y la agitación durante dos horas, se enfriá hasta temperatura ambiente, se añaden 250 ml de metanol controlando la temperatura en un baño de hielo. Se lleva a cabo la concentración a baja presión hasta que se obtiene un volumen de residuo de aproximadamente 150 ml, se añaden 250 ml de metanol y una vez más se lleva a cabo la concentración a baja presión hasta que se obtiene un volumen de residuo de aproximadamente 150 ml. Se añaden 200 ml de metanol, se calienta hasta 50 °C y se añaden 48 ml de una solución al 10 % de metilato de sodio en metanol. Se agita durante 1 hora, se enfriá hasta temperatura ambiente, se agita para completar la precipitación y se filtra el sólido lavándolo sobre el filtro con metanol.

Se obtienen 9,9 g de azacitidina con una pureza HPLC (UV 254 nm) de un 98,9 % después de secar a baja presión.

Después de la recristalización a partir de metanol-dimetilsulfóxido, la pureza HPLC (UV 254 nm) es de un 99,7 %.

Ejemplo 7. Preparación de azacitidina.

- 45 Se añaden 34,7 ml de BSTFA a una suspensión de 6,3 g de azacitosina en 126 ml de diclorometano. Se lleva la mezcla a temperatura de reflujo y se agita durante 90 minutos. A la solución límpida se añaden 11,35 ml de trimetilsililtriflato y a continuación una solución de 29 g de 2,3,5-tri-O-benzoyl-1-O-acetil-D-ribofuranosa en 50 ml de diclorometano, en aproximadamente diez minutos. Se mantienen el reflujo y la agitación durante dos horas, se enfriá hasta temperatura ambiente y se vierte la mezcla de reacción sobre 250 ml de metanol controlando la temperatura en un baño de hielo. Se lleva a cabo la concentración a baja presión hasta que se obtiene un volumen de residuo de aproximadamente 150 ml, se añaden 250 ml de metanol y una vez más se lleva a cabo la concentración a baja presión hasta que se obtiene un volumen de residuo de aproximadamente 150 ml. Se añaden 200 ml de metanol, se calienta hasta 50 °C y se añaden 48 ml de una solución al 10 % de metilato de sodio en metanol. Se agita durante 1 hora, se enfriá hasta temperatura ambiente, se agita para completar la precipitación y se filtra el sólido lavándolo sobre el filtro con metanol.
- 55 Se obtienen 9,3 g de azacitidina con una pureza HPLC (UV 254 nm) de un 91,6 % después de secar a baja presión.

Ejemplo 8. Preparación de azacitidina.

Se añaden 34,7 ml de BSTFA a una suspensión de 6,3 g de azacitosina en 126 ml de dicloroetano. Se lleva la mezcla a temperatura de reflujo y se agita durante 90 minutos. A la solución límpida se añaden 11,35 ml de trimetilsililtriflato y a continuación una solución de 16,7 g de 1,2,3,5-tetra-O-acetil-D-ribofuranosa en 50 ml de dicloroetano, en 5 aproximadamente diez minutos. Se mantienen el reflujo y la agitación durante 60 minutos, se enfría hasta temperatura ambiente y se vierte sobre una solución de 9,5 g de bicarbonato de sodio en 330 ml de agua. Se agita durante diez minutos, se ajusta el pH a pH = 4,5 usando ácido acético. Se deja que repose, se separan las fases, se lava la fase acuosa dos veces usando 125 ml de dicloroetano para cada lavado. Se combinan las fases orgánicas que están ahnídridas tratándolas con cloruro de calcio anhídrido. Se lleva a cabo la concentración a baja presión hasta que se obtiene un residuo viscoso. Se recupera el residuo con 250 ml de metanol, se concentra una vez más a baja presión hasta que se obtiene un residuo viscoso. Se añaden 250 ml de metanol, se calienta hasta 50 °C y se añaden 10 ml de una solución al 10 % de metilato de sodio en metanol. Se agita durante 1 hora, se enfría hasta temperatura ambiente, se agita para completar la precipitación y se filtra el sólido lavándolo sobre el filtro con metanol.

Se obtienen 5,0 g de azacitidina con una pureza HPLC (UV 254 nm) de un 91,4 % después de secar a baja presión.

15 Ejemplo 9. Preparación de decitabina.

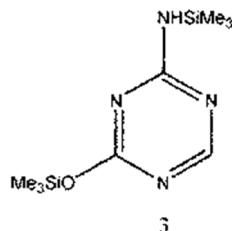
Se añaden 34 ml de BSTFA a una suspensión de 6,4 g de azacitosina en 300 ml de acetonitrilo. Se lleva la mezcla a 50 °C y se agita durante 90 minutos. Se enfría hasta temperatura ambiente, se añaden 6,3 ml de trimetilsililtriflato y 11,1 g de 1-cloro-3,5-di-p-toluoil-2-desoxi-D-ribofuranosa a la solución, en aproximadamente diez minutos. Se agita durante 140 minutos, se añaden 400 ml de metanol controlando la temperatura en un baño de hielo. Se lleva a cabo la concentración a 20 baja presión hasta que se obtiene un residuo viscoso, se añaden 400 ml de metanol, se calienta hasta 50 °C y se añaden 36 ml de solución al 30 % de metilato de sodio en metanol. Se agita durante 1 hora, se enfría hasta 0 °C, se agita para completar la precipitación y se filtra el sólido lavándolo sobre el filtro con metanol.

Se obtienen 2,3 g de decitabina con una pureza HPLC (UV 254 nm) de un 99,2 % después de secar a baja presión.

Después de la recristalización a partir de metanol la pureza HPLC (UV 254 nm) es de un 99,8 %.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la síntesis de azacitidina o decitabina, que comprende la reacción de silylación de azacitosina en de 3 a 100 partes en volumen de un disolvente orgánico aprótico no silylado por cada parte en peso de azacitosina, en presencia de un agente de silylación, caracterizado porque dicho agente de silylación es N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida.
- 5 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho disolvente orgánico está seleccionado de entre diclorometano, dicloroetano y/o acetonitrilo.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se usan de 2 a 3 moles de N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida por mol de azacitosina.
- 10 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque se usan de 2,2 a 2,5 moles de N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida por mol de azacitosina.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicha reacción de silylación se realiza a una temperatura comprendida entre 0 °C y la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción.
- 15 6. Procedimiento para la síntesis de azacitidina de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la reacción de acoplamiento de azacitosina silylada 3



así obtenida con un derivado de D-ribofuranosa con las funciones hidroxilo aciladas.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque dicho derivado está seleccionado de entre 1,2,3,5-tetra-O-acetyl-D-ribofuranosa y 1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-D-ribofuranosa.
- 20 8. Procedimiento para la síntesis de decitabina de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la reacción de acoplamiento de la azacitosina silylada así obtenida con un derivado de D-2-desoxiribofuranosa que tiene un grupo saliente en la posición 1 y las restantes funciones hidroxilo aciladas,
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque dicho grupo saliente está seleccionado de entre un grupo alcoxi, un grupo acilio o un halógeno.
- 25 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque dicho grupo saliente está seleccionado de entre un grupo metoxi, un grupo acetoxi o un átomo de cloro.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque dicho grupo acilio está seleccionado de entre acetilo, p-toluoílo, p-cloro-benzoílo y p-nitro-benzoílo.
- 30 12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque dicho derivado de D-2-desoxiribofuranosa está seleccionado de entre 1-cloro-3,5-di-p-toluoil-2-desoxi-D-ribofuranosa y 1-cloro-3,5-bis-p-clorobenzoyl-2-desoxi-D-ribofuranosa.
13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, caracterizado porque dicha reacción de acoplamiento se realiza en presencia de un ácido de Lewis.
- 35 14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque dicho ácido de Lewis está seleccionado de entre tetracloruro de estaño, tetracloruro de titanio, cloruro de cinc, eterato trifluoruro de boro, trimetilsililtriflato y trimetilsililnonaflato.
15. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, caracterizado porque dicha reacción de acoplamiento se realiza en el mismo disolvente de la reacción de silylación.
- 40 16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque dicha reacción de acoplamiento se realiza a una temperatura comprendida entre 0 °C y la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción,
17. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 6 a 12, que comprende la posterior desprotección de los intermedios acilados así obtenidos,

18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado porque dicha desprotección se realiza en un disolvente orgánico protólico.
19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque dicha desprotección se realiza en un alcohol C₁-C₄.
- 5 20. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, caracterizado porque dicho alcohol C₁-C₄ es metanol.
21. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la azacitosina silylada 3 no está aislada

