

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 487 525**

51 Int. Cl.:

C07H 13/04 (2006.01)

C07H 13/08 (2006.01)

C07H 19/12 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2009 E 09805656 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2318423**

54 Título: **Procedimiento para preparar nucleósidos de 5-azacitosina y sus derivados**

30 Prioridad:

08.08.2008 US 188431 P

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

21.08.2014

73 Titular/es:

**SCINOPHARM TAIWAN LTD. (100.0%)
1, Nan-Ke 8th Road Tainan Science-Based
Industrial Park
Tainan County 74144, TW**

72 Inventor/es:

**HENSCHKE, JULIAN PAUL;
ZHANG, XIAOHENG;
WANG, LUNGHU y
CHEN, YUNG FA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 487 525 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 preparar nucleósidos de 5-azacitosina y sus derivados

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la síntesis comercial eficiente de 1-glucosil-5-azacitosinas, a las que se hace referencia en lo sucesivo como nucleósidos de 5-azacitosina. Los métodos de la invención son particularmente útiles en la preparación de nucleósidos de 5-azacitosina, tales como 5-azacitidina (azacitidina), 2'-desoxi-5-azacitidina (decitabina). Es bien conocido que la azacitidina y su derivado ribodesoxi decitabina son útiles en el tratamiento de enfermedades, especialmente para el síndrome mielodisplásico (MDS).

Descripción de la técnica relacionada

10 Los ejemplos de nucleósidos de 5-azacitosina y su síntesis se han descrito previamente. La azacitidina (también conocida como 5-azacitidina, 5-AC y Vidaza™) y su derivado ribodesoxi decitabina (también conocida como 2'-desoxi-5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, DAC, Dacogen®) se sintetizaron por primera vez como agentes quimioterapéuticos potenciales contra el cáncer. Se han desarrollado varios métodos para prepararlos, pero estos métodos, en su conjunto, son ineficientes y menos deseables para la producción comercial. Un problema importante es que cuando el anillo de 5-azacitosina (anillo de s-triazina) se conjuga con un carbohidrato, es sensible a la descomposición por el agua (en condiciones neutras, ácidas y básicas), y de hecho experimenta una fácil hidrólisis en formulaciones acuosas, en emulsiones acuosas, en disoluciones acuosas y cuando se expone a la humedad en la elaboración acuosa durante la síntesis, haciendo que la fabricación comercial sea un reto^{[1][13]}. Por lo tanto, es deseable desarrollar un procedimiento de producción que limite o evite el contacto de estos nucleósidos con el agua.

20 Véanse, por ejemplo, las siguientes referencias:

(1) J. A. Beisler, *J. Med. Chem.*, **1978**, 21, 204.

(2) US 3350388 (1967) y DE 1922702 (1969), Šorm y Pískala (Ceskosl Ovenska Akademievéd); A. Pískala y F. Šorm, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, 29, 2060.

(3) M. W. Winkley y R. K. Robins, *J. Org. Chem.*, **1970**, 35, 491.

25 (4) A. Pískala y F. Šorm, *Nucl. Acid Chem.*, **1978**, 1, 435.

(5) DE 2012888 (1971), Vorbrüggen y Niedballa (Schering AG).

(6) U. Niedballa y H. Vorbrüggen, *J. Org. Chem.*, **1974**, 39, 3672-3674.

(7) US 7038038 (2006), Ionescu y Blumbergs (Pharmion Corporation).

(8) H. Vorbrüggen, K. Krolkiewicz y B. Bennua, *Chem. Ber.*, **1981**, 114, 1234-1255.

30 (9) US 4082911 (1978), Vorbrüggen (Schering Aktiengesellschaft).

(10) US 6887855 (2005), Ionescu y Blumbergs y Silvey (Pharmion Corporation, Ash Stevens, Inc.).

(11) US 6943249 (2005), Ionescu y Blumbergs y Silvey (Ash Stevens, Inc., Pharmion Corporation).

(12) J. Ben-Hatter y J. Jiricny, *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 3211-3213.

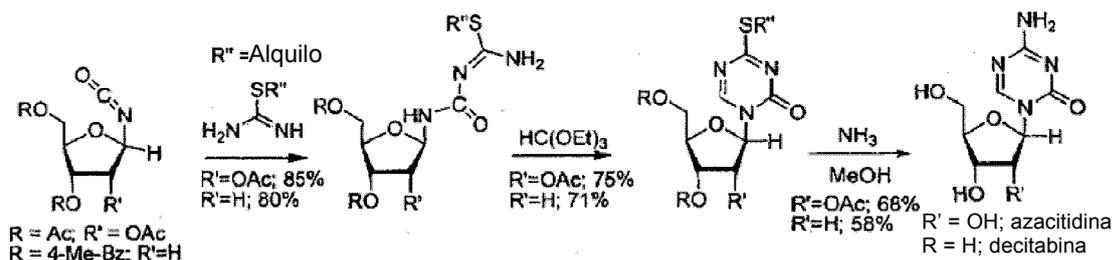
(13) L. D. Kissinger y N. L. Stemm, *J. Chromatography*, **1986**, 353, 309-318.

35 (14) U. Niedballa y H. Vorbrüggen, *J. Org. Chem.*, **1974**, 39, 3654-3660.

Pískala y Šorm^[2] enseñan un método largo para la síntesis de azacitidina y decitabina, que implica el uso de productos intermedios reactivos de N-glucosilisocianato que poseen una configuración 1-β. El procedimiento sintético (esquema 1) comprende la reacción de un peracilglucosilisocianato con una S-alquilisotiourea, para obtener una peracilglucosilisotiourea, condensando esta última con un ortoéster de un ácido alifático a alta temperatura (135°C), para obtener glucosil-4-alkilmercapto-2-oxo-1,2-dihidro-1,3,5-triazinas protegidas en los grupos hidroxilo, seguido de desprotección con amoníaco (NH₃) en metanol (MeOH) en un recipiente hermético durante un periodo de 12-24 horas. Aunque está basado en el isocianato, el rendimiento global de azacitidina es 43% y el rendimiento global de decitabina es 33%, podría ser difícil almacenar el isocianato y su uso podría producir un riesgo para la salud. La vía también tiene otra dificultad para aumentar a escala las etapas, que incluye el uso del disolvente benceno que es un cancerígeno de clase 1 según la ICH, y la necesidad de un recipiente a presión en la etapa de desprotección.

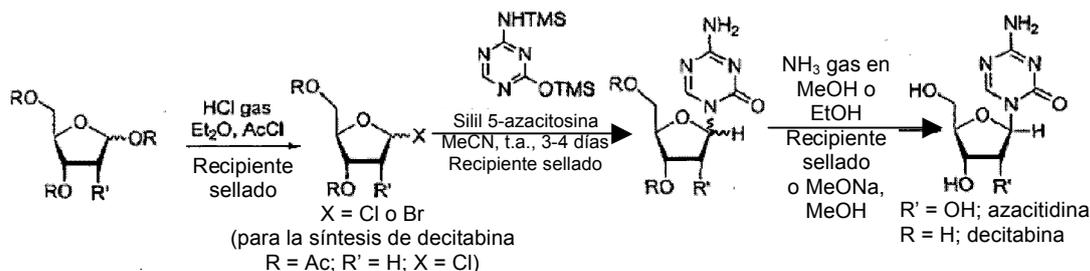
40

45



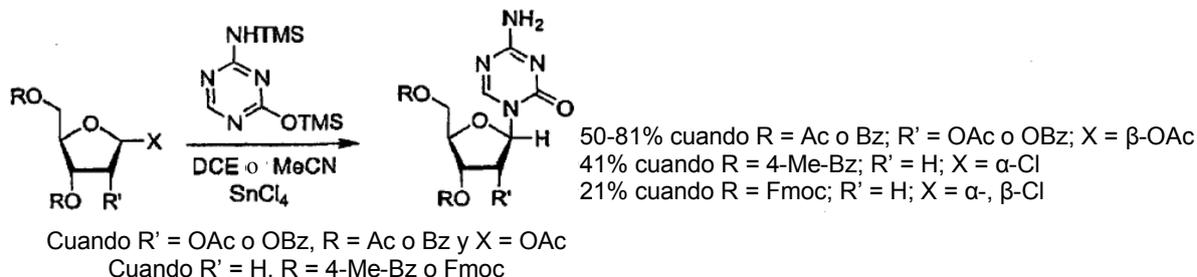
Esquema 1 – Método de isocianato para la síntesis de 5-azacitidinas

Otro procedimiento potencial para la azacitidina y la decitabina fue descrito por Winkley y Robins^[3] (esquema 2). Su método utiliza el acoplamiento sin catálisis de 1-haloazúcares con 2-[(trimetilsilil)amino]-4-[(trimetilsilil)oxi]-s-triazina (silit 5-azacitosina), que evoluciona probablemente por medio de un mecanismo S_N2 . Pískala y Šorm^[4] describieron también un procedimiento similar que utiliza un 1-cloroazúcar para la síntesis de azacitidina (esquema 2), que necesita cloruro de hidrógeno gaseoso en la síntesis del 1-cloroazúcar, tiene rendimientos globales muy bajos (azacitidina con 11% y decitabina con 7% de rendimiento global^[3]), tiempos de reacción prolongados (3-7 días), la necesidad de recipientes a presión en la etapa de desprotección, la inestabilidad de los haloazúcares, una cromatografía en columna complicada y procedimientos largos de elaboración y aislamiento.



Esquema 2 – Uso de 1-haloazúcares en la síntesis de azacitidina y decitabina

Niedballa y Vorbrüggen^[5,6] enseñan la síntesis de nucleósidos protegidos (bloqueados) que incluyen azacitidina y decitabina, que utiliza una gran cantidad de cloruro de estaño en dicloroetano (DCE) o acetonitrilo (MeCN) para facilitar el acoplamiento de 5-azacitosina y restos de azúcar protegidos (esquema 3). Conforme a Ionescu y Blumbergs^[7], existen varios inconvenientes principales para este procedimiento: en primer lugar, la retirada de estaño del API es difícil. En segundo lugar, las emulsiones que se forman durante la elaboración de la mezcla de acoplamiento. En tercer lugar, deber llevarse a cabo una etapa difícil de filtración para aislar las sales insolubles de estaño. Por estas razones, debe concluirse que este procedimiento no es adecuado para la fabricación comercial de azacitidina^[7].

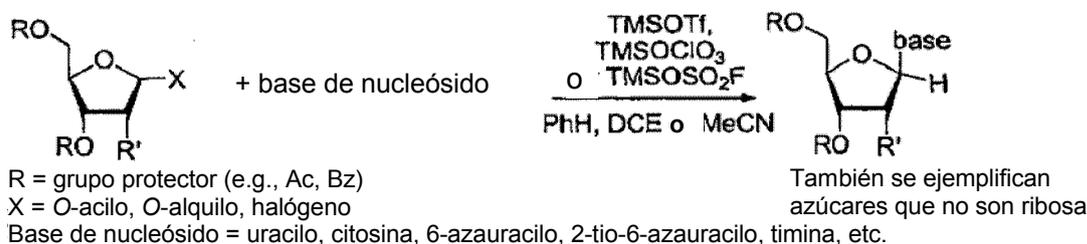


Esquema 3 – Síntesis de azacitidina y decitabina protegidas usando el método de acoplamiento de Vorbrüggen

Vorbrüggen^[9] enseña un método general para el acoplamiento de bases silitadas y bases de nucleósidos (que incluyen citosina, piridinas, triazoles, y pirimidinas, pero no 5-azacitosina) con 1-O-acil, 1-O-alquil o 1-haloazúcares

protegidos (concretamente, derivados de ribosa, desoxirribosa, arabinosa y glucosa) en benceno, DCE o MeCN, para preparar nucleósidos protegidos (esquema 4). El acoplamiento es favorecido por ésteres de trimetilsililo (TMS) de ácidos minerales o ácidos sulfónicos fuertes esterificables, que incluyen triflato de trimetilsililo (TMSOTf), TMSOCIO₃ y TMSOSO₂F. El requisito de una elaboración acuosa hace que este método sea menos que deseable para la síntesis de azacitidina y decitabina.

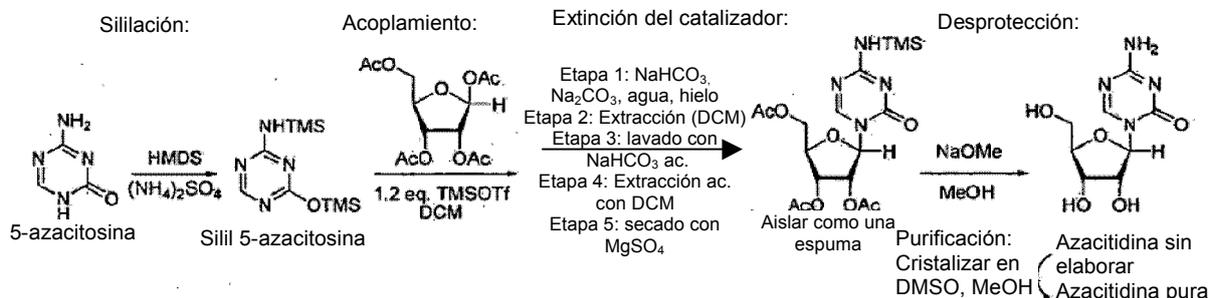
5



Esquema 4 – Protocolo de acoplamiento de Vorbrüggen que utiliza ésteres de trimetilsililo de ácidos fuertes

Ionescu y Blumbers^[7] enseñan un procedimiento de fabricación (esquema 5), específicamente para la síntesis de azacitidina, que se basa en la metodología general de acoplamiento activado por ésteres de trimetilsililo inventada por Vorbrüggen^[9]. La siliación de 5-azacitosina se lleva a cabo usando un exceso de hexametildisilazano (HMDS) y una cantidad catalítica de sulfato de amonio. La reacción de acoplamiento del 1-O-acil-carbohidrato y la base de nucleósido siliada se lleva a cabo en un “disolvente con baja solubilidad en agua”, tal como diclorometano (DCM), en presencia de una cantidad superior a la estequiométrica del catalizador ácido de Lewis no metálico TMSOTf. Se emplea una elaboración acuosa, y son necesarias varias etapas costosas para retirar el agua perjudicial y cambiar los disolventes a condiciones adecuadas para la etapa de desprotección.

10



Esquema 5 – Un método de fabricación de azacitidina

15

Por lo tanto, existe una necesidad de un procedimiento más eficiente para la fabricación de un compuesto nucleósido de 5-azacitosina a gran escala.

El documento de patente US 2006/247432 A1 proporciona un método para la preparación de 5-azacitidina. El método implica la siliación de 5-azacitosina, seguido de acoplamiento de la 5-azacitosina siliada a un derivado de β-D-ribofuranosa protegida. La reacción de acoplamiento está catalizada por trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (TMS-triflato).

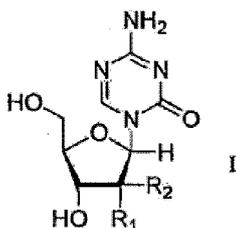
20

Spencer Knapp y Wen-Chung Shieh describen, en *Tetrahedron Letters*, Vol. 32, n° 30, págs. 3627-3630 (1991), una síntesis de nucleósidos a partir de tioglucósidos. Se describe el acoplamiento de nucleobases siliadas con un derivado de ribosa protegida que lleva un grupo tiofenilo como grupo saliente.

25

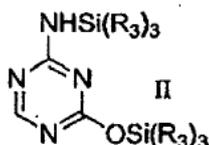
Compendio de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente solicitud, un procedimiento para la preparación de un compuesto nucleósido de 5-azacitosina de fórmula I:



en la que R_1 es hidrógeno, hidroxilo o halógeno; R_2 es hidrógeno o halógeno, comprende:

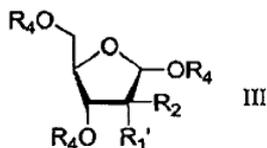
- a) hacer reaccionar 5-azacitosina con un agente de sililación, para producir una mezcla de reacción que contiene 5-azacitosina sililada de fórmula II:



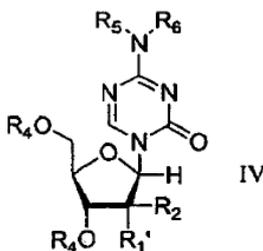
5

en la que cada R_3 es independientemente un grupo alquílico C_1-C_{20} o grupo arílico opcionalmente sustituido.

- b) acoplar la 5-azacitosina sililada de fórmula II con una D-ribofuranosa protegida de fórmula III:



- 10 en la que R_1' es hidrógeno, halógeno o OR_4 ; R_4 representa un grupo protector de hidroxilo; en un primer disolvente orgánico y en presencia de un catalizador de ácido sulfónico para obtener una mezcla de reacción líquida que comprende un nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula IV:



- 15 en la que cada uno de R_5 y R_6 es independientemente hidrógeno o $Si(R_3)_3$, y R_3 , R_1' y R_2 son como se ha definido anteriormente; y

- c) convertir el nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula (IV) en el nucleósido de 5-azacitosina de fórmula (I).

Preferiblemente, el procedimiento descrito anteriormente no tiene una etapa de elaboración acuosa para extinguir o retirar el catalizador.

- 20 De acuerdo con otro aspecto de la presente solicitud, en el procedimiento descrito anteriormente, el catalizador no está limitado a un ácido sulfónico y puede ser cualquier catalizador adecuado, pero el procedimiento no tiene una etapa de elaboración acuosa para extinguir o retirar el catalizador.

- 25 De acuerdo con aún otro aspecto de la presente invención, un procedimiento para preparar un compuesto nucleósido de 5-azacitosina de fórmula (I), como se ha descrito anteriormente, comprende: i) formar una disolución homogénea que comprende al menos un disolvente aprótico polar y un nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula (IV) como se ha descrito anteriormente, en un disolvente aprótico polar; y ii) convertir el nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula (IV) en el nucleósido de 5-azacitosina de fórmula (I) en la disolución homogénea. Preferiblemente, antes de la etapa ii), este procedimiento no tiene la etapa que se lleva a cabo en presencia de una cantidad sustancial de agua, por ejemplo, menos de 100% en peso del compuesto de fórmula (IV), más

preferiblemente, menos de 10% en peso de compuesto de fórmula (IV), lo más preferiblemente, menos de 1% en peso del compuesto de fórmula (IV).

5 Como una realización, la etapa i) de formación discutida anteriormente se lleva a cabo preferiblemente añadiendo un disolvente aprótico polar a una disolución existente previamente que comprende un nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula (IV) y un disolvente orgánico usado durante la reacción de preparación del nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula (IV).

El grupo alquílico C_1 - C_{20} usado en la presente invención puede ser un grupo alquílico de cadena lineal, un grupo alquílico ramificado, o un grupo alquílico cíclico, preferiblemente metilo.

10 El agente de sililación usado en la presente invención puede ser cualquier agente adecuado, tal como hexametildisilazano (HMDS), cloruro de trimetilsililo (TMSCI), *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) y triflato de trimetilsililo (TMSOTf). El HMDS es la realización más preferida del agente de sililación de la presente invención.

15 El grupo protector de hidroxilo R_4 puede ser cualquier grupo adecuado que pueda proteger el grupo de hidroxilo sobre una D-ribofuranoosa de una reacción indeseada. Por ejemplo, el grupo protector de hidroxilo R_4 puede ser un grupo alquilacílico C_1 - C_{20} o grupo arilacílico sustituido opcionalmente, en particular un grupo benzoilo o acetilo.

20 Antes de la etapa b), el procedimiento de la presente solicitud comprende preferiblemente una etapa de aislamiento del compuesto de 5-azacitosina sililado en forma sólida, a partir de la mezcla de reacción de la etapa a). Por ejemplo, la etapa de aislamiento puede lograrse mediante la cristalización de 5-azacitosina sililada (más preferiblemente añadiendo una cantidad eficaz de cristales de siembra de 5-azacitosina sililada para favorecer la cristalización), y filtrar la 5-azacitosina sililada cristalizada. Alternativamente, la etapa de aislamiento puede lograrse por evaporación de disolventes de la mezcla de reacción de la etapa a). Es más preferido utilizar la cristalización para aislar el compuesto sililado.

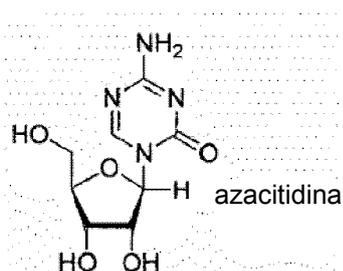
25 Preferiblemente, la etapa de acoplamiento b) se lleva a cabo en ausencia de una cantidad sustancial, o más preferiblemente, en presencia de una cantidad inferior a 1% molar del agente de sililación con relación a la cantidad molar del compuesto de 5-azacitosina sililado.

30 De acuerdo con una realización de la presente invención, el procedimiento comprende una etapa de dilución de la mezcla de reacción líquida que comprende el nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula (IV) obtenido en la etapa b) con un segundo disolvente orgánico. Preferiblemente, al menos una parte del primer disolvente orgánico se reemplaza por un segundo disolvente orgánico, de modo que el nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula (IV) permanece disuelto en el segundo disolvente orgánico. Más preferiblemente, al menos 60% en volumen del primer disolvente orgánico usado en la etapa b) se retira posteriormente antes de la etapa c). Preferiblemente, el segundo disolvente orgánico es un disolvente con un punto de ebullición mayor que el primer disolvente orgánico.

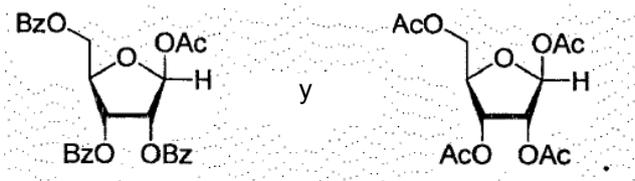
35 El primer disolvente orgánico es un disolvente polar soluble en agua, en particular acetonitrilo. Preferiblemente, el primer disolvente orgánico debe ser no reactivo y estable en presencia del catalizador usado en la etapa b), y estable durante la etapa c). Ya que el primer disolvente orgánico, como se ha indicado anteriormente, puede retirarse en su mayor parte por evaporación después de la etapa b) y antes de la etapa c), su punto de ebullición no debe ser demasiado alto. Por otro lado, ya que la reacción de la etapa b) puede llevarse a cabo a una temperatura moderadamente alta, el primer disolvente orgánico debe tener un punto de ebullición adecuadamente alto para permitir que la mezcla de reacción se caliente a la temperatura de reacción que se necesita, sin evaporar el primer disolvente orgánico.

40 El segundo disolvente orgánico es preferiblemente un disolvente aprótico polar, más preferiblemente, dimetilsulfóxido. El segundo disolvente orgánico tiene un punto de ebullición mayor que el primer disolvente orgánico. También debe ser estable durante la etapa c). Preferiblemente, el segundo disolvente orgánico tiene un punto de ebullición que es lo suficientemente alto para que no se retire antes del primer disolvente orgánico cuando una mezcla del primer y segundo disolventes orgánicos se somete a evaporación ("intercambio de disolvente/intercambio de disolvente parcial"). El segundo disolvente orgánico también es lo suficientemente polar para que pueda mantener el nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula (IV) disuelto antes y durante la etapa c), es decir, su alta polaridad mantiene preferiblemente la reacción de la etapa c) homogénea, que fue una de las innovaciones que se descubrieron. Es relativamente difícil reproducir el procedimiento de preparar el nucleósido de 5-azacitosina, cuando la etapa c) no se lleva a cabo en una disolución completamente homogénea. Además, comparado con una reacción en una suspensión heterogénea, mantener la etapa c) homogénea hizo la reacción mucho más rápida. Además, la pureza del producto final después de la precipitación como sólido en la etapa c) fue superior cuando la etapa c) se llevó a cabo en un medio homogéneo, debido al uso del disolvente polar de alto punto de ebullición.

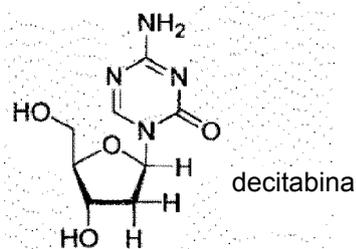
55 Preferiblemente, el compuesto nucleósido de 5-azacitosina de fórmula I es azacitidina



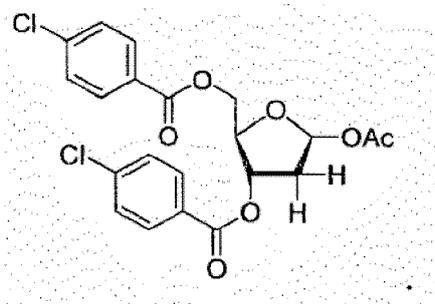
, y la D-ribofuranosa protegida de fórmula III se selecciona del grupo que consiste en



Alternativa y preferiblemente, el compuesto nucleósido de 5-azacitosina de fórmula I es decitabina



5 muestra a continuación



La cantidad de catalizador en la etapa b), en particular ácido sulfónico, es inferior a un equivalente molar, en particular 10-30 por ciento en moles, con respecto a la cantidad molar de la D-ribofuranosa protegida de fórmula III.

El catalizador de ácido sulfónico es preferiblemente ácido trifluorometanosulfónico.

10 El agente de sililación es preferiblemente hexametildisilazano.

Preferiblemente, la etapa c) de la presente solicitud comprende desproteger el nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula (IV) en presencia de un agente desbloqueante básico. El agente desbloqueante básico es preferiblemente un alcóxido metálico, en particular metóxido sódico en metanol. La etapa c) se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura entre 20°C y 30°C.

15 Preferiblemente, la etapa de acoplamiento c) se lleva a cabo en ausencia de un disolvente inmiscible con agua tal como diclorometano (DCM).

Preferiblemente, las etapas b) y c) se llevan a cabo en un recipiente de una reacción.

20 Como realización preferida, la etapa c) se lleva a cabo en MeOH. Más preferiblemente, la etapa c) se lleva a cabo en una mezcla de MeCN, DMSO y MeOH, en particular aproximadamente 0-2 volúmenes de MeCN, 3 volúmenes de DMSO y 2-3 volúmenes de MeOH.

La etapa de acoplamiento b) se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura entre 40°C y 80°C, más preferiblemente, entre 50°C y 60°C, cuando la β-D-ribofuranosa protegida (III) es 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosa.

Preferiblemente, el procedimiento de la presente invención no tiene una etapa de aislamiento del nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula (IV) de una mezcla líquida.

Después de la etapa c), el nucleósido de 5-azacitosina de fórmula (I) puede aislarse de la mezcla de reacción por precipitación con un disolvente orgánico, seguido de filtración. El nucleósido de 5-azacitosina de fórmula (I) puede purificarse también por cristalización, para suministrar material de calidad API.

Comparado con la técnica anterior, el procedimiento de acuerdo con la presente invención 1) no necesita una elaboración acuosa; 2) no necesita la adición de una gran cantidad de catalizador; 3) las etapas b) y c) pueden llevarse a cabo de manera más eficiente básicamente en un recipiente reactor (recipiente único "one pot"); 4) ahorra tiempo; y/o 5) es posible una síntesis a escala de fabricación.

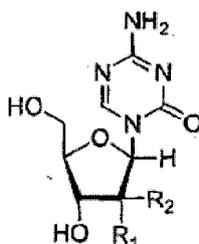
Las diversas características de novedad que caracterizan la invención se indican particularmente en las reivindicaciones que se anexan y que forman una parte de la descripción. Para una mejor comprensión de la invención, sus ventajas de funcionamiento, y objetivos específicos alcanzados con su uso, debe hacerse referencia a los dibujos y a la materia descriptiva en los que hay ilustradas y descritas realizaciones preferidas de la invención.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas actualmente

Lo siguiente describe realizaciones preferidas de la presente invención y no debe usarse para limitar el alcance de la presente invención.

La presente invención muestra un procedimiento de fabricación de nucleósidos de azacitosina, que es extremadamente eficiente y produce altos rendimientos y pureza. Un aspecto clave de la presente invención se refiere a la capacidad inesperada para usar ácidos sulfónicos en cantidades preferiblemente subestequiométricas (con relación a la silit 5-azacitosina y el azúcar protegido), como catalizadores en el acoplamiento de silit 5-azacitosinas y azúcares de 1-O-acil-ribofuranosa o 1-O-acil-2-desoxi-ribofuranosa protegida. Esto no había sido descrito anteriormente para la fabricación de nucleósidos derivados de 5-azacitosina, y el uso de menos de una cantidad de un equivalente de un ácido sulfónico conduce finalmente a una serie de grandes mejoras de procedimiento sobre las de los procedimientos de la técnica anterior, tales como ser capaz de omitir una etapa de elaboración acuosa y un uso más eficiente de recipientes de reacción. El nuevo procedimiento es aplicable industrialmente y se ha ampliado a escala en equipos de producción, que obtienen un rendimiento significativamente superior de azacitidina al descrito en la técnica anterior^[2,3,7].

Conforme a una realización de la presente invención, se muestra un procedimiento para la preparación de nucleósidos de 5-azacitosina y sus derivados, de fórmula:



, en la que R₁ es hidrógeno, hidroxilo o flúor; R₂ es hidrógeno o flúor; R₂ es hidrógeno o flúor. La silit 5-azacitosina se acopla con azúcares de D-ribosa protegidos (bloqueados), con catálisis de ácidos sulfónicos preferiblemente en cantidades inferiores a un equivalente. Tras la compleción del acoplamiento, la mezcla de reacción se usa en la siguiente etapa sintética sin la adición de agua o cualquier disolución básica acuosa, que es perjudicial para el resto de 5-azacitosina. Se añade un disolvente de un punto de ebullición mayor para que los nucleósidos de 5-azacitosina protegidos permanezcan en una disolución homogénea, y puede añadirse un agente desbloqueante tal como metóxido sódico en metanol para formar el producto desprotegido y retirar el catalizador ácido fuerte. Después de la precipitación, el producto puede recogerse entonces por filtración con rendimiento y pureza altos. De esta manera, puede obtenerse un procedimiento comercial muy eficiente para la preparación a gran escala de nucleósidos de 5-azacitosina.

En una realización de la presente invención, los inventores desarrollaron específicamente un procedimiento en el que 5-azacitosina silitada se hace reaccionar con β-D-ribofuranosa, 2-desoxi-β-D-ribofuranosa, 2-desoxi-2-fluoro-β-D-ribofuranosa o 2-desoxi-2,2-difluoro-β-D-ribofuranosa protegida en los grupos hidroxilo, en presencia de una cantidad subestequiométrica de ácido trifluorometanosulfónico (TfOH). El procedimiento no necesita estar limitado al uso de cantidades subestequiométricas de TfOH, sin embargo, de gran impacto, el uso de una cantidad subestequiométrica de TfOH permite la omisión completa de la elaboración acuosa habitual que se usa en otros métodos^[6,7,8,9,12]. El catalizador se extingue de manera conveniente en la propia etapa de desprotección y se retira del producto precipitado en las aguas de filtrado. Esto permite que la reacción de acoplamiento, la extinción del catalizador y la reacción de desprotección se lleven a cabo en un reactor, para evitar completamente la exposición de los productos sensibles al agua. De este modo, es evidente que el uso de una cantidad subestequiométrica del catalizador de acoplamiento tiene un gran impacto en todo el procedimiento. La omisión completa de una

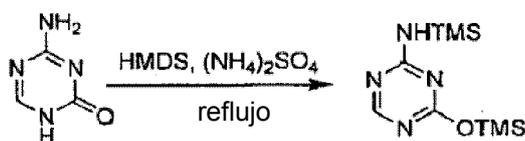
elaboración acuosa es una mejora significativa sobre la de otros métodos, particularmente en una escala de fabricación en la que la duración de la elaboración es mucho más larga que a escala de laboratorio. Las pérdidas de rendimiento que pueden producirse debido a la hidrólisis del anillo de 5-azacitosina glucosilado sensible al agua durante la elaboración acuosa se evitan, permitiendo mejores calidad y rendimiento globales.

- 5 Los inventores descubrieron que la adición de un disolvente polar tal como DMSO después de la reacción de acoplamiento, hace que la reacción de desprotección (desbloqueo), que se lleva a cabo preferiblemente en una disolución de NaOMe en MeOH, evolucione rápidamente como disolución homogénea. Esta disolución homogénea es una mezcla de MeCN, DMSO y MeOH. Cuando la etapa de desprotección es completa, la adición de una cantidad mayor de MeOH provoca que el producto de nucleósido API sin elaborar precipite, y que pueda recogerse directamente. Se obtuvo azacitidina de calidad API ($\geq 99,0\%$ de pureza de HPLC, no impurezas $\geq 0,1\%$) con 85~90% de rendimiento de recuperación después de una sola etapa de purificación. El uso de MeCN como disolvente de reacción en la etapa de acoplamiento y la ausencia de una elaboración acuosa, eliminaron la necesidad de un intercambio de disolvente costoso por un disolvente inmiscible en agua, tal como se proporciona en otras referencias^[7,14].
- 10
- 15 El procedimiento de acuerdo con las realizaciones de la presente invención incluye varias mejoras clave sobre otros métodos. El uso de un ácido sulfónico fuerte como catalizador en vez de cloruro de estaño, o trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (conocido también como TMS-triflato, TMSOTf) permite un acoplamiento eficaz de silil 5-azacitosinas con azúcares protegidos. Pueden emplearse varios ácidos alquil- o aril-sulfónicos, pero lo más preferiblemente, se sugiere ácido trifluorometanosulfónico. El catalizador puede emplearse de menos de un equivalente molar a un equivalente, en un intervalo de 10% a 100%, lo más preferiblemente, 20% con respecto a la cantidad molar de la D-ribofuranoza protegida. La silil 5-azacitosina puede contener cualquier grupo sililo adecuado, pero el más preferido es el trimetilsililo. El azúcar bloqueado puede contener cualquier grupo bloqueante de hidroxilo adecuado, tal como grupos alquil- o aril-acilo. El disolvente es cualquier disolvente orgánico adecuado, preferiblemente un disolvente orgánico miscible en agua, y lo más preferiblemente acetonitrilo.
- 20
- 25 Después de la compleción de la reacción de acoplamiento, se emplean preferiblemente condiciones no acuosas, y en su lugar se añade un disolvente polar de mayor punto de ebullición, de tal modo que el contenido del reactor permanezca solubilizado y el disolvente sea estable en las condiciones de desbloqueo. Los disolventes adecuados pueden ser sulfóxidos, amidas, glicoles y similares. Lo más preferiblemente, el disolvente es DMSO. Finalmente, el procedimiento se completa mediante la adición de un agente desbloqueante, seguido de precipitación del producto, que puede ser recogido por filtración. Si los grupos bloqueantes son de acilo, los alcóxidos son los agentes desbloqueantes preferidos, y se añaden generalmente en una disolución alcohólica. Se usa típicamente metóxido sódico en metanol. Después de la compleción de esta etapa, el producto es precipitado por adición de un antidisolvente, tal como metanol, y puede ser recogido por filtración con gran rendimiento y pureza. Aunque pueden sintetizarse varios nucleósidos útiles mediante este procedimiento, es el más adecuado para la síntesis de azacitidina.
- 30
- 35

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente con el fin de una ilustración más detallada, y no se pretende que sean limitaciones a la invención descrita.

EJEMPLO 1

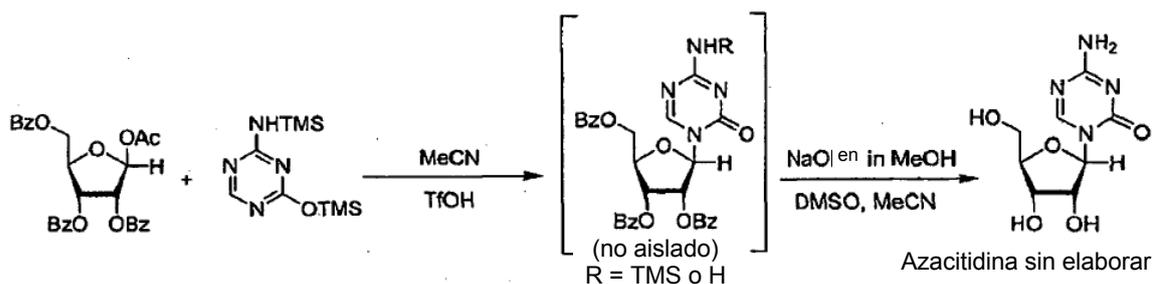
Preparación de 2-[(trimetilsilil)amino]-4-[(trimetilsilil)oxi]-s-triazina (silil 5-azacitosina)



- Se calentó una mezcla de 5-azacitosina (7,33 kg), HMDS (33,9 kg) y sulfato de amonio (0,44 kg) a reflujo (aproximadamente 115-135°C), y se agitó durante 16 horas. Después de completarse la reacción, la suspensión se enfrió a 118°C y luego se filtró a través de un lecho de Celite, y se enjuagó con HMDS (5,6 kg). La disolución de 5-azacitosina sililada se enfrió a 35°C, y la disolución se enfrió a 18°C, se agitó a 18°C, durante no menos de 6,5 horas, y luego se filtró. El sólido se lavó dos veces con HMDS (5,6 kg cada una) y se secó a vacío a $\leq 70^\circ\text{C}$ durante 9,5 horas, para obtener 14,19 kg de silil 5-azacitosina blanca (87%).
- 45

EJEMPLO 2

Acoplamiento de silil 5-azacitosina a un azúcar, y desprotección



Se calentó una mezcla de 2-[(trimetilsilil)amino]-4-[(trimetilsilil)oxi]-s-triazina (4,5 kg), 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosa (8,8 kg), MeCN anhidro (34,6 kg) y TfOH (600 g) a 55°C durante 12,5 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 45°C, se añadió DMSO (29 kg), y el MeCN se evaporó a una temperatura interna < 50°C a vacío hasta aproximadamente 54 l de la disolución. La disolución se enfrió a 23°C. Se añadió MeOH (13,9 kg) seguido de una disolución de NaOMe al 30% en disolución de MeOH (2,5 kg), que se prediluyó con MeOH (7,0 kg). La disolución se agitó a 23°C durante 35 minutos. Cuando se completó la reacción, se añadió MeOH (90,4 kg), y la suspensión resultante se agitó a 22°C durante 3 horas y 10 minutos, y luego se filtró, y se lavó tres veces con MeOH (7,0 kg cada una). La torta de filtración se secó a vacío por debajo de 70°C durante 9 horas y 20 minutos, para proporcionar 3,2 kg de 98,89% de pureza de azacitidina sin elaborar (71% de rendimiento basado en 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosa).

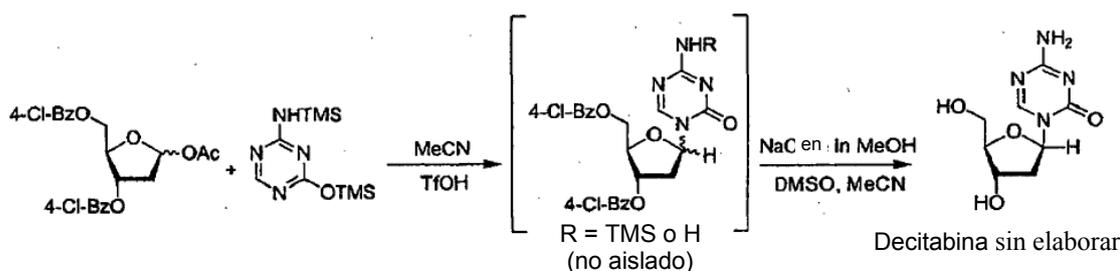
EJEMPLO 3

Purificación de azacitidina sin elaborar

Se disolvió azacitidina sin elaborar (3,2 kg) en DMSO (11,8 kg) a 20-40°C, se filtró y los sólidos recogidos se enjuagaron con DMSO (10,1 kg). Las aguas de filtrado se enfriaron a 20-25°C y se añadió MeOH (9,7 kg) durante un periodo de 30 minutos, y luego se añadieron cristales de siembra de azacitidina (30,6 g), y la mezcla se agitó durante aproximadamente 1 hora a 23°C. Se añadió más MeOH durante un periodo de 4 horas y 13 minutos, y la mezcla se agitó a 20-25°C durante al menos 10 horas, se filtró y se lavó tres veces con MeOH (10 kg cada una). La torta de filtración se secó a vacío a menos de ≤ 70°C durante 33 horas, para proporcionar 2,6 kg de azacitidina de calidad API (86% de rendimiento basado en azacitidina sin elaborar).

EJEMPLO 4

Procedimiento en recipiente único "one pot" para la preparación de decitabina sin elaborar

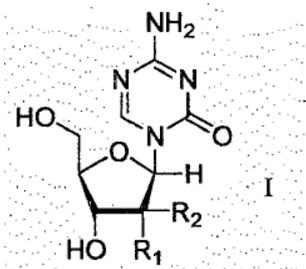


Se agitó una mezcla de MeCN (45 ml), 1-O-acetil-3,5-di-O-(4-clorobenzoil)-2-desoxi-D-ribofuranosa (3,0 g), 2-[(trimetilsilil)amino]-4-[(trimetilsilil)oxi]-s-triazina (1,78 g) y TfOH (0,5 g) a aproximadamente 0°C durante 24 horas. Se añadió DMSO (6 ml) y la mezcla se evaporó a 30-50°C a presión reducida para retirar el MeCN. Se añadió una disolución al 29% de MeONa en MeOH (1,8 g, 9,9 mmoles, 1,5 equivalentes) con agitación a aproximadamente 20-25°C. Después de completarse la reacción, se añadió MeOH para llevar a cabo la precipitación, y el sólido se filtró, se lavó y se secó para proporcionar decitabina sin elaborar. Se preparó decitabina de calidad API (> 99,0 de pureza de HPLC) por recristalización en MeOH de decitabina sin elaborar, seguido de tres lavados con MeOH y secado a 40°C a vacío.

Aunque la invención se ha descrito e ilustrado con referencia a ciertas realizaciones particulares de la misma, los expertos en la técnica apreciarán que pueden hacerse diversas adaptaciones, cambios, modificaciones, sustituciones, eliminaciones, o adiciones de procedimientos y protocolos sin apartarse del alcance de la invención. Por ejemplo, pueden ser aplicables condiciones de reacción diferentes a las condiciones particulares descritas anteriormente en la presente invención, como consecuencia de variaciones en los reactivos o metodología, para preparar los compuestos a partir de los procedimientos de la invención indicados anteriormente. Se pretende, por lo tanto, que la invención se defina mediante el alcance de las reivindicaciones que siguen, y que tales reivindicaciones se interpreten tan ampliamente como sea razonable.

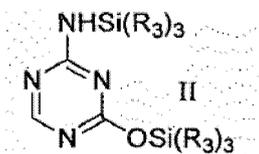
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de un compuesto nucleósido de 5-azacitosina de fórmula I:



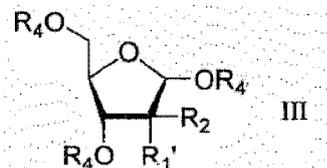
5 en la que R_1 es hidrógeno, hidroxilo o halógeno; R_2 es hidrógeno o halógeno, que comprende:

a. hacer reaccionar 5-azacitosina con un agente de sililación, para producir una mezcla de reacción que contiene 5-azacitosina sililada de fórmula II:

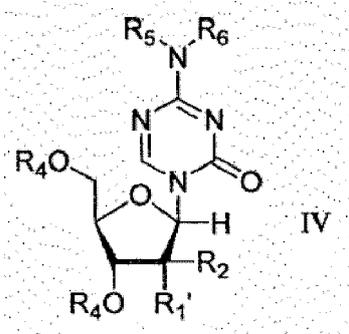


10 en la que cada R_3 es independientemente un grupo alquílico C_1 - C_{20} o grupo arílico opcionalmente sustituido;

b. acoplar la 5-azacitosina sililada de fórmula II con una D-ribofuranosa protegida de fórmula III:



15 en la que R_1' es hidrógeno, halógeno o OR_4 ; R_4 representa un grupo protector de hidroxilo; en un primer disolvente orgánico y en presencia de un catalizador de ácido sulfónico, en el que la cantidad de ácido sulfónico es inferior a un equivalente molar con respecto a la D-ribofuranosa protegida de fórmula III, en particular el ácido sulfónico es 10-30 por ciento molar de la cantidad molar de la D-ribofuranosa protegida de fórmula III, para obtener una disolución de nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula IV:



20 en la que cada uno de R_5 y R_6 es independientemente hidrógeno o $Si(R_3)_3$, R_3 es un grupo alquílico C_1 - C_{20} o grupo arílico opcionalmente sustituido, y R_1' y R_2 son como se ha definido anteriormente; y

c. convertir el nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula (IV) en el nucleósido de 5-azacitosina de fórmula (I).

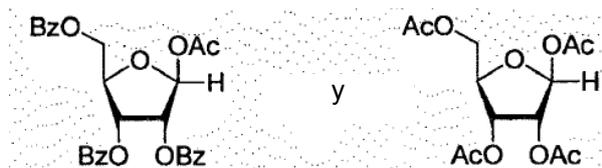
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que antes de la etapa b), el compuesto de 5-azacitosina sililado se aísla en forma sólida de la mezcla de reacción de la etapa a).

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de acoplamiento b) se lleva a cabo en presencia de menos de 1% en cantidad molar del agente de sililación con relación a la cantidad molar del compuesto de 5-azacitosina sililado.

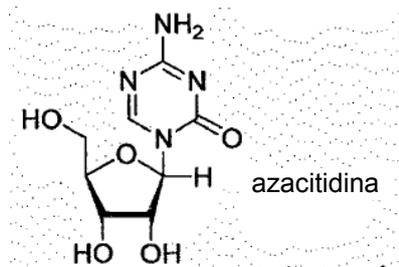
5 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende una etapa de dilución de la disolución del nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula (IV) obtenido en la etapa b) con un segundo disolvente orgánico, y en el que el segundo disolvente orgánico es un disolvente con un punto de ebullición superior al del primer disolvente orgánico.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el segundo disolvente orgánico es un disolvente aprótico polar, preferiblemente dimetilsulfóxido.

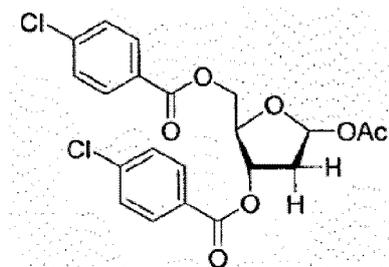
10 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha D-ribofuranosa protegida de fórmula III se selecciona del grupo que consiste en;



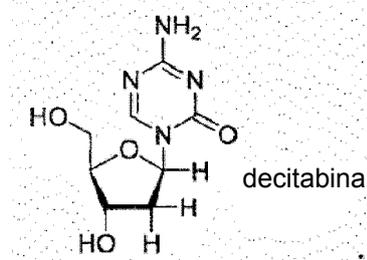
azacitidina, y el compuesto nucleósido de 5-azacitosina de fórmula I es



15 7. El procedimiento de reivindicación 1, en el que dicha fórmula III de D-ribofuranosa protegida es una 2-desoxi-D-ribofuranosa como se muestra a continuación



, y el compuesto nucleósido de 5-azacitosina de fórmula I es decitabina



8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido sulfónico es ácido trifluorometanosulfónico.

20 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de acoplamiento b) se lleva a cabo en ausencia de un disolvente inmiscible en agua.

10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento no tiene una etapa de elaboración acuosa para extinguir o retirar el catalizador de ácido sulfónico.

11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de conversión c) se lleva a cabo en una disolución homogénea que comprende al menos un disolvente aprótico polar y el nucleósido de 5-azacitosina protegido de fórmula (IV) obtenido en la etapa de conversión b).

5 12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer disolvente orgánico es un disolvente polar soluble en agua, preferiblemente acetonitrilo.