



ABR. 1963

RAN 4060/19

287587

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA FABRICACION SINTETICA DE
2'-DEOXI-5-FLUORO-CITIDINA PURA O DE SU ANOMERO ALFA PURO",
a favor de la firma suiza F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE, S.A.,
domiciliada en BASILEA (Suiza).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un nuevo y mejorado
método sintético para producir 1-(2'-deoxi-beta-D-ribofura-
nocil)-5-fluoro-citosina o, como se la designa con frecuen-
cia, 2'-deoxi-5-fluoro-citidina y su anómero alfa, o sea
la 1-(2'-deoxi-alfa-D-ribofuranocil)-5-fluoro-citosina. Estas
5. dos sustancias pueden obtenerse por separado mediante el
procedimiento de este invento.

Una característica particular de este invento
es que el nuevo método proporciona 2'-deoxi-5-fluoro-citi-
10. dina prácticamente libre de su anómero alfa, y viceversa.

30 A



287587

- 2 -

La 2'-deoxi-5-fluoro-citidina es un compuesto conocido, de utilidad reconocida como agente antitumoral. Además, se ha revelado en el ramo que la 2'-deoxi-5-fluoro-citidina es útil como agente antibacteriano y antifungoso.

5. Los procedimientos para la producción de la 2'-deoxi-5-fluoro-citidina se han descrito antes en el ramo.

El procedimiento de este invento comprende el hacer reaccionar 5-fluoro-citosina con un agente acilante, el hacer reaccionar la 4-N-mono-acil-5-fluoro-citosina producida con una sal de mercurio, para formar la sal monomercúrica de dicha 4-N-mono-acil-5-fluoro-citosina, el hacer reaccionar dicha sal monomercúrica con un haluro de 3,5-diacetil-2-deoxi-D-ribofuranosilo, para producir una mezcla que contiene el anómero alfa y el anómero beta de

10.

la 4-N-mono-acil-1-(3',5'-di-O-acetil-2'-deoxi-D-ribofuranosil)-5-fluoro-citosina, el separar dicho anómero beta del mencionado anómero alfa y el hidrolizar por separado dicha anómero beta y/o dicho anómero alfa por tratamiento de ellos con un álcali.

15.

El procedimiento de este invento se ilustra gráficamente en el diagrama de circulación que sigue.

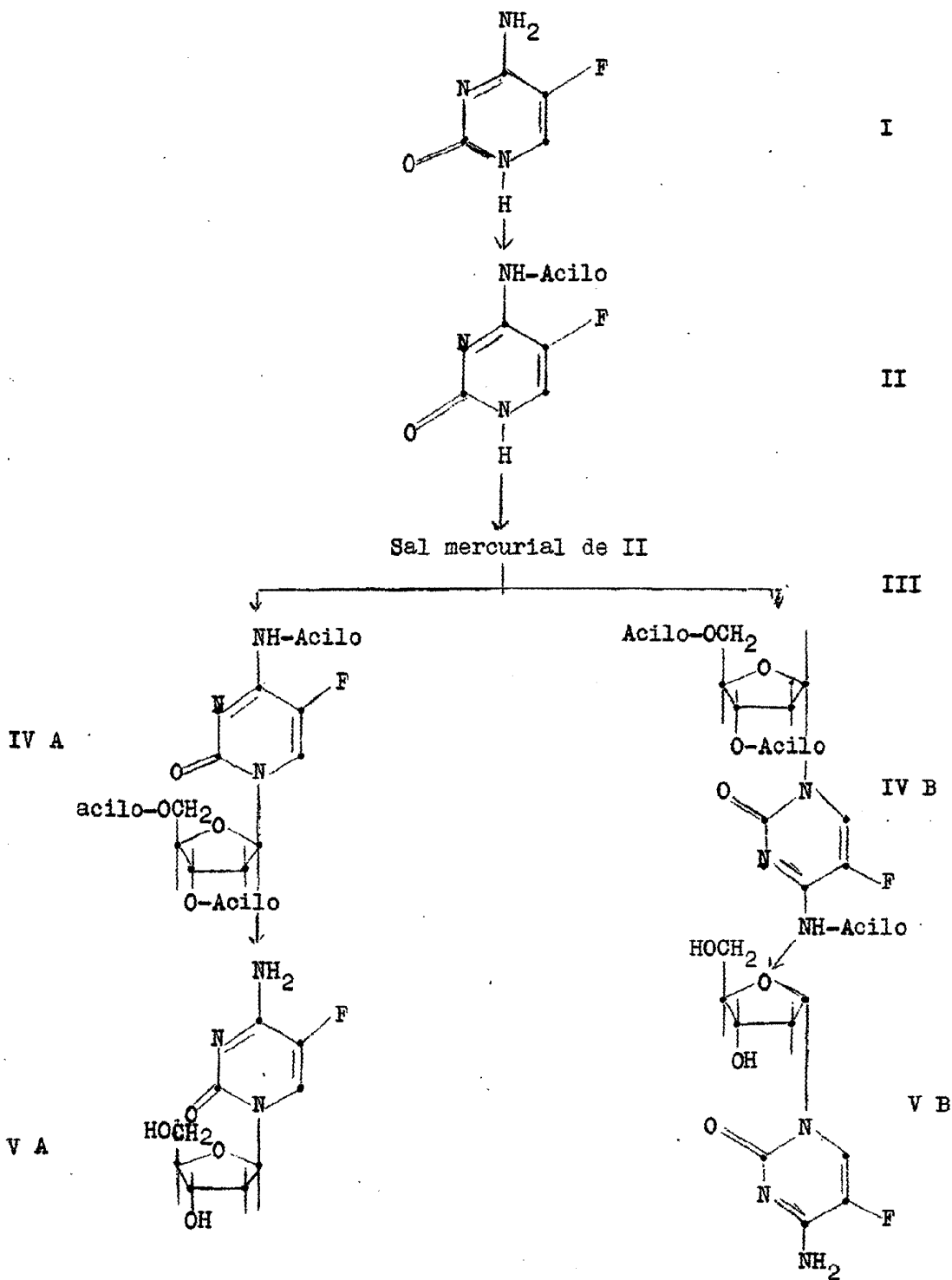
20.



1963

- 3 -

287587





287587

- En la primera etapa de este procedimiento, se hace reaccionar la 5-fluoro-citosina (I) con un agente acilante, para formar la correspondiente 4-N-mono-acil-5-fluoro-citosina (II). Esta última clase de compuesto no se había revelado antes en la especialidad. Algunas de las 4-N-mono-acil-5-fluoro-citosinas, por ejemplo la 5-fluoro-4-N-toluil-citosina y la 4-N-benzoil-5-fluoro-citosina, se hidrolizan fácilmente con ácido para formar 5-fluoro-uracilo. Este último compuesto es conocido. Resulta útil como agente antitumoral y agente germicida. Así pues, además de tener utilidad como intermediarios en el procedimiento aquí expuesto, las propiedades de algunos de los compuestos de 4-N-mono-acil-5-fluoro-citosina son tales que, en los sistemas biológicos, pueden actuar de precursores para el 5-fluoro-uracilo.
5. Para efectuar la etapa de acilación de este procedimiento, cabe usar cualquiera de los agentes acilantes bien conocidos en la especialidad. Estos incluyen, por ejemplo, el anhídrido acético, el cloruro de benzoilo, el cloruro de p-toluido, el anhídrido de pivaloilo, etc. En una modalidad preferida del invento, la 5-fluoro-citosina se acila haciéndola reaccionar con cloruro de p-toluido. La acilación se cumple simplemente mezclando la 5-fluoro-citosina con el agente acilante, a temperatura hasta la de reflujo y en presencia de un disolvente orgánico inerte. La piridina, la dimetilformamida, etc., se han revelado aptas para usar como disolvente. La cantidad de agente acilante empleado
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.



287587

- 5 -

para efectuar esta etapa del procedimiento puede variarse. Sin embargo, debe usarse una proporción de un mol por lo menos de agente acilante por cada mol de 5-fluoro-citosina presente en la mezcla reaccional. No obstante, cabe usar

5. un pequeño exceso de agente acilante, si se desea.

En la segunda etapa de este procedimiento, se hace reaccionar la 4-N-mono-acil-5-fluoro-citosina (II), de preferencia en presencia de un disolvente, con un compuesto de mercurio, para formar su sal monomercúrica. Para efectuar

10. esta etapa, cabe emplear cualquier sal de mercurio apropiada. Sin embargo, se usa de preferencia cloruro mercuríco o acetato mercuríco. Como disolvente cabe emplear cualquier disolvente orgánico inerte en que sean solubles tanto la 4-N-mono-acil-

15. -5-fluoro-citosina como la sal de mercurio. En la modalidad preferida de este invento, no obstante, el disolvente usado es la dimetilformamida. El compuesto de mercurio deseado se obtiene, por lo general en forma de un precipitado, al mezclar simplemente los reactivos a temperatura ambiente. Después de

20. su formación, la sal monomercúrica precipitada de la 4-N-mono-acil-5-fluoro-citosina se aísla de la mezcla reaccional, por ejemplo mediante filtración o centrifugación.

En la tercera etapa del procedimiento, se hace reaccionar la sal mercuríca de la 5-N-mono-acil-5-fluoro-

25. -citosina con una cantidad equimolar de un haluro de 3,5-di-

-0-aróil-2-deoxi-D-riboranosilo, como por ejemplo el

30 ABR.



- 6 -

287587

5. cloruro de 2-deoxi-3,5-di-O-p-toluil-D-ribofuranosilo, el cloruro de 3,5-di-O-p-cloro-benzoil-2-deoxi-D-ribofuranosilo, etc. El producto así obtenido contiene una mezcla de 4-N,3',5'-triacil-2'-deoxi-5-fluoro-citidina (IV A) y de su anómero alfa (IV B). Más particularmente, el producto así obtenido contiene una mezcla de 4-N-monoacil-3',5'-di-O-aroil-2'-deoxi-5-fluoro-citidina y su anómero alfa.

10. La tercera etapa, antes mencionada, del procedimiento se lleva a cabo estando la sal mercuriosa de la 4-N-mono-acil-5-fluoro-citosina suspendida en un disolvente orgánico inerte apropiado, inmisible en agua. Se ha comprobado que los disolventes como el tolueno, el tetracloruro de carbono, el xileno, el benceno, etc., tienen buena actitud para ser usados como medio de suspensión. La reacción deseada pueden producirse por simple adición del haluro de 3,5-di-O-aroil-2-deoxi-D-ribofuranosilo a la suspensión de la sal mercuriosa y agitación, a temperatura ambiente, de la mezcla así obtenida.

15. A continuación, de la mezcla reaccional obtenida en la tercera etapa del procedimiento se aislan, como entidades separadas, la 4-N,3',5'-triacil-2'-deoxi-5-fluoro-citidina (IV A) y su anómero alfa (IV B). Así, por ejemplo, cuando el producto de la reacción contiene una mezcla de los anómeros alfa y beta de la 4-N-acetil-1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-p-toluil-ribofuranosil)-5-fluoro-citosina, o cuando el producto contiene una mezcla de los anómeros alfa y beta de

20.

25.



287587

la 1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-p-toluil-D-ribofuranosil)-5-fluoro-4-N-pivaloil-citosina, se ha comprobado que el procedimiento siguiente es un medio apropiado y conveniente para separar los anómeros. Primeramente se trata la mezcla reaccional

5. procedente de la tercera etapa del procedimiento con una solución acuosa saturada de cloruro sódico. Luego se separa la capa acuosa y la capa de disolvente orgánico inerte, inmisible en agua. Se evapora la capa de disolvente orgánico hasta consistencia siruposa y a continuación se diluye el jarabe residual con acetato de etilo y éter, se le ceba y se le deja cristalizar. El producto cristalino se suspende en una mezcla de piridina y acetona, y la suspensión así obtenida se filtra. Queda en el filtro el anómero beta, mientras que el anómero alfa puede recuperarse del filtrado de cualquier medio conveniente.
- 10.

15. Sin embargo, cuando el producto de reacción de la tercera etapa del procedimiento contiene, por ejemplo, 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina, o sea el anómero beta, y 1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-toluil-alfa-D-ribofuranosil)-5-fluoro-4-N-toluil-citosina, o sea el anómero alfa, para separar el primero del último se emplea un procedimiento modificado. En este método, el producto de reacción de la tercera etapa se somete a lavados repetidos empleando grandes cantidades de solución acuosa de yoduro potásico. Durante la operación se produce alguna cristalización del anómero beta,
- 20.
25. y estos cristales pueden recuperarse, por ejemplo, mediante



287587

filtración. Luego se evapora el filtrado hasta consistencia siruposa. La dilución de este jarabe con metanol hirviente da una partida adicional del anómero beta cristalino.

Después de aislar por el procedimiento antes

5. descrito el anómero beta cristalino, la evaporación de las aguas madres metanólicas y la disolución consecutiva del residuo en tetracloruro de carbono da una partida de cristales cerosos, difíciles de filtrar. Después de trituración con éter, estos cristales se vuelven fácilmente filtrables.
10. El producto cristalino que luego se recupera por filtración puede purificarse hirviéndolo primeramente con éter, separándolo del disolvente después del enfriamiento, volviéndolo a hervir con metanol y separándolo una vez más del disolvente después del enfriamiento. El producto cristalino así obtenido es el
15. anómero alfa, o sea la 1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-toluil-alfa-D-ribofuranosil)-5-fluoro-4-N-toluil-citosina.

En la cuarta etapa del procedimiento, se desacilan separadamente por hidrólisis alcalina la N,3',5'-triacil-2'-deoxi-5-fluoro-citidina que se ha aislado de la mezcla reaccional de la tercera etapa y asimismo su anómero alfa,

20. Por ejemplo, la desacilación completa de la 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina y de la 1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-toluil-alfa-D-ribofuranosil)-5-fluoro-4-N-toluil-citidina pueden efectuarse por los procedimientos convencionales. De preferencia, la desacilación completa
25. se efectúa calentando los compuestos a temperatura de reflujo



287587

- con un alcóxido de metal alcalino o con amoníaco alcohólico. La desacilación completa de los anómeros alfa y beta de la 4-N-acetil-1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-p-toluil-D-ribofuranosil)-5-fluoro-citosina y de los anómeros alfa y beta de la
5. 1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-p-toluil-D-ribofuranosil)-5-fluoro-4-N-pivaloil-citosina se realiza de preferencia por simple mezcla de dichos compuestos con un alcóxido de metal alcalino o con amoníaco alcohólico, a temperatura ambiente. Los anómeros alfa y beta del compuesto 4-N,3',5'-tri-p-toluilo
10. pueden desacilarse también a temperatura ambiente empleando un gran exceso de álcali y/o aumentando el tiempo de la reacción.
- Se ha comprobado, además, que cuando la desacilación de la 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina se efectua en condiciones moderadas, unicamente se eliminan
15. los grupos acilo unidos a la porción sacárida de la molécula. Así, cuando se mezcla 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina, a temperatura ambiente o a temperatura inferior a la ambiente, con un alcóxido de metal alcalino o con amoníaco alcohólico, se produce 2'-deoxi-5-fluoro-4-
20. -N-p-toluil-citidina. Cuando se trata de manera semejante el anómero alfa de la 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina, se produce el anómero alfa de la 2'-deoxi-5-fluoro-4-N-p-toluil-citidina. Estos derivados se han
25. expuesto ya en la especialidad. Se hidrolizan facilmente por medio de ácido, para formar 2'-deoxi-5-fluoro-uridina,

30



- 10 -

287587

conocido agente antifungoso y antibacteriano, y su anómero alfa. Así pues, además de ser intermediarios a partir de los cuales pueden prepararse la 2'-deoxi-5-fluoro-uridina y su anómero alfa, estos compuestos pueden actuar, en los sistemas biológicos, como precursores para la 2'-deoxi-5-fluoro-uridina y su anómero alfa.

5.

Para más plena comprensión de la naturaleza y los objetos de este invento, cabe referirse a los ejemplos que siguen, los cuales se dan simplemente como ulteriores ilustraciones del invento y no implican sentido limitativo.

10.

E J E M P L O 1.

Preparación de la 5-fluoro-4-N-p-toluil-citosina

Se suspendieron en 100 cc de piridina 12,9 gramos (0,1 mol) de 5-fluoro-citosina. A esta suspensión se añadieron 17,0 gramos (14 cc, 0,11 moles) de cloruro de p-toluido. Después de mezclar, la temperatura de la mezcla reaccional se remontó espontáneamente hasta unos 45°C. Se hirvió la mezcla en reflujo durante un período de 5 horas aproximadamente y luego se la dejó en reposo a temperatura ambiente durante una noche. Se produjo cristalización de 5-fluoro-4-N-p-toluil-citosina. Se destruyó entonces cualquier exceso de cloruro de p-toluido presente en la mezcla reaccional por adición a esta de 50 cc de etanol y agitándolo a continuación por un período, de unos 20 minutos.

15.

20.

25.



287587

- 11 -

Se separó de la mezcla reaccional, por filtración, la 5-fluoro-4-N-p-toluil-citosina cristalina y se la lavó con etanol y seguidamente con éter. Luego se secaron los cristales en vacío a temperatura de unos 60°C. Se

5. obtuvieron así 18,35 gramos de 5-fluoro-4-N-p-toluil-citosina, fundente a 250-251°C con descomposición.

La evaporación de las aguas madres hasta sequedad, la trituración del residuo con etanol, la eliminación del etanol por evaporación y, por último, la suspensión del

10. residuo en 20 cc de éter y 20 cc de agua, dieron una segunda partida de cristales, que pesaba 1,56 gramos.

El rendimiento total de 5-fluoro-4-N-p-toluil-citosina fue de 19,91 gramos, o sea el 80,5% de la teoría. Una muestra de este producto, recristaliza en unas 300 volúmenes de etanol al 90%, dio los datos analíticos siguientes

20. punto de fusión, 257-258°C con descomposición. $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 265, 325 milimicras (epsilon 12,700, 17,000). $\lambda_{\text{min}}^{\text{EtOH}}$ 235; 290 milimicras (epsilon 8,000, 9,400).

25. Análisis: Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{FN}_3\text{O}_2$: C, 58,30; H, 4,08; N, 17,00; F, 7,68

Hallado: C, 58,43; H, 4,41; N, 17,10; F, 7,51.



287587

Preparación de la 5-fluoro-4-N-p-toluil-citosina monomercúrial

- A una solución de 6,95 gramos de 5-fluoro-4-N-p-toluil-citosina disueltos en 75 cc de dimetilformamida, que se calentó a temperatura de unos 100°C, se añadió una solución de
5. 8,97 gramos (0,0281 moles) de acetato de mercurio en 75 cc de etanol hirviente. Después de mezclar estas soluciones, se produjo precipitación. Para asegurarse la precipitación completa se añadieron 800 cc de éter al sistema de la reacción. La
10. centrifugación, el lavado con éter y el secado a temperatura de unos 35°C en vacío dieron 11,80 gramos (94,4% de la teoría) de la sal monomercúrial de la 5-fluoro-4-N-p-toluil-citosina.

La sal monomercúrial así obtenida dio el análisis siguiente:

15. Calculado para $C_{12}H_8N_3O_2Hg$: F, 4,26; N, 9,43
- Hallado: F, 4,07; N, 9,13

Preparación de la 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina

20. Se deshidrogenó una suspensión de 11,75 gramos (0,0264 moles) de 5-fluoro-4-N-p-toluil-citosina monomercúrial en 350 cc de tolueno por destilación de unos 40 cc de tolueno. Luego se enfrió la suspensión hasta temperatura ambiente y se le añadieron, agitando, 22,3 gramos (0,0528 moles) de cloruro de 2-deoxi-3,5-di-O-p-toluil-D-ribofuranosilo. La temperatura



- 13 -

287587

- de la mezcla reaccional subió ligeramente y se formó una solución límpida en el curso de unos 5 minutos. Al cabo de unos 35 minutos, el producto cristalino empezó a separarse de la solución. En este punto se instalaron en la mezcla 100 cc de una solución acuosa de yoduro potásico al 15% y se agitó la mezcla por un período de unos 20 minutos. Los cristales densos que se formaron fueron separados de la solución y lavados con agua y éter. Luego se secaron los cristales en vacío a temperatura de unos 60°C. Después de triturar estos cristales con 75 cc de etanol hirviente, se obtuvieron 5,36 gramos de la 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina, fundente a 217°C. La recristalización del producto en 400 cc de acetato de butilo dio 4,25 gramos de agujas arracimadas, fundentes a 234-235°C. $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_2\text{Cl}_2}$ 243, 232 milimicras (Epsilon 37,500, 26,500), $\lambda_{\text{min}}^{\text{CH}_2\text{Cl}_2}$ 290 milimicras (Epsilon 8,490). $[\alpha]_D^{25} = +5,5^\circ$. (c = 1,0 en dimetilformamida).

- Se obtuvo una segunda partida de cristales por evaporación de las aguas madres toluénicas, etanólicas y de acetato de butilo. El rendimiento total de 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina que así se obtuvo fue de 5,90 gramos (40% de la teoría). Este producto dio los datos analíticos siguientes:

30 ABR 1962

Calculado para $C_{33}H_{30}FN_3O_7$: C, 66,10; H, 5,04; F, 3,17;
N, 7,01

Hallado: C, 66,16; H, 5,03; F, 3,01;
N, 6,73, 6,90.

5.

Preparación de la 2'-deoxi-5-fluoro-citidina.

10.

En 25 cc de metanol que contenían una pequeña cantidad de fenolftaleína se suspendieron 2,24 gramos de 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina. Se calentó la suspensión a temperatura de reflujo, y durante este se añadieron gota a gota, en un periodo de 15 minutos, 2,7 cc de metóxido sódico 0,85-n. Se prosiguió el reflujo por un periodo de una hora aproximadamente.

15.

Luego se neutralizó la solución con 2,7 cc de ácido clorhídrico alcohólico 0,85-n y se la evaporó en vacío para obtener un jarabe cristalino. Se recogió este jarabe en alcohol butílico y se volvió a eliminar el disolvente por evaporación. Luego se secó el residuo en vacío a temperatura de unos 60°C, se recogió el residuo en 80 cc de butanol hirviente y se filtró la solución turbia, así obtenido, por medio de tierra de batán y carbón. Con el enfriamiento se segregó un producto cristalino. Separando los cristales de las aguas madres por filtración, se obtuvieron 0,424 gramos de 2'-deoxi-5-fluoro-citidina, fundente a 194-196°C.

20.

25.

Se obtuvo una segunda partida de 0,226 gramos



- 15 =

287587

de 2'-deoxi-5-fluoro-citidina, fundente a 196-197°C, por evaporación de las aguas madres, deshidrogenación del sistema con tolueno y cristalización del producto en butanol.

EJEMPLO 2.

5. Este ejemplo se incluye como demostración de un método para separar y recuperar tanto la 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina como su anómero alfa, o sea la 1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-toluil-alfa-ribofuranosil)-5-fluoro-4-N-toluil-citosina, de una mezcla que las contenga.

10. En este ejemplo, 36,3 gramos de la sal monomercu-
rial de la 5-fluoro-4-N-p-toluil-citosina (preparada por el método descrito en el Ejemplo 1), se hicieron reaccionar con cloruro de 2-deoxi-3,5-di-O-p-toluil-D-ribofuranosilo, suspendido en 750 cc de tolueno. Esta preparación se efectuó empleando el procedimiento que se ha descrito en el

15. El producto así obtenido se lavó repetidamente con 800 cc de solución de yoduro potásico al 30% y 4000 cc de agua. La 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina se separó de la solución toluénica en forma de cristales. Estos cristales fueron separados por filtración y la solución toluénica evaporada hasta consistencia de

20.

30 APR



- 16 -

287587

jarabe. Este jarabe, por tratamiento con metanol hirviente, dio una partida adición de cristales. Se obtuvo un rendimiento total de 20,2 gramos de 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina, fundente a 215°C.

5. Se evaporaron luego las aguas madres metanólicas y se disolvió el residuo en 80 cc de tetracloruro de carbono. De la solución se separaron cristales cerosos. Después de trituración con 75 cc de éter, estos cristales se recuperaron por filtración. El producto se purificó hirviéndolo con 225 cc de metanol hirviente. Se obtuvo un rendimiento de 7,5 gramos de agujas arracimadas, fundentes a 152-153°C. Este producto fue recristalizado en 80 volúmenes de etanol, con lo que se obtuvo la 1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-toluil-alfa-D-ribofuranosil)-5-fluoro-4-N-toluil-citosina, fundente a 152,5-153°C. $[\alpha]_D^{24} = -133^\circ$. (c = 0,5 en dimetilformamida).
10. Lambda $\begin{matrix} \text{EtOH} \\ \text{max} \end{matrix}$ 242-243, 330 milimicras (Epsilon 39,200, 12,960).
15. Lambda $\begin{matrix} \text{EtOH} \\ \text{min.} \end{matrix}$ 219, 295 milimicras (Epsilon 19,000, 7,650).
20. Lambda $\begin{matrix} \text{CH}_2\text{Cl}_2 \\ \text{max} \end{matrix}$ 243, 334 milimicras (Epsilon 37,500, 28,200).
25. Lambda $\begin{matrix} \text{CH}_2\text{Cl}_2 \\ \text{min.} \end{matrix}$ 291 milimicras (Epsilon 9,200).

El producto dio el análisis siguiente:

Calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{FN}_3\text{O}_7$: C, 66,10; H, 5,04; F, 3,17;
N, 7,0

Hallado: C, 66,54; H, 5,33; F, 3,27;
N, 6,42.



287587

EJEMPLO 3.

5. Este ejemplo se incluye para demostrar un método con el cual la 1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-toluil-alfa-D-ribofuranosil)-5-fluoro-4-N-toluil-citosina se convierte en 1-(2'-deoxi-alfa-D-ribofuranosil)-5-fluoro-citosina, o sea el anómero alfa de la 2'-deoxi-5-fluoro-citidina.

10. En este ejemplo se añadieron 559 mg de 1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-toluil-alfa-D-ribofuranosil)-5-fluoro-4-N-toluil-citosina (preparada como se ha descrito en el ejemplo 2) a 25 cc de amoníaco metanólico 6-n. Se dejó la solución en reposo a temperatura ambiente durante unas 24 horas y luego se la evaporó en vacío hasta sequedad. El residuo se calentó en reflujo durante unos 5 minutos en 30 cc de cloroformo y se le dejó en reposo durante la noche a temperatura ambiente, con lo que se produjo la cristalización. Los cristales fueron separados por filtración.

20. Se obtuvieron 214 mg (84% de la teoría) de 1-(2'-deoxi-alfa-D-ribofuranosil)-5-fluoro-citosina, fundente a 182-183°C. Después de recristalización en 5 cc de etanol, seguida por trituración con etanol caliente, el producto fundió a 186-187°C. $[\alpha]_D^{25} = -92^\circ$. (c = 1,0 en agua). $\lambda_{\text{max}}^{\text{HCl}}$ 0,1-n 291 milimicras (epsilon 12,000). $\lambda_{\text{min}}^{\text{HCl}}$ 241 milimicras (epsilon 1,330).



287587

Análisis calculado para $C_9H_{12}FN_3O_4$: F, 7,75
Hallado: F, 7,57

EJEMPLO 4.

5. A. Este ejemplo se incluye para demostrar medios distintos a los descritos en el ejemplo 1 con los que se puede desacilar la 2'-deoxi-5-fluoro-4-N-3',5'-tri-p-toluil-citidina.

10. En este ejemplo se calentó a temperatura de reflujo una suspensión de 3 gramos de 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina (5,36 milimoles) en 50 cc de metanol. A este sistema reaccional se añadieron, gota a gota, 6 cc de metóxido lítico 6,45-n. Durante la adición de este último se mantuvo la temperatura de la mezcla reaccional dentro de los límites de unos 50 a 55°C. Al cabo de unos 50 minutos a esta temperatura, se obtuvo una solución y, después de calentar a dicha temperatura durante 15. unas 5 horas, se observó ausencia fundamental de absorción en las 320 milimicras. Al final de las 5 horas, se neutralizó la solución con ácido clorhídrico alcohólico y luego se la clarificó empleando celita y carbón. Seguidamente se evaporó la solución hasta consistencia de jarabe y se obtuvo 20. de éste, empleando una mezcla de 10 cc de etanol, 10 cc de metanol y 25 cc de éter, un producto cristalino.



257587

Se obtuvieron 0,91 gramos (59,4% de la teoría) de 2'-deoxi-5-fluoro-citidina. Con la recristalización subsiguiente del producto, primeramente en butano, y luego en etanol, se obtuvo 2'-deoxi-5-fluoro-citidina fundente a 196-197°C.

5.

B. Para demostrar todavía otro método de desacilación se suspendió 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina (10,71 gramos) en 170 cc de etanol que contenía 15% de amoníaco y se agitó la mezcla a temperatura ambiente por un período de unas 16 horas. Luego se añadieron a la mezcla reaccional 330 cc de metanol y agitándola, se la saturó con amoníaco, bajo refrigeración con hielo, y se la dejó en reposo por un período adicional de 20 horas. La solución así obtenida

10.

fue clarificada empleando tierra de batán y carbón. El análisis de ella reveló que contenía solamente $E_{320}^{NaOH} 0,1-n = 1250$ (0,3% de 2'-deoxi-5-fluoro-4-N-toluil-citidina). Después de evaporada, esta solución dio un polvo seco cristalino, que, una vez deshidrogenado con 80 cc de etanol hirviente, dio 2,33 gramos de 2'-deoxi-5-fluoro-citidina, fundente a 193,5-195°C al ser enfriado y después de adición de 80 cc de éter.

15.

20.

La ulterior adición de éter a las aguas madres y la evaporación consecutiva de la solución hasta sequedad y la trituration del residuo con 100 cc de acetato de butilo hirviente produjeron una partida adicional de la 2'-deoxi-

25.

30



- 20 -

287587

-5-fluoro-citidina cristalina. El rendimiento total obtenido fue de 4,21 gramos, o sea el 89,7% de la teoría.

EJEMPLO 5.

5. Preparación de la 2'-deoxi-5-fluoro-4-N-p-toluil-citidina

En este ejemplo se suspendieron en 30 cc de metanol, que contenía unas gotas de fenolftaleína, 1,12 gramos (0,002 moles) de 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina (preparada como se ha descrito en el ejemplo 1). A esta suspensión se añadieron 2 cc de metóxido sódico 1-n. Se sacudió la mezcla por un período de unos 20 minutos y luego se le añadieron 2 cc más de metóxido sódico 1-n. A continuación se dejó la mezcla en reposo a temperatura de unos 3°C por un período de unas 16 horas. La ulterior neutralización del producto con ácido clorhídrico metanólico (0,0026 moles de ácido clorhídrico), seguida por evaporación, dio un jarabe que, después de triturado con 50 cc de éter, formó cristales. El producto cristalino fue separado por centrifugación, lavado con éter y recogido consecutivamente en 15 cc de agua. Con el reposo, se depositaron cristales, que fueron separados por filtración y lavados con agua y luego con etanol. El filtrado, después de neutralización con 0,7 cc de ácido clorhídrico 1-n, dio una segunda partida de cristales. El rendimiento total de producto cristalino obtenido fue de 0,41 gramos (56,5% de la teoría). El producto se reblandeció a 188-189°C, se resolidificó y luego fundió a



287587

217-218°C.

Por recristalización de 0,3 gramos del producto en 15 cc de agua y 5 cc de etanol. se obtuvieron 0,27 gramos de 2'-deoxi-5-fluoro-4-N-p-toluil-citidina, en forma de

5. agujas largas, fundentes a 218-219°C. $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 265, 329

milimicras (epsilon 16,800, 17,900). $\lambda_{\text{min}}^{\text{EtOH}}$ 236, 294 mili-

micras (epsilon 8,600, 8,700). $\lambda_{\text{max}}^{\text{NaOH } 0,1}$ 245, 320 milimi-

10. cras (epsilon 11,440, 22,380). $\lambda_{\text{min}}^{\text{NaOH } 0,1}$ 235, 260 milimi-

cras (epsilon 11,160, 8,410). $[\alpha]_D^{25} = +90,32$. (c = 0,4 en dimetilformamida).

Análisis calculado para $C_{33}H_{30}FN_3O_7$: C, 66,10; H, 5,04;

F, 3,17 ; N, 7,01

15. Hallado: C, 66,16; H 5,03;

F, 3,01; N 6,73, 6,90

EJEMPLO 6.

Preparación de la 4-N-acetil-5-fluoro-citosina

20. En un recipiente apropiado se depositaron

12,9 gramos de 5-fluoro-citosina, 60 cc de ácido acético

y 12 cc de anhídrido acético y se calentaron en él a tempe-

ratura de unos 110 a 115°C. Al cabo de unos 5 minutos de

25. calentamiento, todos los reactivos se habían disuelto. Se



287587

dejó enfriar el producto a temperatura ambiente y, con el enfriamiento, se produjo la cristalización. Se separó el producto cristalino, por filtración, del sistema reaccional y se le secó a peso constante a temperatura de unos 80°C.

5. Se obtuvieron 17,1 gramos de 4-N-acetil-5-fluoro-citosina (100% de la teoría), fundente a 235°C a 237°C con descomposición

Análisis: calculado para $C_6H_6N_3O_2F$: C, 42,1; H, 3,5

Hallado: C, 42,24; H, 3,80

10.

Preparación de la 4-N-acetil-1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-p-toluil-D-ribofuranosil)-5-fluoro-citosina

- Calentando moderadamente la mezcla en un baño de vapor, se obtuvo una solución de 17.1 gramos de 4-N-acetil-5-fluoro-citosina en 200 cc de dimetilformamida.
15. Se añadió esta solución a una solución de 32,0 gramos de acetato mercurico disueltos en 130 cc de dimetilformamida. Antes de añadirle la solución de 4-N-acetil-5-fluoro-citosina, se había enfriado la solución de acetato mercurico hasta una temperatura de 0°C aproximadamente. La adición de la solución de fluorocitosina a la solución de acetato mercurico se efectuó con una progresión tal que la temperatura de la mezcla reaccional no excediera de 20°C aproximadamente. Una vez terminada la adición de la solución
25. de 4-N-acetil-5-fluoro-citosina, se agitó la mezcla reaccional a temperatura de unos 0 a 10°C durante unos 10 minutos.



- 23 -

287587

A continuación se añadieron a la mezcla 300 cc de éter absoluto, y el precipitado que se formó fue recogido por filtración. Este precipitado se lavó consecutivamente, en primer lugar con 100 cc de éter absoluto y luego con 100 cc de tolueno.

5.

El material, sin secar, fue suspendido en 500 cc de tolueno, con agitación constante, y se añadieron a la suspensión 80,0 gramos de cloruro de 2-deoxi-3,5-di-O-p-toluil-D-ribofuranosilo. Se agitó la mezcla reaccional a temperatura de unos 20 a 25°C por un período de 1 hora aproximadamente y al final de este tiempo se le añadieron 200 cc de una solución saturada de cloruro sódico y 1,0 gramo de bicarbonato sódico y se agitó el conjunto enérgicamente durante unos 15 minutos. Se obtuvo así un sistema bifásico.

10.

Se separó la capa toluénica y se la sacudió con 100 cc de una solución saturada de cloruro sódico. Luego se evaporó la solución toluénica hasta sequedad, en vacío, y el jarabe residual así obtenido fue diluido con 20 cc de acetato de etilo y 200 cc de éter, cebado y dejado para que cristalizara. La cristalización resultó completa en un período de unas 12 horas. Los cristales así formados se filtraron y se lavaron con éter. Se obtuvieron 39,5 gramos (75% de la teoría) de 4-N-acetil-1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-p-toluil-D-ribofuranosil)-5-fluoro-citosina, fundente a 155-162°C. $[\alpha]_D^{25} = -60^{\circ}$ (1% DFA).

15.

20.

25.



287587

Aislamiento del anómero beta de la 4-N-acetil-1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-p-toluil-D-ribofuranosil)-5-fluoro-citosina

30,0 gramos de la 4-N-acetil-1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-p-toluil-D-ribofuranosil)-5-fluoro-citosina obtenida por el procedimiento descrito en el párrafo anterior se suspendieron con 45 cc de piridina y 45 cc de acetona. Se agitó esta mezcla por unos 30 minutos y luego se apartaron de ella, por filtración, los materiales no disueltos. Se lavó este material consecutivamente con 10 cc de acetona.

5.

Se obtuvieron así 12,5 gramos de 4-N-acetil-2'-deoxi-5-fluoro-3',5'-di-O-p-toluil-citidina, fundente a 197°C. $[\alpha]_D^{25} + 32,0 (\pm 0,5)$. Después de recristalizado del butanol. el producto dio los datos analíticos siguientes:

15.

Calculado para $C_{27}H_{26}O_7N_3F$: C, 61,94; H, 5,01; N, 8,41
Hallado : C 61,86; H, 5,24; N, 8,12

Preparación de la 2'-deoxi-5-fluoro-citidina

Se suspendieron en 80 cc de metanol 5,24 gramos de 4-N-acetil-2'-deoxi-5-fluoro-3',5'-di-O-p-toluil-citidina, y a esta suspensión se añadieron 15 cc de solución 1-n de metóxido sódico. Los reactivos entraron rápidamente en solución. Se dejó ésta en reposo por 6 horas y luego se le añadieron 15 cc de ácido sulfúrico acuoso 1-n. Se evaporó

25.



la solución hasta sequedad y se lavó el residuo con éter.

A continuación se extrajo el residuo con 100 cc de metanol caliente, se filtró y se evaporó el filtrado en vacío. Se obtuvo un rendimiento de 2,4 gramos (100% de la teoría)

5. de 2'-deoxi-5-fluoro-citidina cristalina, fundente a 188-190°. La recrystalización del producto en 120 cc de metanol dio la 2'-deoxi-5-fluoro-citidina, fundente a 195-196°C.

$\alpha_D^{25} = + 76,6^\circ (\pm 0,4^\circ)$ (1% en agua).

EJEMPLO 7.

10.

Preparación de la 5-fluoro-4-N-pivaloil-citosina

En este ejemplo se preparó una mezcla de 13,0 gramos de 5-fluoro-citosina, 26 cc de dimetilformamida y 19,0 gramos de anhídrido del ácido pivalico. Se calentó esta mezcla, agitándola, a temperatura del orden de unos 110 a 120°C y al cabo de unos 15 minutos de calentamiento se dejó enfriar la mezcla reaccional. Con el enfriamiento cristalizó de la solución la 5-fluoro-4-N-pivaloil-citosina, que fue recuperada por filtración. Recrystalizado del metanol, el producto fundió a temperatura de 227 a 229°C, con descomposición.

20.

20.

La 5-fluoro-4-N-pivaloil-citosina así obtenida dio el análisis siguiente:



287587

Calculado para $C_{12}H_{12}O_2N_3F$: C 50,6; H, 5,6

Hallado: C 50,45; H, 5,81

Preparación de la 2'-deoxi-5-fluoro-4-N-pivaloil-3',5'-

5. di-O-p-toluil-citidina

Se deslió a temperatura del orden de unos 0 a 5° C, una mezcla de 10,52 gramos de 5-fluoro-4--N-pivaloil-citosina, 16 gramos de acetato mercurico y 20 cc de dimetil-formamida. Se obtuvo así un jarabe homogéneo. A este jarabe se añadieron, agitando, 300 gramos de éter absoluto. Se precipitó entonces un compuesto de mercurio voluminoso, amorfo y en escamas. Se recogió este precipitado por filtración y se le lavó con 50 cc de éter absoluto.

10.

A continuación se suspendió el producto así obtenido en 500 cc de tolueno, por agitación. Se le añadieron luego 40,0 gramos de cloruro de 2-deoxi-3,5-di-O-p-toluil-D-ribofuranosilo y se agitó la mezcla por un período de 1 hora aproximadamente. El producto obtenido se elaboró del modo que se ha descrito en el ejemplo 6 (para la preparación de la 4-N-acetil-1-(2'-deoxi-3',5'-di-O-p-toluil-D-ribofuranosil)-5-fluoro-citosina y el aislamiento de su anómero beta) a fin de obtener 4,0 gramos de 2'-deoxi-5-fluoro-4-N-pivaloil-3',5'-di-O-p-toluil-citidina cristalina, fundente a 209°C. $[\alpha]_D^{25} = + 21^\circ$ (1% en dimetil-formamida).

15.

20.

25.



Preparación de la 2'-deoxi-5-fluoro-citidina

Se suspendieron en 70 cc de metanol 3,3 gramos de 2'-deoxi-5-fluoro-4-N-pivaloil-3',5'-di-O-p-toluil-citidina y luego se añadieron a esta suspensión unas gotas de solución alcohólica de fenolftaleína. Seguidamente se agregó a la suspensión, gota a gota, solución 1,8-n de metilato de bario en alcohol metílico hasta que la mezcla adquirió un color rojo duradero. Se dejó reposar la mezcla reaccional a temperatura de unos 25°C por un periodo de unos 90 minutos y seguidamente se neutralizó la solución con ácido sulfúrico 1-n y se la filtró. El filtrado fue elaborado de la misma manera que en el ejemplo 6 (para la preparación de la 2'-deoxi-5-fluoro-citidina) a fin de obtener 1,5 gramos de 2'-deoxi-5-fluoro-citidina en forma de cristales, fundentes a 196°C. $[\alpha]_D^{25} = +75$ (1% en agua).

= . =

NOTA 287587⁰



Hecha la descripción del invento, se declaran nuevas y de propia invención, las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la demanda de patente estadounidense nº 191.438 depositada el 1º de Mayo de 1.962.

5. 1. Un procedimiento para la fabricación sintética de 2'-deoxi-5-fluoro-citidina pura o de su anomero alfa puro, respectivamente, caracterizado por el hecho de que comprende hacer reaccionar 5-fluoro-citosina con un agente acilante, hacer reaccionar la 4-N-mono-acil-5-fluoro-citosina producida con una sal de mercurio para formar la sal monomercúrial de dicha 4-N-mono-acil-5-fluoro-citosina, hacer reaccionar dicha sal monomercúrial con un haluro de 3,5-diaroilo-2-deoxi-D-ribofuranosilo para producir una mezcla que contenga el anomero alfa y el anomero beta de la 4-N-mono-acil-1-(3',5'-di-O-aróilo-2'-deoxi-D-ribofuranosil)-5-fluoro-citosina, separar dicho anomero beta de dicho anomero alfa e hidrolizar por separado dicho anomero beta y/o dicho anomero alfa por tratamiento de ellos con un álcali.
- 10.
- 15.
20. 2. Un procedimiento conforme se ha definido en la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el agente acilante es el cloruro de p-toluido y de que el haluro de 3,5-di-O-aróilo-2-deoxi-D-ribofuranosilo es el cloruro de 3,5-di-O-p-toluidil-2-deoxi-D-ribofuranosilo.
25. 3. Un procedimiento conforme se ha definido en la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que se calienta en reflujo 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluidil-citidina con metóxido sódico, metóxido lítico o amoníaco alcohólico.



28587

4. Un procedimiento conforme se ha definido en la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que se produce 2'-deoxi-5-fluoro-4-N-p-toluil-citidina mezclando 2'-deoxi-5-fluoro-4-N,3',5'-tri-p-toluil-citidina con metóxido sódico a temperatura alrededor de la ambiente o inferior a la ambiente.
5. Un procedimiento conforme a lo definido en la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el agente acilante es una mezcla que comprende ácido acético y anhídrido acético y de que el haluro de 3,5-di-O-arcoil-2-deoxi-D-ribofuranosilo es el cloruro de 3,5-di-O-p-toluil-2-deoxi-D-ribofuranosilo.
10. Un procedimiento conforme a lo definido en la reivindicación 5, caracterizado por el hecho de que se trata 4-N-acetil-2'-deoxi-5-fluoro-3',5'-di-O-p-toluil-citidina con metóxido sódico a temperatura ambiente, para producir la 2'-deoxi-5-fluoro-citidina.
15. Un procedimiento conforme se ha definido en la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el agente acilante es el anhídrido del ácido pivalico y de que el haluro de 3,5-di-O-arcoil-2-deoxi-D-ribofuranosilo es el cloruro de 2-deoxi-3,5-di-O-p-toluil-D-ribofuranosilo.
20. Un procedimiento conforme se ha definido en la reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que se trata la 2'-deoxi-5-fluoro-4-N-pivaloil-3',5'-di-O-p-toluil-ci-
- 25.

287537



tidina con metilato de bario a temperatura ambiente, para producir la 2'-deoxi-5-fluorocitidina.

9. Un procedimiento para la fabricación sintética de 2'-deoxi-5-fluoro-citidina pura o de su anómero alfa puro.

5.

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de treinta hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 30 de Abril de 1.963

10.

F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE, S.A.

P. a.

JAME ISEPN MIRALLES

P.P.