

SECCION TECNICA
CLASIFICACION P. C.
CLASE C07 / A61
SUBCLASE D / K

P.- 41.549

S. 6096
506/KM/Hr

366910

22 MAY. 1969

Memoria descriptiva

22



para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD

entidad /~~de nacionalidad~~ checoeslovaca

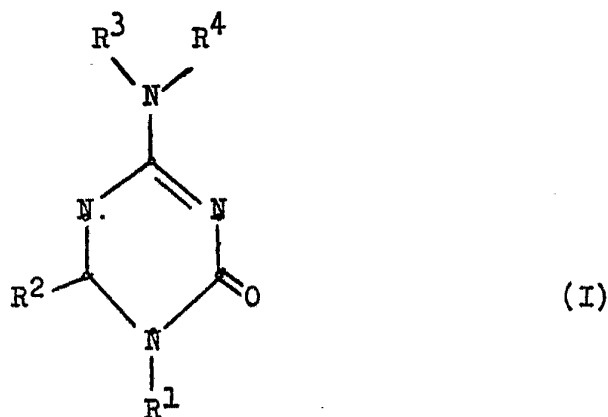
con domicilio en Národní Třída 3, Praga, Checoeslovaquia)

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR 1-GLICOSIL-5-AZACITOSINAS" (Clase Internacional C07d)

22 MAY



La Invención se refiere a un procedimiento de preparación de 1-glicosil-5-azacitosinas, de fórmula general (I)



15 en la que R^1 designa un residuo glicosílico, R^2 designa un átomo de hidrógeno o un grupo alcohol que consta de 1 a 4 átomos de carbono, y R^3 y R^4 , idénticos o diferentes, designan átomos de hidrógeno o grupos alcohol que contienen de 1 a 4 átomos de carbono, o grupos aralcohol que contienen de 7 a 10 átomos de carbono.

20 Dos de los compuestos que corresponden al tipo arriba indicado exhiben efectos biológicos significativos, a saber: 1- B -D- ribofuranosil-(4-amino-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona (5-azacitidina) y 1-(2-desoxi- B -D-ribofuranosil)-4-amino-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona (5-aza-2'-desoxicitidina).

25 La 5-azacitidina, un antimetabolito pirimidínico, inhibe, a concentraciones bajas, el crecimiento bacteriano, y muestra un efecto antileucémico elevado, en ratones. En el caso de V.faba meriston, la 5-azacitidina ocasiona una inhibición mitótica y aberraciones cromosómicas. Ha sido
30 descrito un efecto mutagénico de la 5-azacitidina. Además,



la 5-azacitidina suprime la formación de enzimas inductores en células de mamíferos, la regeneración del hígado de la rata después de la hepatectomía, y, por otra parte, protege a los ratones frente a los efectos de los rayos X.

5 La 5-aza-2'-desoxicitidina, de manera semejante a la 5-azacitidina, suprime considerablemente la formación de leucemia experimental y muestra, aún a concentraciones bajas, propiedades bacteriostáticas importantes.

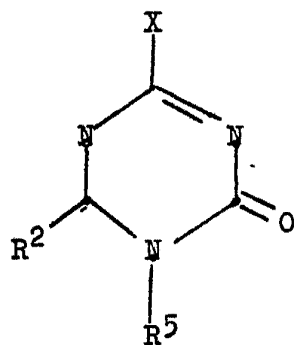
10 Es de esperar una actividad biológica similar de algunas otras 1-glicosil-5-azacitosinas.

15 La preparación de 1-glicosil-5-azacitosinas, fue descrita en las Patentes de España, 307.376 y 301.738. Se añaden isocianatos de per-acilglicosilo a O-alcoholisoureas, obteniéndose los correspondientes per-acilglicosil-sobiurets o per-acilglicosilisotiobiurets. La condensación de estos últimos compuestos con ortoésteres de ácidos alifáticos, proporciona 1-per-acilglicosil-4-alcoxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazinonas-(2) o 1-per-acilglicosil-4-alcoholitio-1,2-dihidro-1,3,5-triazinonas-(2), que por tratamiento con amoníaco o aminas, en alcoholes, conduce a las 20 1-glicosil-5-azacitosinas, finales. El inconveniente de este procedimiento consiste en la reacción de amoníaco o aminas con las 1-per-acilglicosil-4-alcoxi (o alcoholitio)-1,2-dihidro-1,3,5-triazinonas-(2), que habitualmente proporciona las 1-glicosil-5-azacitosinas requeridas con muy 25 bajos rendimientos, a causa de una inestabilidad de los intermedios antes mencionados, en las condiciones de la aminación. Además, los 4-alcoholitio derivados son apreciablemente menos estables que los correspondientes 4-alcoxi 30 derivados, y su reactividad con el amoníaco o aminas es



muy baja. Sin embargo, se ha descubierto que las 1-glicosil-4-alcoxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazinonas-(2) libres, son aprexiablemente mas estables que sus per-acil derivados. La aminación de las -1-glicosil-4-alcoxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazinonas-(2) es muy rápida y proporciona rendimientos elevados de las 1-glicosil-5-azacitosinas requeridas. Las 1-glicosil-4-alcoxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazinonas-(2) libres se obtienen facilmente mediante alcoholisis de los correspondientes per-acil derivados, así como también mediante alcoholisis de 1-per-acilglicosil-4-alcoholitio-1,2-dihidro-1,3,5-triazinonas-(2), lo que, en este caso concreto, va acompañado de una conversión del grupo 4-alcoholitio en grupo 4-alcoxi.

Según el procedimiento proporcionado por la presente Invención, la preparación de las 1-glicosil-5-azacitosinas correspondientes a la fórmula general I, consiste en hacer reaccionar los compuestos de fórmula general II

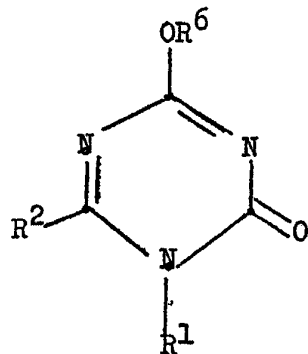


(II)

en la que R² tiene el mismo significado expuesto respecto a la fórmula I, R⁵ designa un residuo per-acilglicosílico, estando constituido el grupo acilo por - 2 - 10 átomos de carbono, y X designa un grupo alcoxi o alcoholitio, que con-

tiene de 1 a 4 átomos de carbono, con un alcóxido de metal alcalino, constituido por 1 a 6 átomos de carbono, en el seno de un alcohol que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, preferentemente en metanol, con lo que se forman las

5 1-glicosil-4-alcóxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazinonas-(2), de fórmula general III,



15 en la que R¹ y R² tienen el mismo significado que en la fórmula I y R⁶ designa un grupo alcohol de 1 - 4 átomos de carbono, y tratar los compuestos III en el seno de un alcohol, constituido por 1 a 6 átomos de carbono, preferentemente metanol, con un compuesto de fórmula general

20 IV



en la que R³ y R⁴ tienen el mismo significado que en la fórmula I.

25 La conversión de las alcoxitriazinonas o alcoholitriazinonas de fórmula general II, en las 1-glicosil-5-azacitosinas de fórmula general I, se efectúa, preferentemente, sin aislar las alcoxitriazinonas de fórmula general III.

30 La reacción de los compuestos de fórmula general



5 II con alcóxidos de metal alcalino, se lleva a cabo a temperatura ambiente, en un alcohol de 1 - 6 átomos de carbono, preferentemente en metanol. En el caso de alcoholitos derivados, se obtienen rendimientos óptimos con el empleo de 1,2 moles del alcóxido por 1 mol del compuesto de partida.

10 La reacción de las alcoxitriazinonas correspondientes a la fórmula general III, con el compuesto de fórmula general IV, se efectúa a temperatura ambiente en el seno de un alcohol de 1 - 6 átomos de carbono, preferentemente en metanol.

15 La conversión de los compuestos de fórmula general II en 1-glicosil-5-azacitosinas, de fórmula general I, puede efectuarse en una etapa, a saber, mediante la acción simultánea del alcóxido de metal alcalino y la solución alcohólica de uno de los compuestos de fórmula general IV.

20 La Invención se ilustra, además, mediante los siguiente Ejemplos, aunque no queda limitada a ellos.

5-Azacitidina

(1-β - D-Ribofuranosil-4-amino-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona)

EJEMPLO 1

25 Se agita una mezcla de 1-(2,3,5-tri-O-benzoil-β -D-ribofuranosil)-4-metiltio-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona (0,5875 g), metanol absoluto (5 ml), y una solución de metóxido de sodio en metanol, 1,N (1,2 ml), a temperatura ambiente, excluyendo la humedad atmosférica

30



(mediante el empleo de un tubo lleno con lentejas de hidróxido potásico). El compuesto de partida se disuelve en el transcurso de 5 minutos. La solución resultante se deja en reposo a temperatura ambiente durante 45 minutos y se eliminan los cationes mediante paso a través de una columna llena con 10 ml de una resina de cambio catiónico debilmente ácida (H), previamente lavada con agua y metanol. El efluente metanólico (60 ml.) se evapora a presión reducida a 30°C (temperatura del baño), se disuelve el residuo en metanol (20 ml), y se vuelve a evaporar la solución. El 1- β -D-ribofuranosil-4-metoxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona crudo, cristalino, residual, se disuelve (sin purificación adicional) en una solución al 10% de amoníaco anhidro en metanol absoluto (4ml) y se deja en reposo la mezcla total de reacción, en un matraz tapado, durante 30 minutos a temperatura ambiente (el producto comienza a depositarse en el curso de 5 minutos) y durante 12 horas en un frigorífico a -10°C. La 5-azacitidina resultante se recoge con succión, se lava con metanol y se seca a presión reducida. Rendimiento: 0,216 g (88,6%) de 5-azacitidina. Punto de fusión 232-234°C (con descomposición).

Ejemplo 2.-

Se agita una mezcla de 1-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranodil)-4-metiltio-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona (0,5875 g), una solución al 10% de amoníaco anhidro en metanol (4 ml) y una solución 1 N de metóxido de sodio en metanol (1,2 ml), a temperatura ambiente, en ausencia de humedad atmosférica (un tubo protector lleno



de lentejas de hidróxido potásico), hasta que el compuesto de partida se disuelve (durante 3 minutos). Se deja estar la solución resultante a temperatura ambiente durante 45 minutos (después de 30 minutos el producto comienza a depositarse) y durante 12 horas en un frigorífico a -10°C . Se recogen los cristales, con succión, se lavan con metanol, y se secan a presión reducida. Rendimiento: 0,162 g (66,4%) de 5-azacitidina.

Punto de fusión, $232 - 234^{\circ}\text{C}$ (con descomposición).

10

EJEMPLO 3

Se agita una mezcla de 1-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosil)-4-metoxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona (0,5715 g), metanol absoluto (5 ml) y una solución 1 N de metóxido de sodio en metanol (1 ml.), a temperatura ambiente, en ausencia de humedad atmosférica (tubo protector lleno de lentejas de hidróxido potásico) hasta que el compuesto de partida se disuelve (durante 5 minutos). Se deja estar la mezcla resultante, durante una hora, a temperatura ambiente, y se trata después de manera análoga a la del Ejemplo 1.

15

20

Rendimiento: 0,219 g (89,7%) de 5-azacitidina; Punto de fusión, $232-234^{\circ}\text{C}$ (con descomposición).

25

EJEMPLO 4

Se agita una mezcla de 1-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosil)-4-metoxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona (0,5715 g), una solución al 10% de amoniaco anhidro en metanol (4 ml) y una solución 1 N de metóxido de sodio en metanol (1 ml), a temperatura ambiente, en ausencia

30



de humedad atmosférica (tubo protector lleno de lentejas de hidróxido potásico) hasta que el compuesto de partida se disuelve (durante 5 minutos). La solución resultante se trata a continuación, de manera análoga a la descrita en el Ejemplo 2.

5

Rendimiento: 0,174 g (71,3 %) de 5-azacitidina; Punto de fusión, 232-234°C (con descomposición).

5-Aza-2'desoxicitidina

10

1-(2-Desoxi-β-D-ribofuranosil)-4-amino-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona

EJEMPLO 5

15

Se agita, mediante agitador magnético, una mezcla de 1-(3,5-di-O-p-toluil-2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-4-metiltio-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona (0,4956 g), metanol absoluto (10 ml), y una solución 1 N de metóxido de sodio en metanol (1,2 ml), a temperatura ambiente, en ausencia de humedad atmosférica (un tubo protector lleno de lentejas de hidróxido potásico), durante 2 horas y 45 minutos (después de 2 horas el compuesto de partida se disuelve). Para eliminar los cationes se pasa la solución resultante a través de una columna de una resina de cambio catiónico, débilmente ácida (10 ml) en forma H (previamente lavada con agua y metanol). El efluente metanólico se evapora a presión reducida, a 30°C (temperatura del baño), se disuelve el residuo en metanol (10 ml) y la solución vuelve a evaporarse. La 1-(2-desoxi-β-D-ribofuranosil)-4-metoxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona resultante, cruda, siruposa, se disuelve en una solución al 10% de amoníaco anhidro en metanol (2 ml) y la mezcla de reacción

20

25

30



resultante se deja estar en un matraz tapado, durante 30 minutos a temperatura ambiente (Después de 15 minutos el producto cristalino comienza a separarse) y durante 12 horas en un frigorífico a -10°C . Se recogen los cristales se lavan con metanol y se secan a presión reducida. Rendimiento: 0,180 g (79%) de 5-aza-2'-desoxicitidina, Punto de fusión, $196-198^{\circ}\text{C}$ (resolidificación).

EJEMPLO 6

Se agita magnéticamente una mezcla de 1-(3,5-di-
-0-p-toluil-2-desoxi- β -D-ribofuranosil)-4-metiltio-1,2-
dihidro-1,3,5-triazin-2-ona(0,4956 g), una solución al
10% de amoníaco anhidro en metanol (4ml), y una solución
1 N de metóxido sódico en metanol (1,2 ml), a temperatu-
ra ambiente, en ausencia de humedad atmosférica(tubo pro-
tector lleno con lentejas de hidróxido potásico) hasta
que el compuesto de partida se disuelve (durante 45 mi-
nutos). La solución resultante se deja estar a tempera-
tura ambiente, durante 1 hora (durante este periodo de
tiempo el producto cristalino comienza a separarse) y
después en un frigorífico a -10°C durante otras 12 horas.
Se recogen, con succión, los cristales, se lavan con me-
tanol, y se secan a presión reducida.
Rendimiento: 0,132 g (58 %) de 5-aza-2'-desoxicitidina.
Punto de fusión, $198-199^{\circ}\text{C}$ (resolidificación).

EJEMPLO 7

Se agita magnéticamente, una mezcla de 1-(3,5-
-di-0-p-toluil-2-desoxi- β -D-ribofuranosil)-4-metoxi-1,2-
dihidro-1,3,5-triazin-2-ona(0,4796 g), metanol absoluto
(10 ml), y una solución 1 N de metóxido de sodio en

metanol, a temperatura ambiente, en ausencia de humedad atmosférica (tubo protector lleno de lentejas de hidróxido potásico), hasta que el compuesto de partida se disuelve (durante 45 minutos). La mezcla de reacción se trata después de forma análoga a la descrita en el Ejemplo 6. Rendimiento, 0,120 g (52,7%) de 5-aza-2'-desoxicitidina. Punto de fusión, 198-199°C (resolidificación).

EJEMPLO 8

Se agita magnéticamente, una mezcla de 1-(3,5-dio-4-p-toluil-2-desoxi- β -D-ribofuranosil-4-metoxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona (0,4796 g), una solución al 10% de amoniaco anhidro en metanol (4 ml), y una solución 1 N de metóxido de sodio en metanol, a temperatura ambiente, en ausencia de humedad atmosférica (tubo protector lleno de lentejas de hidróxido potásico) hasta que el compuesto de partida se disuelve (durante 45 minutos). La mezcla de reacción se trata después de manera análoga a la descrita en el Ejemplo 6. Rendimiento, 0,120 g (52,7%) de 5-aza-2'-desoxicitidina. Punto de fusión 198-199°C (Resolidificación).

1- β -D-Ribofuranosil-4-metoxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona

EJEMPLO 9

Se agita una mezcla de 1-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosil)-4-metiltio-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona (0,5875 g), metanol absoluto (5 ml) y una solución 1 N de metóxido de sodio en metanol (1,2 ml), a temperatura ambiente, en ausencia de humedad atmosférica .



(tubo protector lleno de lentejas de hidróxido potásico) hasta que el compuesto de partida se disuelve (5 minutos) Se deja estar la solución resultante, a temperatura ambiente, durante otros 40 minutos más, y se trata de forma análoga a la descrita en el Ejemplo 1. Se recristaliza el producto cristalino, crudo, en metanol absoluto. Rendimiento, 0,210 g (81 %) de 1- β -D-ribofuranosil-4-metoxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona. Punto de fusión, 177-179°C.

1- β -D-Ribofuranosil-4-metilamino-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona

EJEMPLO 10

Se agita una mezcla de 1- β -D-ribofuranosil-4-metoxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona (0,259 g) y una solución al 7% de metilamina anhidra en metanol absoluto (2 ml), a temperatura ambiente, en ausencia de humedad atmosférica (tubo protector lleno de lentejas de hidróxido potásico), durante 5 minutos), se mantiene a temperatura ambiente durante otros 10 minutos mas, y, finalmente, se mantiene en frigorífico a -10°C durante 15 minutos. Se recogen los cristales, con succión, se lavan con metanol enfriado con hielo, y se seca a presión reducida. Rendimiento, 0,210 g (81,4 %) de 1- β -D-ribofuranosil-4-metilamino-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona. Punto de fusión 148-150°C.

1- β -D-Ribofuranosil-4-dimetilamino-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona

EJEMPLO 11

Se agita una mezcla de 1- β -D-ribofuranosil-4-



-metoxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona (0,259 g) y una
solución al 7% de dimetilamina anhidra en metanol absolu-
to (2 ml.), a temperatura ambiente, en ausencia de hume-
dad atmosférica (tubo protector de hidróxido potásico),
5 durante 5 minutos; se mantiene a la misma temperatura du-
rante 15 minutos más, y se evapora a presión reducida, a
30°C (temperatura del baño). El residuo se evapora con-
juntamente con metanol absoluto (5 ml) y finalmente, se
disuelve en etanol absoluto (1 ml). Se enfría el residuo
10 y se agita con una varilla con el extremo aguzado, para
depositar cristales, y se mantiene en un frigorífico a
- 10°C durante la noche. Se recogen los cristales con suc-
ción, se lava con etanol, y se seca a presión reducida.
Rendimiento, 0,216 g (79,4%) de 1- β -D-ribofuranosil-4-
15 -dimetilamino-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona. Punto de
fusión 128-130°C.

La presente solicitud que corresponde a la pre-
sentada en Checoslovaquia, con fecha 8 de Mayo de 1968,
bajo el n° PV 3399-68, se acoge a los beneficios del artí-
20 culo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25

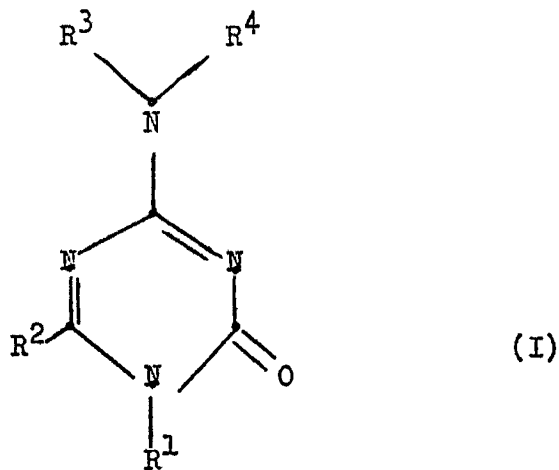
30



REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva, que se
 5 presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente
 de Invención en España por VEINTE años son los siguientes:

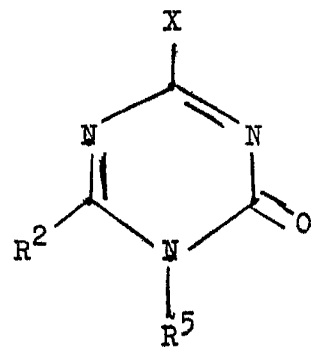
1.- Un procedimiento para preparar 1-glicosil-
 5-azacitosinas, de fórmula general I



20 en la que R¹ designa un residuo glicosílico, R² designa un
 átomo de hidrógeno o un grupo alcohilo que consta de 1 a
 4 átomos de carbono, y R³ y R⁴, idénticos o diferentes, de-
 signan un átomo de hidrógeno o un grupo alcohilo que con-
 25 tiene de 1 a 4 átomos de carbono, o un grupo aralcohilo que
 contiene de 7 a 10 átomos de carbono, cuyo procedimiento
 consiste en hacer reaccionar compuestos de fórmula general
 II

30

5



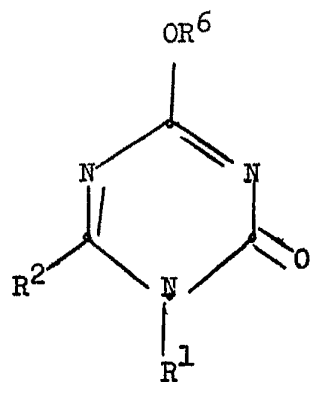
(II)

10

en la que R² tiene el mismo significado que en la fórmula I, R⁵ designa un residuo per-acilglicosílico, estando constituido el grupo acilo por 2 a 10 átomos de carbono, y X designa un grupo alcoxi o alcoholitio con 1 a 4 átomos de carbono, un alcóxido de metal alcalino, que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, en el seno de un alcohol que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, preferentemente en metanol, con lo que se forman 1-glicosil-4-alcoxi-1,2-dihidro-1,3,5-triazin-2-onas, de fórmula general III

15

20



(III)

25

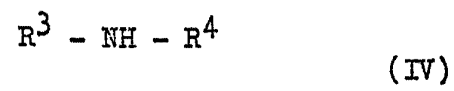
30

en la que R¹ y R² tienen el mismo significado que en la fórmula I, y R⁶ designa un grupo alcoholilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono, y tratar los compuestos III, en



el seno de un alcanol que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, preferentemente metanol, con un compuesto de fórmula general IV

5



en cuya fórmula R³ y R⁴ tienen el mismo significado que en la fórmula I.

2.- Un procedimiento para preparar 1-glicosil-5azacitosinas.

10

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de dieciseis hojas escritas a máquina por una sola cara.

15

Madrid, 22 MAY. 1969
P.A.

Alberto de Elizaburu
For Pouch
Alta