

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 877 103**

51 Int. Cl.:

C07H 19/12 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013** **PCT/US2013/032593**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14143051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013** **E 13878435 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021** **EP 2970359**

54 Título: **Análogos de pirimidina fluorados y métodos de uso de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.11.2021

73 Titular/es:

EPIGENETICS PHARMA LLC (100.0%)
9270 Southeast 36th Place
Mercer Island WA 98040, US

72 Inventor/es:

DAIFUKU, RICHARD;
GALL, ANNA STANISLAV y
SERGUEEV, DMITRI S.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 877 103 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

Análogos de pirimidina fluorados y métodos de uso de los mismos

Antecedentes de la invención

La metilación aberrante del ADN es un mecanismo epigenético que puede inactivar la expresión de genes que suprimen la tumorigénesis. Los genes implicados incluyen los genes supresores de tumores; genes que suprimen la apoptosis, la metástasis y la angiogénesis; genes que reparan el ADN; y genes que expresan antígenos asociados a tumores. El mecanismo molecular de silenciar la expresión génica parece deberse a la fijación de las proteínas que se unen a 5-metilcitosina al promotor metilado, el cual bloquea la acción de los factores de transcripción (véase la FIGURA 1).

Dado que este cambio epigenético es reversible, presenta un objetivo interesante para una intervención quimioterapéutica. La 5-azacitidina fue el primer agente hipometilante aprobado por la FDA para el tratamiento de una neoplasia y el análogo desoxi, 5-azadesoxicitidina o decitabina, ha sido aprobado más recientemente para la misma indicación (véase la FIGURA 2). Ambos fármacos producen remisiones o mejorías clínicas en más de la mitad de los pacientes tratados con síndrome mielodisplásico (SMD). Las características de las respuestas incluyen el requisito de múltiples ciclos de terapia, respuestas lentas y eliminación clonal real. Una optimización de la terapia ha incluido (1) reducir la dosis para favorecer la hipometilación sobre la citotoxicidad, (2) prolongar las pautas de administración y (3) aumentar la intensidad de la dosis sin alcanzar una citotoxicidad. Molecularmente, se ha mostrado una hipometilación y reactivación de los genes y parece que son necesarias para las respuestas. Los datos en el SMD representan una prueba de principio para la terapia epigenética. Aunque la terapia es eficaz, con respuestas completas que duran de meses a años en algunos pacientes, parece que se desarrolla resistencia en la mayoría de los pacientes y se desconocen los mecanismos de la resistencia.

Los datos procedentes de los dos fármacos aprobados actualmente sugieren que las neoplasias mieloides son las neoplasias más sensibles frente a los inhibidores de la metilación del ADN. Sin embargo, no se conoce ninguna razón de por qué los tumores sólidos no responden tan bien. Recientemente, estudios preclínicos con inhibidores de la metiltransferasa de ADN (DNMTIs) han demostrado que también son potentes agentes angiostáticos, que inhiben las células endoteliales tumorales y la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*, lo que se suma a la justificación del tratamiento de tumores sólidos con estos agentes.

Se sabe que la 5-azacitidina y la decitabina son inestables en agua, con escisión de la base en la posición 6 del anillo de citosina (véase la FIGURA 3, IIIa). Se sabe que ambos nucleósidos tienen una semivida corta. Se ha descrito que la semivida de la 5-azacitidina después de una administración subcutánea es de 41 minutos y la de la decitabina de 30 minutos. Ambos fármacos son buenos sustratos para la citidina desaminasa y la semivida corta se debe principalmente a una desaminación de la base para formar uracilo inactivo.

La gemcitabina se diferencia de la citidina por un azúcar difluorado en la posición 2'. Véase la FIGURA 4.

El efecto citotóxico de la gemcitabina se atribuye a una combinación de dos acciones de los nucleósidos difosfato y trifosfato, lo que conduce a una inhibición de la síntesis de ADN. En primer lugar, el difosfato de gemcitabina inhibe la ribonucleótido reductasa, que es responsable de catalizar las reacciones que generan los desoxinucleósidos trifosfatos para la síntesis de ADN. La inhibición de esta enzima a través del nucleósido difosfato provoca una reducción de las concentraciones de desoxinucleótidos, incluido el dCTP. En segundo lugar, el trifosfato de gemcitabina compite con la dCTP por la incorporación en el ADN. La reducción de la concentración intracelular de dCTP (por la acción del difosfato) potencia la incorporación de trifosfato de gemcitabina en el ADN (autopotenciación). Después de que el nucleótido de gemcitabina se incorpora en el ADN, solo se añade un nucleótido adicional a las cadenas de ADN en crecimiento. Después de esa adición, se inhibe la síntesis de ADN adicional. La ADN polimerasa épsilon no puede eliminar el nucleótido de gemcitabina y reparar las hebras de ADN en crecimiento (terminación de cadena enmascarada).

Existe una necesidad de nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer con eficacia, seguridad y/o perfiles farmacocinéticos mejorados. Por ejemplo, el documento WO 2006/063111 describe formulaciones farmacéuticas de análogos y derivados de citidina, tales como la 5-azacitidina, pero no muestra ningún uso terapéutico de las formulaciones en el tratamiento de una enfermedad o trastorno. El documento WO 2008/028193 describe una formulación oral de un análogo de citidina, que incluye 5-azacitidina, pero no proporciona ningún dato que muestre enfermedades o trastornos que se pueden tratar con las composiciones ejemplificadas. El documento WO 2012/106299 describe composiciones farmacéuticas que comprenden análogos de citidina para una administración parenteral, pero no proporciona ningún dato que muestre usos terapéuticos de las composiciones en el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

La invención proporciona nuevos análogos de pirimidina fluorados y composiciones para el tratamiento del cáncer.

Compendio de la invención

En un aspecto, la invención proporciona análogos de pirimidina fluorados.

En una realización, la invención proporciona 2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina, sus anómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento de un carcinoma de tumor sólido o de una neoplasia maligna hematológica, tal y como se indica en la reivindicación 1 o 3.

- 5 En otra realización, la invención proporciona 2',2'-difluoro-5,6-dihidro-5-azadesoxicitidina, sus anómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables, tal y como se indica en la reivindicación 6.

En una realización adicional, la invención proporciona 2'-desoxi-2',2'-difluorozebularina, sus anómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables, tal y como se indica en la reivindicación 10 y su uso en el tratamiento de un carcinoma de tumor sólido o de una neoplasia maligna hematológica tal y como se indica en la reivindicación 12.

- 10 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que tiene las características de la reivindicación 7 u 11.

El sujeto puede ser un sujeto humano.

Breve descripción de los dibujos

- 15 La FIGURA 1 es una ilustración esquemática de una sobreexpresión de la metil transferasa de ADN (DNMT), tal y como ocurre en las células cancerosas, que puede conducir a una hipermetilación e inactivación de los promotores de la supresión tumoral y de los genes reguladores del crecimiento.

La FIGURA 2 ilustra las estructuras químicas de la 5-azacitidina y decitabina.

La FIGURA 3 ilustra las rutas de la reacción para la apertura del anillo y la hidrólisis del residuo de 5-azacitosina en el ADN en solución (a) y después de un enlace covalente con el sitio activo de una DNMT (b).

- 20 La FIGURA 4 ilustra la estructura química de la gemcitabina HCl.

La FIGURA 5 ilustra la estructura química de la 2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (NUC013).

La FIGURA 6 compara la inhibición de la DNMT en células de cáncer de colon (HCT116) de NUC013 y 5-azacitidina.

La FIGURA 7 compara la actividad de NUC013 y decitabina (DAC) sobre la línea celular de leucemia THP-1.

La FIGURA 8 compara la actividad de NUC013 y decitabina (DAC) sobre la línea celular de leucemia Kasumi-1.

- 25 La FIGURA 9 ilustra una transferencia Western que compara la actividad inhibidora frente a DNMT1 de la decitabina y NUC013 en las líneas celulares THP-1 y Kasumi-1.

La FIGURA 10 compara una tinción de Giemsa de las células THP-1 tratadas con decitabina o NUC013 en comparación con un control de vehículo.

- 30 La FIGURA 11 compara una tinción de Giemsa de las células Kasumi-1 tratadas con decitabina o NUC013 en comparación con un control de vehículo.

La FIGURA 12 ilustra la estructura química de la 2',2'-difluoro-5,6-dihidro-5-azadesoxicitidina (NUC014).

La FIGURA 13 ilustra la estructura química de la 2'-desoxi-2',2'-difluorozebularina (NUC019).

Descripción detallada de la invención

- 35 La presente invención proporciona compuestos de fármacos terapéuticos que son útiles en el tratamiento del cáncer. Los compuestos de fármacos terapéuticos de la invención son análogos de pirimidina fluorados. La presente invención también proporciona composiciones que incluyen los análogos de pirimidina fluorados, métodos para preparar los análogos de pirimidina fluorados y métodos para tratar el cáncer usando los análogos de pirimidina fluorados.

Los compuestos de fármacos terapéuticos son una familia de los inhibidores de la metiltransferasa de ADN (DNMTIs) que sustituyen el azúcar natural por el resto de azúcar de la gemcitabina.

- 40 En un aspecto, la presente invención proporciona análogos de pirimidina fluorados. Los análogos de pirimidina fluorados representativos de la invención incluyen:

2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (denominada en el presente documento "NUC013");

2',2'-difluoro-5,6-dihidro-5-azadesoxicitidina (denominada en el presente documento "NUC014"); y

2'-desoxi-2',2'-difluorozebularina (denominada en el presente documento "NUC019").

En una realización, la invención proporciona 2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina, sus anómeros (α y β) y sus sales.

En otra realización, la invención proporciona 2',2'-difluoro-5,6-dihidro-5-azadesoxicitidina, sus anómeros (α y β) y sus sales.

5 En una realización adicional, la invención proporciona 2'-desoxi-2',2'-difluorozebularina, sus anómeros (α y β) y sus sales.

10 Las sales adecuadas incluyen sales farmacéuticamente aceptables. Las sales representativas incluyen sales acetato, adipato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato (besilato), bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, propionato de ciclopentano, digluconato, dodecilsulfato, disulfonato de 1,2-etano (edisilato), etanosulfonato (esilato), formiato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodohidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato (mesilato), 2-naftalenosulfonato (napsilato), nicotinato, nitrato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un análogo de pirimidina fluorado de la invención junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, adecuado para la administración a un sujeto humano o animal, ya sea solo o junto con otros agentes terapéuticos y/o anticancerígenos. Los análogos de pirimidina fluorados de la invención se pueden formular en una composición que además comprende vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados, que incluyen excipientes y otros compuestos que facilitan la administración de los análogos de pirimidina fluorados a un sujeto mamífero. Las composiciones farmacéuticas son útiles para la administración de análogos de pirimidina fluorados para tratar el cáncer.

20 Las composiciones que incluyen uno o varios análogos de pirimidina fluorados de la invención se administran para suministrar cantidades terapéuticamente eficaces del análogo de pirimidina fluorado. Las cantidades terapéuticamente eficaces del o de los análogos de pirimidina fluorados oscilarán generalmente hasta la dosificación máxima tolerada, pero las concentraciones no son decisivas y pueden variar ampliamente. Las cantidades precisas empleadas por el médico tratante variarán, por supuesto, dependiendo del compuesto, la vía de administración, el estado físico del paciente y otros factores. La dosificación diaria se puede administrar como una dosificación única o se puede dividir en múltiples dosis para administración. La administración de los análogos de pirimidina fluorados de la invención se realiza mediante cualquier vía eficaz, por ejemplo, por vía parenteral u oral.

25 La cantidad de los análogos de pirimidina fluorados de la invención que se administra realmente será una cantidad terapéuticamente eficaz, término que se utiliza en este documento para indicar la cantidad necesaria para producir un efecto beneficioso sustancial. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas de respuesta frente a dosis obtenidas a partir de sistemas de ensayo en modelos animales o *in vitro*. El modelo animal también se usa normalmente para determinar un intervalo de dosificación y una vía de administración deseables. A continuación, esa información se puede usar para determinar dosis y rutas útiles para la administración en seres humanos u otros mamíferos. La determinación de una dosis eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Por tanto, la cantidad realmente administrada dependerá del individuo al que se va a aplicar el tratamiento, y será preferiblemente una cantidad optimizada, de modo que se logre el efecto deseado sin efectos secundarios significativos.

30 En otro aspecto de la invención, se proporcionan métodos para preparar los análogos de pirimidina fluorados. La preparación de 2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (NUC013) se proporciona en el EJEMPLO 1. La preparación de 2',2'-difluoro-5,6-dihidro-5-azadesoxicitidina (NUC014) se proporciona en el EJEMPLO 2. En el EJEMPLO 3 se proporciona la preparación de 2',2'-difluorozebularina (NUC019).

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar sujetos humanos o animales que padecen una enfermedad proliferativa celular, tal como el cáncer, usando los compuestos fluorados de la invención. Las enfermedades proliferativas celulares representativas tratables con los compuestos de la invención, incluyen cánceres hematológicos, como leucemia, linfoma y mieloma, y cánceres no hematológicos, como carcinomas de tumores sólidos (por ejemplo, de mama, ovario, páncreas, colon, colorrectal, pulmón de células no pequeñas, renal y de vejiga), sarcomas y gliomas. La presente invención proporciona métodos para tratar a un sujeto humano o animal que necesita ese tratamiento, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios análogos de pirimidina fluorados de la invención, ya sea solos o en combinación con uno o varios otros agentes terapéuticos y/o anticancerígenos.

40 Compuestos de pirimidina fluorados representativos

La razón principal para el desarrollo de esta familia de moléculas se basa en el mecanismo de autopotenciación observado con gemcitabina, aunque estas moléculas pueden presentar otras características interesantes.

45 NUC013. 2',2'-Difluoro-5-azadesoxicitidina (NUC013) (véase la FIGURA 5) es un nuevo análogo de citidina, relacionado con la 5-azacitidina y la decitabina, por lo que produce metabolitos conocidos. Tener metabolitos conocidos facilita el desarrollo clínico al disminuir el riesgo de toxicidades imprevistas. Por ejemplo, la toxicidad de los metabolitos ha complicado el desarrollo clínico de la 5-fluorodesoxicitidina como un DNMTI.

Se ha examinado la actividad de NUC013 en líneas celulares y se ha comparado con la 5-azacitidina y la decitabina. Véase la Tabla 1.

Tabla 1. Citotoxicidad *in vitro* de NUC013 en comparación con decitabina y 5-azacitidina.

Compuesto	MDA-MB-231 de mama (μM)	NCI-H460 de NSCL (μM)	HCT-116 de colon (μM)	L1210 de leucemia (μM)	HACN* renal (μM)	OVCAR-8* de ovario (μM)	P388* de leucemia (μM)
Decitabina	>62,5	13-44	>62,5	0,24	>1000	>1000	0,0004
Azacitidina	1,64	0,43	0,62	1,7-2,4	2,51	6,38	0,74
NUC013	>62,5	4,39	4,54	1,02	0,89	25,88	0,48

- 5 Como se puede ver en la Tabla 1, la citotoxicidad de NUC013 contra varias líneas de células tumorales, tanto de tumores sólidos como hematológicos, tiene un perfil único. NUC013 es activa contra líneas celulares que son resistentes a la decitabina, particularmente líneas celulares de tumores sólidos.

- 10 NUC013 también se ha sometido a ensayo para determinar la inhibición de la metiltransferasa de ADN (véase la FIGURA 6). En las células de cáncer de colon, NUC013 es aproximadamente 10 veces más potente que la 5-azacitina como DNMTI. Sin embargo, dado que la 5-azacitidina es más citotóxica que NUC013 en esa línea celular (GI_{50} de 0,62 μM frente a 4,54 μM , respectivamente), es posible lograr una inhibición sustancial de DNMT con concentraciones de fármaco que son menos citotóxicas con NUC013 que en comparación con 5-azacitidina.

- 15 La FIGURA 7 compara la actividad de NUC013 con la de decitabina en las líneas celulares de leucemia THP-1 y Kasumi-1. La FIGURA 8 compara la actividad de NUC013 y decitabina (DAC) en la línea celular de leucemia Kasumi-1. NUC013 mostraba un efecto inhibidor más fuerte sobre el crecimiento de las células de leucemia THP-1 que la decitabina, pero un efecto ligeramente más débil en las células Kasumi-1 a concentraciones equimolares. La FIGURA 9 ilustra una transferencia Western que compara la actividad inhibidora contra DNMTI de decitabina y NUC013 en las líneas celulares THP-1 y Kasumi-1.

- 20 En comparaciones con decitabina, el agotamiento de DNMTI mediante NUC013 parece estar relacionado con la citorreducción demostrada en las FIGURAS 5 y 6. De hecho, en las dos concentraciones sometidas a ensayo en la FIGURA 7, NUC013 demuestra una inhibición de DNMT similar mediante transferencia Western que en comparación con la decitabina equimolar en las células THP-1, aunque demuestra una citorreducción más fuerte, pero tiene una inhibición DNMTI más débil en las células Kasumi-1 que se correlaciona con una citorreducción más débil. Estos datos confirman además que NUC013 es un inhibidor de DNMT.

- 25 La FIGURA 10 compara una tinción de Giemsa de células THP-1 tratadas con decitabina o NUC013, en comparación con el control de vehículo. La FIGURA 11 compara una tinción de Giemsa de células Kasumi-1 tratadas con decitabina o NUC013, en comparación con el control de vehículo.

- 30 Como se demuestra en las FIGURAS 8 y 9, el tratamiento de las células THP-1 o Kasumi-1 con NUC013 o decitabina da como resultado unos cambios morfológicos que sugieren una diferenciación celular, con mayores efectos observados para el tratamiento con NUC013 de las células THP-1 que Kasumi-1, lo que es compatible con una mayor inhibición DNMTI en las células THP-1.

- La preparación de 2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (NUC013) se describe en el Ejemplo 1. La citotoxicidad *in vitro* de NUC013 (cáncer de pulmón de células no pequeñas, colorrectal, leucemia y cáncer de mama) se describe en el Ejemplo 4. La inhibición de la metiltransferasa de ADN *in vitro* de NUC013 se describe en el Ejemplo 5.

- 35 NUC014. NUC014 es el derivado 5,6-dihidro de NUC013. La FIGURA 12 ilustra la estructura química de 2',2'-difluoro-5,6-dihidro-5-azadesoxicitidina (NUC014). Se ha encontrado que es estable en un entorno acuoso y no sufre una escisión hidrolítica en la posición 6 de la citosina. La citotoxicidad *in vitro* representativa de NUC014 se resume en la Tabla 2.

Tabla 2. Citotoxicidad *in vitro* de NUC014

Compuesto	MDA-MB-231 de mama (μM)	NCI-H460 de NSCL (μM)	HCT-116 de colon (μM)	L1210 de leucemia (μM)
NUC014	>31,25	>31,25	>31,25	90,58

NUC014 demuestra una citotoxicidad moderada contra la línea celular de leucemia L1210. Basándose en los datos disponibles que muestran una menor citotoxicidad para la 5,6-dihidro-5-aza-2'-desoxicitidina (DHADC) en comparación con la decitabina, no es sorprendente que NUC014 también sea menos citotóxico que NUC013.

La preparación de 2',2'-difluoro-5,6-dihidro-5-azadesoxicitidina (NUC014) se describe en el Ejemplo 2.

- 5 NUC019 y NUC020. NUC019 es un derivado de la zebularina. La FIGURA 13 ilustra la estructura química de la 2'-desoxi-2',2'-difluorozebularina (NUC019). La citotoxicidad *in vitro* representativa de zebularina y de los derivados de zebularina, NUC019 y su análogo α NUC020, se resume en la Tabla 3.

Tabla 3. Citotoxicidad *in vitro* de zebularina y de los derivados de zebularina

Compuesto	MDA-MB-231 de mama (μ M)	NCI-H460 de NSCL (μ M)	HCT-116 de colon (μ M)	L1210 de leucemia (μ M)
Zebularina	143,92	99,08	47,88	108,27
NUC019	165,90	135,65	310,26	320,95
NUC020	212,92	135,94	278,69	346,21

- 10 La preparación de 2'-desoxi-2',2'-difluorozebularina (NUC019) se describe en el Ejemplo 3. La citotoxicidad *in vitro* de NUC019 (cáncer de pulmón de células no pequeñas, colorrectal, leucemia y cáncer de mama) se describe en el Ejemplo 4.

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de ilustrar, no de limitar, la invención.

Ejemplo 1

- 15 Preparación de 2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (NUC013)

Se usaron dos rutas alternativas, que se muestran en el Esquema I, para preparar 2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto IV) (NUC013).

A. Preparación de 3',5'-dibenzoil-2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto III) a través de 1-bromo-2-desoxi-2,2'-difluoro-D-ribofuranosil-3,5-dibenzoato (Compuesto I).

- 20 (1) El material de partida 2-desoxi-2,2'-difluoro-D-ribofuranosil-3,5-dibenzoato conocido en la técnica (Chou, et. al., Synthesis 1992, v.p.565-570) se convirtió en análogo 1-bromo mediante un método similar al descrito en el documento de Solicitud de Patente Internacional WO 2006/070985. La ribosa de partida (3,9 g, 10,3 mmol) se disolvió en 31 ml de tolueno y se añadió trietilamina seca (1,43 ml, 10,3 mmol). La solución se enfrió a 0°C y se añadió cloruro de difenilfosforilo (2,64 ml, 12,3 mmol) en 8 ml de tolueno durante 15 min. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se incubó durante 3,5 horas. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 M (10,2 ml), la capa de tolueno se separó y la capa acuosa se extrajo de nuevo con 10 ml de éter. Las capas orgánicas se agruparon, se extrajeron posteriormente con agua, NaHCO₃ saturado y NaCl saturado (20 ml de cada uno) y se secaron sobre MgSO₄. Los disolventes se eliminaron y el producto se aisló mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en gradiente de hexano-acetato de etilo. Rendimiento de 4,6 g, 73%.

- 30 (2) Al análogo difenilfosfato intermedio (4,6 g, 7,5 mmol) preparado como se ha descrito en la etapa (1), se añadió HBr en ácido acético (30%, 16,2 ml, 81,3 mmol) y la mezcla de reacción se incubó durante 6,5 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con 80 ml de cloruro de metileno y se extrajo dos veces con agua helada, NaHCO₃ saturado y NaCl saturado (100 ml de cada uno). La capa orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó para producir 1-bromo-2-desoxi-2,2'-difluoro-D-ribofuranosil-3,5-dibenzoato (Compuesto I, 3,1 g, 93%), que es una mezcla 9:1 de isómeros α y β .

- 40 (3) 5-Azacitosina (98%, Aldrich, 5,0 g, 44,8 mmol) y sulfato de amonio (25 mg) se suspendieron en hexametildisilazano (25 ml) y se añadió clorotrimetilsilano (0,2 ml). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 17 h. La solución transparente se enfrió, se evaporó, se evaporó dos veces conjuntamente con xileno seco y se secó al vacío para producir sólidos blanquecinos de la 5-azacitosina sililada (~7 g) que se usó en su totalidad para la siguiente etapa de glicosilación.

- 45 (4) Para la etapa de glicosilación, 1-bromo-2-desoxi-2,2'-difluoro-D-ribofuranosil-3,5-dibenzoato (Compuesto I) (0,78 g, 1,77 mmol), preparado como se ha descrito en la etapa (2), se disolvió en 4 ml de anisol y se transfirió a los sólidos de 5-azacitosina sililados preparados como en la etapa (3). La suspensión se calentó a 150°C y se añadieron 2 ml de anisol para completar la disolución de todos los sólidos. Después de 4 horas, la mezcla de reacción se enfrió y se añadió SnCl₄ (0,2 ml, 2 mmol). La mezcla de reacción se recalentó a 150°C durante 6 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se inactivó mediante la adición de cloruro de metileno (30 ml), metanol (10 ml) y gel de sílice (20 g) y se secó para obtener 3',5'-dibenzoil-2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto III). El polvo resultante se aplicó en la

parte superior de la columna de gel de sílice empaquetada y los productos se aislaron mediante cromatografía ultrarrápida en gradiente de cloroformo-metanol. Primero eluyó el isómero β seguido del isómero α (solo se logró una separación parcial, rendimiento del isómero β del 12%, del isómero α del 5%). Una separación de isómeros completa se logró mediante RP HPLC sobre Gemini C18 5u (columna de 21,2 x 250 mm) en gradiente de acetato de trietilamonio 50 mM (pH 7,5)-acetonitrilo.

^1H RMN en CDCl_3 para el isómero β del compuesto III: 8,12 ppm (s, 1H, H6), 7,8-8,1 (m, 4H, benzoílo), 7,4-7,6 (m, 2H, benzoílo), 7,2-7,4 (m, 4H, benzoílo), 6,38 (br.t, J = 8,0 Hz, 1H, H1'), 5,65 (m, 1H, H3'), 4,70 (m, 2H, H5'), 4,58 (m, 1H, H4'). ESI MS: 473,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 471,1 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

B. Preparación de 2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto IV). 3',5'-Dibenzoil-2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto III) (15 mg, mezcla 3:1 de los isómeros α y β), preparada como en la etapa A, se disolvió en 2 ml de MeOH anhidro y se añadió NaOMe 1 M en MeOH (0,1 ml). Después de 1 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó y los isómeros desprotegidos se aislaron mediante RP HPLC sobre Gemini C18 5u (columna de 21,2 x 250 mm) en gradiente de acetato de trietilamonio 50 mM (pH 7,5)-acetonitrilo. Inmediatamente después de la separación, las fracciones correspondientes al isómero β se reunieron y se evaporaron a menos de 10°C para obtener 0,4 mg (19%) de 2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto IV).

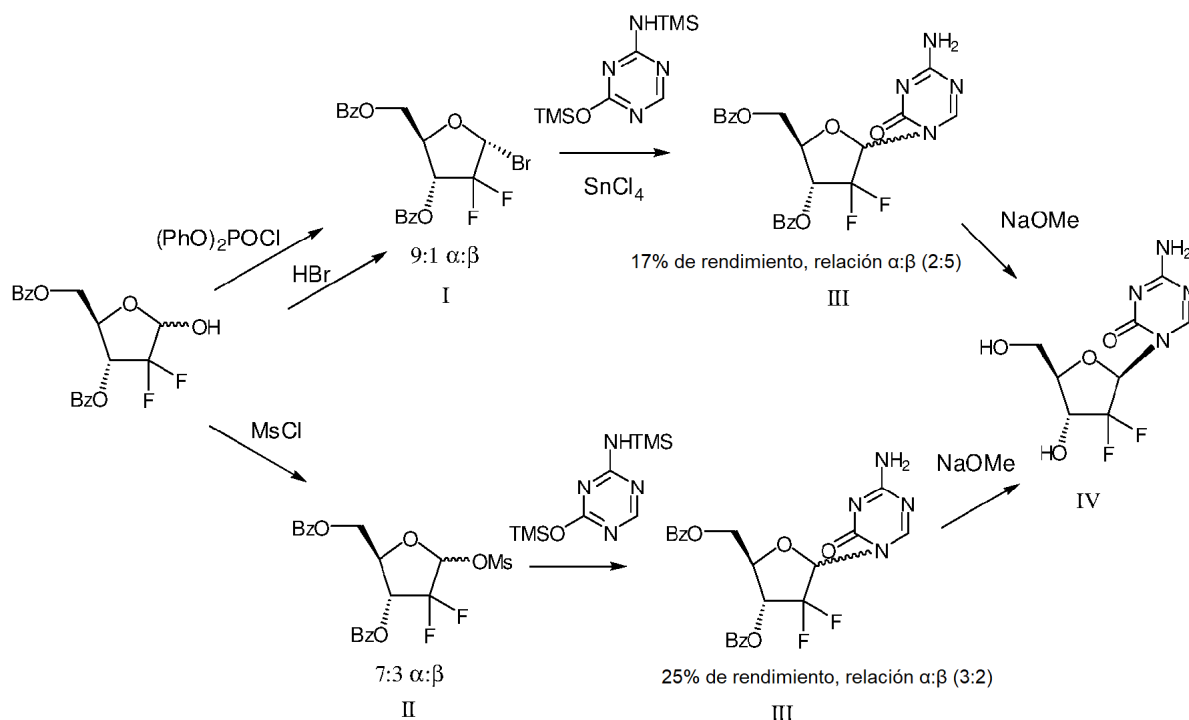
^1H RMN en $\text{DMSO}-d_6$ para el isómero β del compuesto IV: 8,48 ppm (s, 1H, H6), 7,79 (br, 2H, NH_2), 6,35 (br, 1H, 3'-OH), 6,07 t, J=8,0 Hz, 1H, H1'), 5,30 (br, 1H, 5'-OH), 4,90 (br, 1H, 5'-OH), 4,23 (br, m, 1H, H3'), 3,85 (m, 1H, H4'), 3,78 (m, 1H, H5'), 3,63 (m, 1H, H5'), UV 240 nm (sh) en acetato de trietilamonio 50 mM (pH 7,5).

C. Preparación de 3',5'-dibenzoil-2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto III) a través de 1-metilsulfonil-2-desoxi-2,2'-difluoro-D-ribofuranosil-3,5-dibenzoato (Compuesto II).

Se disolvió 5-azacitosina sililada (2,3 g, 9 mmol) preparada como se ha descrito en la etapa A (3), en 2 ml de anisol a 130°C. 1-Metilsulfonil-2-desoxi-2,2'-difluoro-D-ribofuranosil-3,5-dibenzoato (Compuesto II) (0,4 g, 0,87 mmol), preparado como se describe en la técnica (Chou, et. al., *Synthesis* v.p. 565-570, 1992), se disolvió en 1 ml de anisol y se añadió a la solución caliente de 5-azacitosina sililada. La mezcla de reacción se incubó a 150°C durante 7 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se inactivó mediante la adición de 15 ml de cloruro de metileno, 15 g de gel de sílice y 5 ml de metanol y la suspensión se secó al vacío. El polvo resultante se aplicó en la parte superior de la columna de gel de sílice empaquetada y los productos se aislaron mediante cromatografía ultrarrápida en gradiente de cloroformo-metanol. Se agruparon las fracciones apropiadas y se evaporaron para obtener 3',5'-dibenzoil-2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto III) como una mezcla 2:1 de los isómeros α y β (100 mg, rendimiento del 25%).

D. Preparación de 2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto IV). 3',5'-dibenzoil-2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto III) (80 mg, mezcla 2:1 de los isómeros α y β), preparada como en la etapa C, se disolvió en 2 ml de MeOH anhidro y se añadió NaOMe 1 M en MeOH (0,1 ml). Después de 1 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó y los isómeros desprotegidos se aislaron mediante RP HPLC sobre Gemini C18 5u (columna de 21,2 x 250 mm) en gradiente de acetato de trietilamonio 50 mM (pH 7,5)-acetonitrilo. Inmediatamente después de la separación, se reunieron las fracciones correspondientes al isómero β , se evaporaron por debajo de 10°C para obtener 2,1 mg (13%) de 2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto IV).

El tiempo de retención de la RP HPLC y las características espectrales (es decir, ^1H RMN y UV) para el Compuesto IV eran los mismos que en la etapa B. ESI MS: 265,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



Ms = metilsulfonilo; TMS = trimetilsililo; Bz = benzoilo; Ph = fenilo; Me = metilo

Esquema 1. Síntesis de 3',5'-dibenzoil-2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto III) y 2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto IV) (NUC013).

5 EJEMPLO 2

Preparación de 2',2'-difluoro-5,6-dihidro-5-azadesoxicitidina (NUC014)

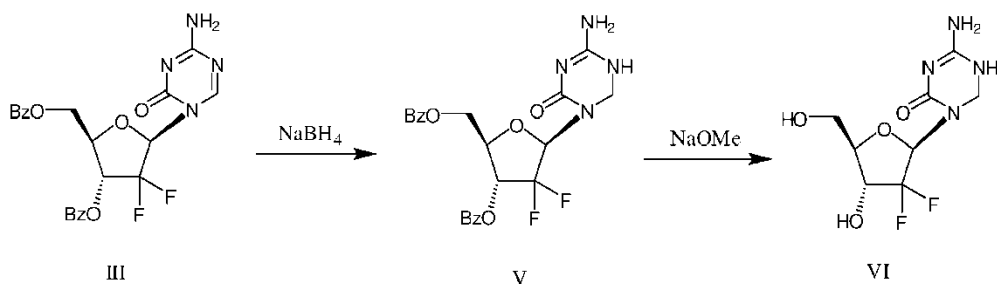
La preparación de 2',2'-difluoro-5,6-dihidro-5-azadesoxicitidina (Compuesto VI) (NUC014) se muestra en el Esquema 2.

- 10 A. Preparación de 3',5'-dibenzoil-2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto V). El isómero β puro de 3',5'-dibenzoil-2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto III) (144 mg, 0,30 mmol), preparado como en el Ejemplo 1, se disolvió en 3 ml de cloruro de metileno y se añadió trietilamina (0,12 ml) y clorotrimetilsilano (0,1 ml). Después de 0,5 horas, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de ácido acético y se añadió borohidruro de sodio (100 mg, 2,6 mmol) en forma de polvo. Después de 1 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó y se separó mediante RP HPLC sobre Gemini C18 5u (columna de 21,2 x 250 mm) en gradiente de acetato de trietilamonio 50 mM (pH 7,5)-acetonitrilo.
- 15 Las fracciones correspondientes al producto se agruparon y evaporaron para obtener 83 mg (57%) de 3',5'-dibenzoil-2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto V).

^1H RMN en DMSO- d_6 para el isómero β del compuesto V: 7,93-8,07 (m, 4H, benzoilo), 7,64-7,77 (m, 2H, benzoilo), 7,47-7,62 (m, 4H, benzoilo), 6,08 (t, $J=7,2$ Hz, 1H, $\text{H}1'$), 5,63 (m, 1H, $\text{H}3'$), 4,55-4,70 (m, 3H, $\text{H}4'$ y $\text{H}5'$), 4,48 (s, 2H, CH_2), ESI MS: 475,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

- 20 B. Preparación de 2',2'-difluoro-5,6-dihidro-5-azadesoxicitidina (Compuesto VI). 3',5'-dibenzoil-2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (Compuesto V) (80 mg, 0,168 mmol), preparado como en la etapa A, se disolvió en 6 ml de MeOH anhidro y NaOMe 1 M en MeOH (0,3 ml). Después de 1 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de ácido acético (0,02 ml), se evaporó y el producto desprotegido se aisló mediante RP HPLC sobre Gemini C18 5u (columna de 21,2 x 250 mm) en gradiente de acetato de trietilamonio 50 mM (pH 7,5)-acetonitrilo.
- 25 Se agruparon las fracciones apropiadas y se evaporaron para obtener 49 mg (rendimiento del 95%) de 2',2'-difluoro-5,6-dihidro-5-azadesoxicitidina (Compuesto VI).

^1H RMN en DMSO- d_6 para el compuesto VI: 5,87 (dd, $J_1=9,6$ Hz, $J_2=10,8$ Hz, 1H, $\text{H}1'$), 4,51 and 4,29 (AB, 2H, CH_2), 3,98 (ddd, $J_1=8,4$ Hz, $J_2=12,8$ Hz, $J_3=12,8$ Hz, 1H, $\text{H}3'$), 3,67 (m, 1H, $\text{H}5'$), 3,58 (m, 1H, $\text{H}4'$), 3,52 (m, 1H, $\text{H}5'$), ESI MS: 267,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



Esquema 2. Síntesis de 2',2'-difluoro-5,6-dihidro-5-azadesoxicitidina (Compuesto IV) (NUC014).

EJEMPLO 3

Preparación de 2'-desoxi-2',2'-difluorozebularina (NUC019)

5 La preparación de 2'-desoxi-2',2'-difluorozebularina (Compuesto VIII) (NUC019) se muestra en el Esquema 3.

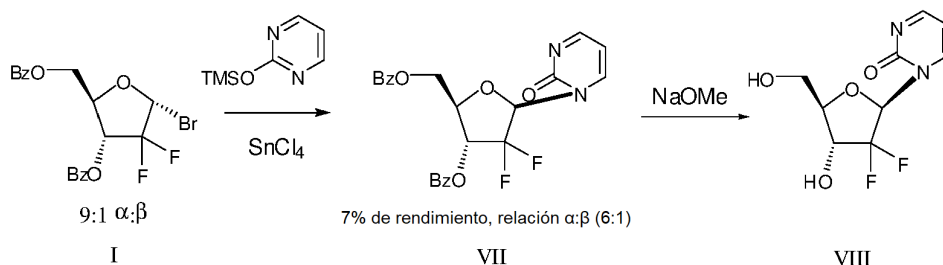
(1) El material de partida 1-bromo-2-desoxi-2,2-difluoro-D-ribofuranosil-3,5-dibenzoato (Compuesto I) se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 1.

10 (2) Se suspendió clorhidrato de 2-hidroxipirimidina (0,57 g, 4,3 mmol) en hexametildisilazano (10 ml). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1,5 h. La solución clara se decantó bajo atmósfera de argón, se evaporó, se coevaporó dos veces con xileno seco y se secó al vacío.

15 (3) Para la etapa de glicosilación, 1-bromo-2-desoxi-2,2-difluoro-D-ribofuranosil-3,5-dibenzoato (Compuesto I) (1,20 g, 2,7 mmol), preparado como en la etapa (1), se disolvió en 20 ml de dicloroetano y se transfirió al matraz que contenía la 2-hidroxipirimidina sililada. La mezcla de reacción se calentó a reflujo bajo atmósfera de argón durante 16 h, luego se reemplazó el dicloroetano con 10 ml de anisól y la temperatura se elevó a 150°C. La mezcla de reacción se agitó a 150°C durante 18 h, se enfrió a temperatura ambiente y el producto, 1-β-(2'-desoxi-2',2'-difluoro-D-ribofuranosil)-pirimidin-2-ona (Compuesto VII), se aisló como una mezcla de isómeros β y α (1:6) mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice en metanol/cloroformo (3:97). Rendimiento: 0,09 g o 7%.

20 (4) 1-β-(2'-Desoxi-2',2'-difluoro-D-ribofuranosil)-pirimidin-2-ona (Compuesto VII), preparada como en las etapas (1) a (3), (85 mg, mezcla 6:1 de los isómeros α y β) se disolvió en 2 ml de MeOH anhidro y se añadió NaOMe 1 M en MeOH (0,1 ml). Después de 1 h a 4°C, la mezcla de reacción se evaporó y los isómeros desprotegidos se aislaron mediante RP HPLC sobre Gemini C18 5u (columna de 21,2 x 250 mm) en gradiente de acetato de trietilamonio 50 mM (pH 7,5)-acetonitrilo. Inmediatamente después de la separación, las fracciones correspondientes al isómero β se agruparon y se evaporaron para obtener 3,4 mg (7,4%) de 2'-desoxi-2',2'-difluorozebularina (Compuesto VIII).

25 ¹H RMN en DMSO-d₆ para el isómero β del compuesto VIII: 8,66 ppm (dd, J₁=4 Hz, J₂=2,4 Hz, 1H), 8,57 (dd, J₁=6,8 Hz, J₂=2,4 Hz, 1H), 6,62 (dd, J₁=6,8 Hz, J₂=4 Hz, 1H), 6,07 (t, J=7,2 Hz, 1H), 4,42-4,29 (m, 1H), 4,05-3,97 (m, 2H), 3,88-3,82 (m, 1H), ESI MS: 249 [M+H]⁺,



Esquema 3. Síntesis de 2'-desoxi-2',2'-difluorozebularina (Compuesto VIII) (NUC019).

30 EJEMPLO 4

Citotoxicidad *in vitro* de los análogos de pirimidina

En este ejemplo se midió la citotoxicidad *in vitro*, medida mediante GI₅₀ (50% de inhibición del crecimiento, por sus siglas en inglés), de los siguientes análogos de pirimidina, usando ensayos conocidos en la técnica: gemcitabina, 5-azadesoxicitidina, 5-azacitidina, 2',2'-difluoro-5-azadesoxicitidina (NUC013), 5,6-dihidro-5-azadesoxicitidina y 2'-

desoxi-2',2'-difluorozebularina (NUC019).

La citotoxicidad *in vitro* se midió en las siguientes líneas celulares: NCI-H460 (ATCC n° HTB-177) (pulmón de células no pequeñas), HCT-116 (ATCC n° CCL-247) (colorrectal), HL-60 (ATCC n° CCL-240) (leucemia) y MDA-MB-231 (ATCC n° HTB-26) (mama). Los valores calculados de la GI₅₀ se muestran en la Tabla 4.

5 Tabla 4. Valores (μM) de la inhibición del crecimiento (GI₅₀) para las líneas celulares seleccionadas

Compuesto	NCI-H460	MDA-MB-231	HCT-116	HL-60
gemcitabina	0,02	0,72	0,01	0,03
5-azadesoxicidina	13,04	>31,25	>31,25	0,27
5-azacitidina	0,43	1,64	0,62	0,44
2',2'-difluoro-5-azadesoxicidina (NUC013)	4,39	>31,25	4,54	1,51
5,6-dihidro-5-azacitidina	4,84	>31,25	21,40	0,03
2'-desoxi-2',2'-difluorozebularina (NUC019)	135,65	165,90	310,26	--

EJEMPLO 5

Inhibición *in vitro* de la metiltransferasa de ADN

10 La actividad de la metiltransferasa de ADN (DNMT) se midió en la línea celular de cáncer HCT-116 (ATCC n° CCL-247) (colorrectal) y se calculó el porcentaje de inhibición de DNMT resultante del tratamiento de las células con 5-azacitidina (5-aza-C) o 2',2'-difluoro-5-azadesoxicidina (Compuesto IV) (NUC013). El ensayo se realizó utilizando el kit de ensayo de actividad/inhibición de la metiltransferasa de ADN EpiQuick (Epigentek, Brooklyn, NY). Las células HT-116 se incubaron con concentraciones 1 μM y 10 μM de cada fármaco durante un período de 24 horas. El porcentaje de inhibición de DNMT se muestra en la Tabla 5.

15 Tabla 5. Porcentaje de inhibición de DNMT

Experimento	5-aza-C 1 μM	Compuesto IV (NUC013) 1 μM	5-aza-C 10 μM	Compuesto IV (NUC013) 10 μM
1	N/A	N/A	30,41	28,20
2	36,76	61,73	59,90	N/A
3	9,94	35,77	41,26	46,51
4	10,96	62,63	74,22	70,75

Los resultados de la Tabla 8 demuestran que 2',2'-difluoro-5-azadesoxicidina (NUC013) es un inhibidor de la metiltransferasa de ADN.

20 Aunque se ha ilustrado y descrito la realización preferida de la invención, se apreciará que se pueden realizar varios cambios en la misma sin apartarse del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. 2',2'-Difluoro-5-azadesoxicitidina, sus anómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento de un carcinoma de tumor sólido.
- 5 2. 2',2'-Difluoro-5-azadesoxicitidina, sus anómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables para uso según la reivindicación 1, en donde el carcinoma de tumor sólido se selecciona a partir del grupo que consiste en carcinomas de mama, de pulmón de células no pequeñas, de colon, de riñón, de ovario y colorrectal.
3. 2',2'-Difluoro-5-azadesoxicitidina, sus anómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica.
- 10 4. 2',2'-Difluoro-5-azadesoxicitidina, sus anómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables para uso según la reivindicación 3, en donde la neoplasia maligna hematológica es una leucemia.
5. 2',2'-Difluoro-5-azadesoxicitidina, sus anómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables para uso según la reivindicación 4, en donde la leucemia es resistente a la decitabina (5-azadesoxicitidina).
6. 2',2'-Difluoro-5,6-dihidro-5-azadesoxicitidina, sus anómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 15 7. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según la reivindicación 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. El compuesto según la reivindicación 6, para uso en el tratamiento de un carcinoma de tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica.
9. El compuesto según la reivindicación 6, para uso según la reivindicación 8, en donde
- 20 - el carcinoma de tumor sólido se selecciona a partir del grupo que consiste en carcinomas de mama, de pulmón de células no pequeñas y de colon; y
- la neoplasia maligna hematológica es leucemia.
10. 2'-Desoxi-2',2'-difluorozebularina, sus anómeros y sus sales farmacéuticamente aceptables.
11. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según la reivindicación 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 12. El compuesto según la reivindicación 10, para uso en el tratamiento de un carcinoma de tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica.
13. El compuesto según la reivindicación 10, para uso según la reivindicación 12, en donde
- el carcinoma de tumor sólido se selecciona a partir del grupo que consiste en carcinomas de mama, de pulmón de células no pequeñas, de colon y colorrectal; y
- 30 - la neoplasia maligna hematológica es leucemia.

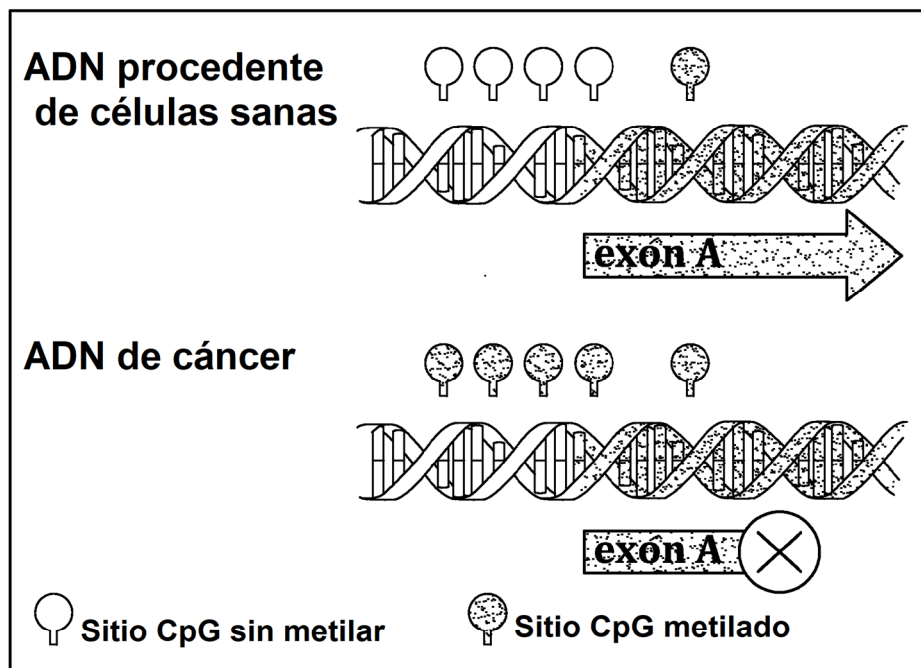


Fig. 1.

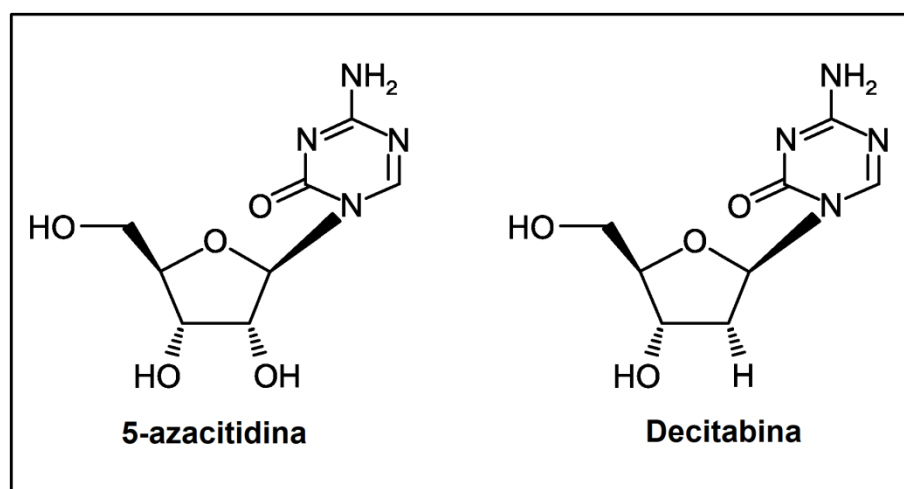
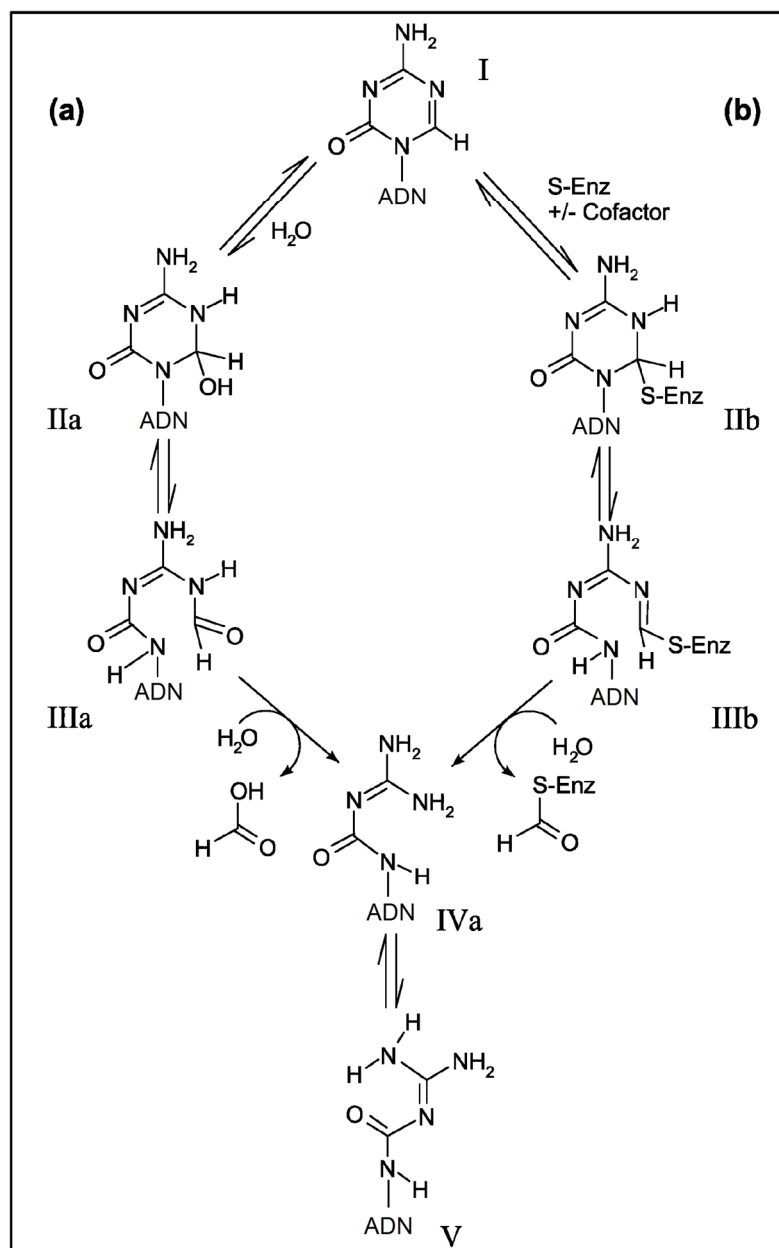


Fig.2.

*Fig.3.*

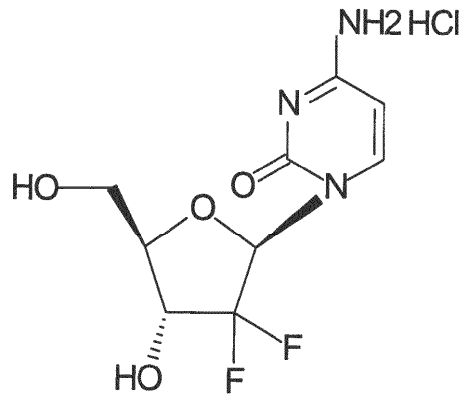


Fig. 4.

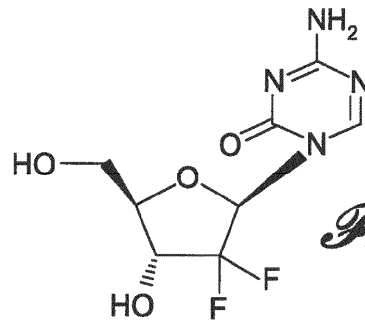


Fig.5.

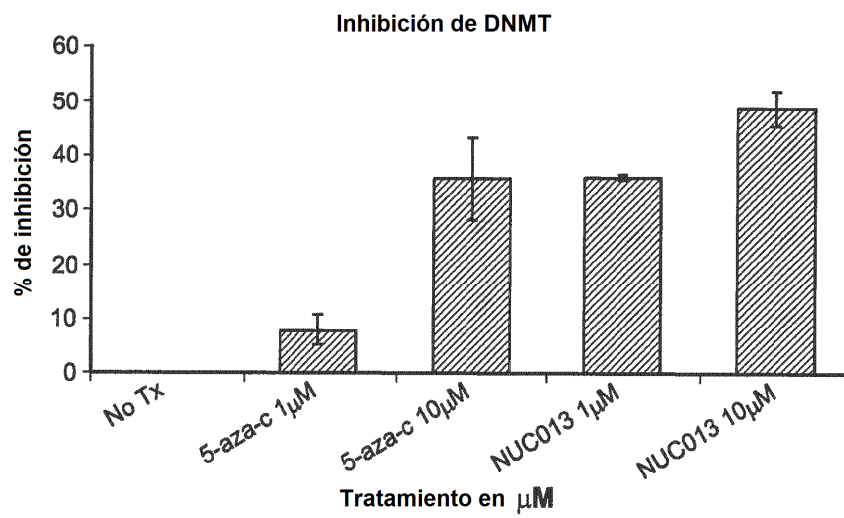


Fig.6.

Efecto de NUC013 sobre el crecimiento de células THP-1

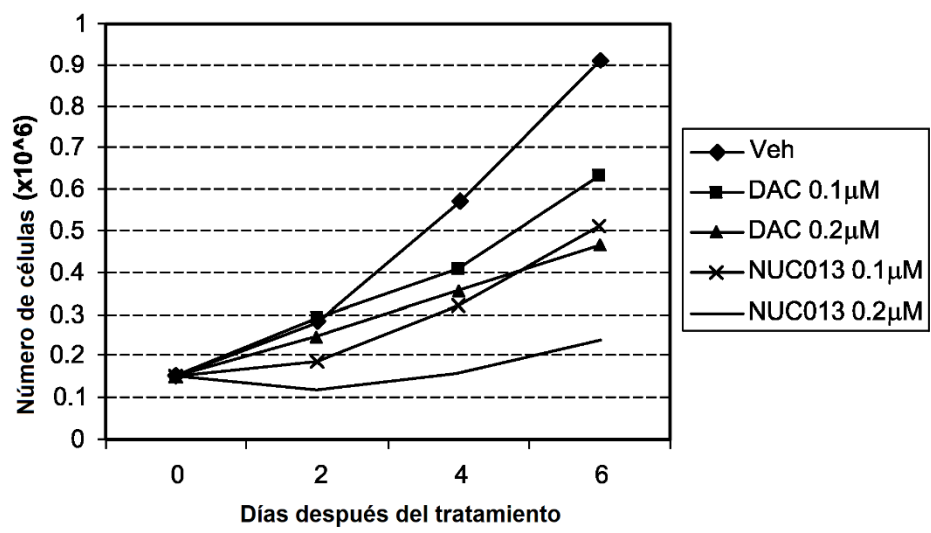


Fig. 7.

Efecto de NUC013 sobre el crecimiento de las células Kasumi-1

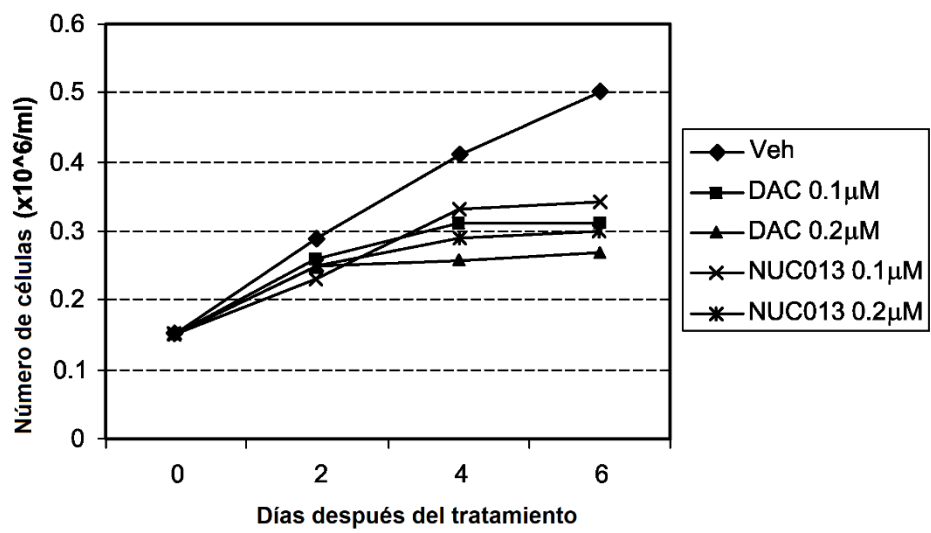


Fig.8.

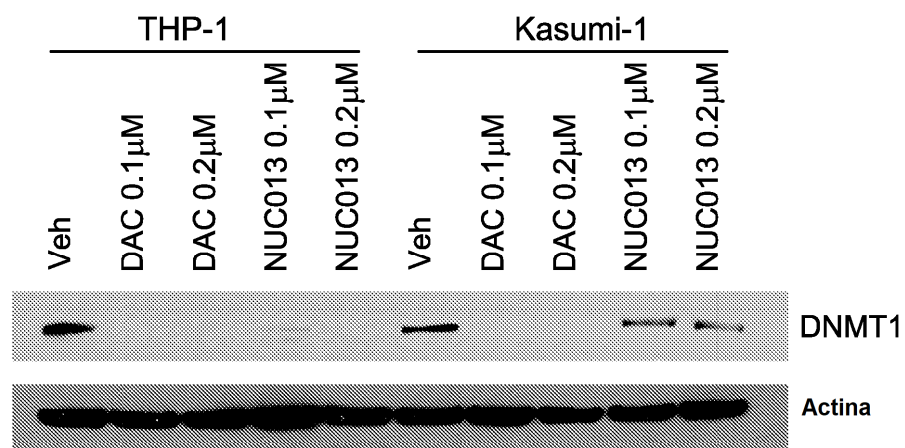


Fig.9.

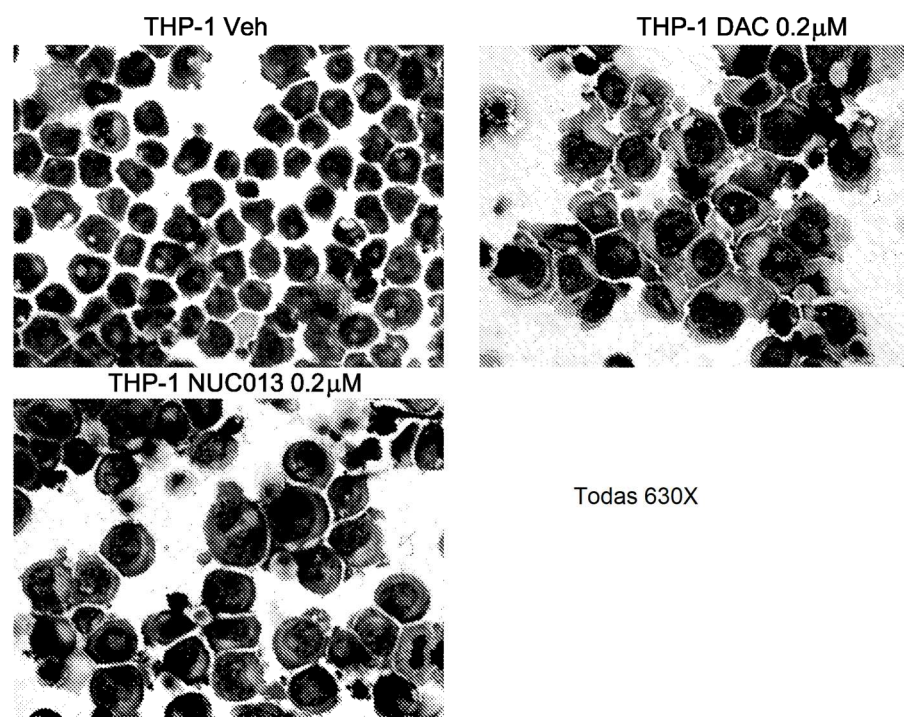


Fig.10.

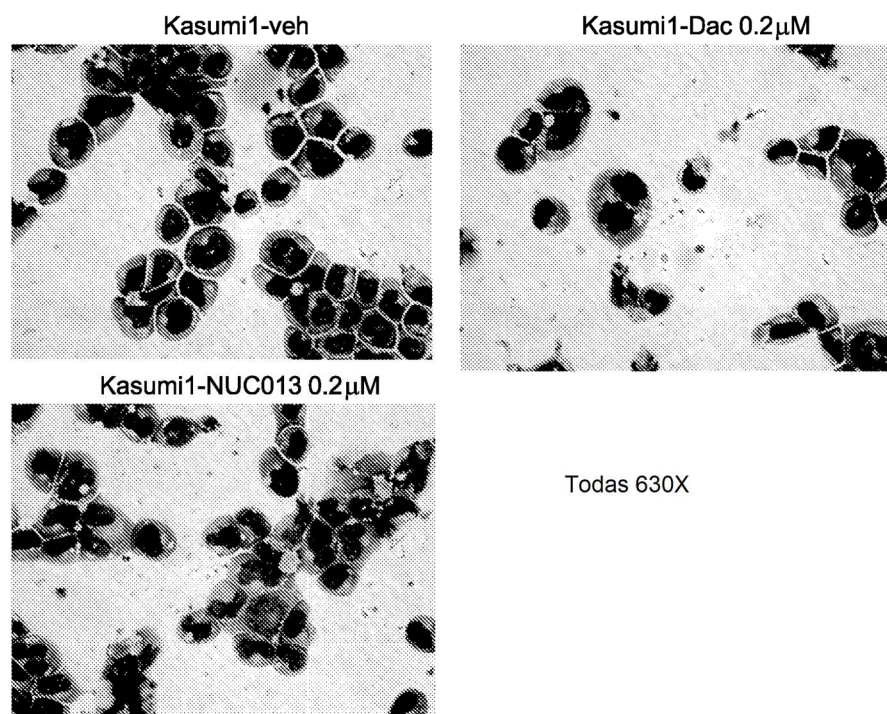


Fig. 11.

