

AÑO 1958

Expediente núm.

240848



# REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

**PATENTE DE** INVENCIÓN

**MEMORIA DESCRIPTIVA**

*que se acompaña a la solicitud de*

una **PATENTE DE** INVENCIÓN por 20 años, en España

*a favor de*

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

s u i z a domiciliado en BASILEA (SUIZA)

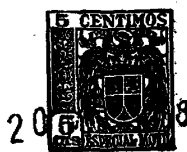
calle de \_\_\_\_\_ núm. \_\_\_\_\_

por: **PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE N-GLICÓSIDOS DE**

**5-FLUORO-URACILO**

Nº 6775

Agente Sr. JAIMÉ ISENN MIRALLES



240846

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

por "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE N-GLICÓSIDOS DE 5-FLUORO-URACILO", a favor de la firma suiza F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A., residente en BASILEA (Suiza).

- / -

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a nuevos N-glicósidos de 5-fluoro-uracilo y sales de los mismos con bases aceptables medicinalmente. Más particularmente, se refiere a N-ribósidos y N-deoxiribósidos de 5-fluoro-uracilo, tal como por ejemplo

5. 5-fluoro-uridina, ésto es 1-beta-D-ribofuranosil-5-fluoro-uracilo y 2'-deoxi-5-fluoro-uridina, esto es 1-(beta-D-2-deoxi-ribofuranosilo)-5-fluorouracilo.

La invención también se refiere a un procedimiento para la manufactura de N-glicósidos de 5-fluoro-uracilo y sales de los mismos con bases aceptables medicinalmente, el cual

10.

20 N

240846



comprende el hacer reaccionar 5-fluoro-uracilo con cloruro de mercurio(II), tratar el mercurio-di-5-fluoro-uracilo obtenido con un halogenuro de glicano acilado, desacilar el N-glicósido de 5-fluoro-uracilo, obtenido y, en caso deseado, convertir el

5. producto reaccional en una sal con una base.

Un material de partida preferido es un halogenuro de ribosa acilado, y se prefiere particularmente el halogenuro de 2,3,5-tri-O-benzoil-beta-D-ribofuranosilo.

La invención se refiere ulteriormente a un procedimiento para la manufactura de N-glicósidos de 5-fluoro-uracilo y sales de los mismos con bases aceptables medicinalmente, el cual comprende el transferir enzimáticamente 2-deoxiribosa de una 2-deoxiribosida a 5-fluoro-uracilo y, en caso deseado, convertir la 2'-deoxi-5-fluoro-uridina obtenida en una sal

10.

15. con una base.

Como 2-deoxi-ribosida es ventajoso utilizar timidina. Un suministrador de enzimas preferido es el Streptococcus faecalis (ATCC 8043).

Los N-glicósidos de 5-fluoro-uracilo son útiles como agentes germicidas, siendo activos, por ejemplo, contra bacterias gram-positivas, tales como el Staphylococcus aureus; y contra hongos, tales como Scopulariopsis brevicaulis. Los N-glicósidos de 5-fluoro-uracilo también son útiles como antimetabolitos, por ejemplo, interfieren el metabolismo del ácido nucleico y por tanto inhiben el crecimiento de células, por ejemplo Lactobacillus leichmannii.

20.

25.

El material de partida para los procedimientos de la presente invención, 5-fluoro-uracilo, es en sí, un compuesto nuevo, no descrito hasta ahora en ninguna publicación impresa.

30. A fin de que la divulgación del presente invento pueda ser completa, se describe con la presente un método de preparar

20



# 240846

este compuesto.

## Preparación de 5-fluoro-uracilo

- Se refluja una mezcla de 200 g (2 mols) de fluoro-acetato sódico seco y 442 g (2.86 mols) de sulfato de dietilo, durante tres horas y media en un baño de aceite. Entonces la mezcla reaccional es destilada a través de una columna fraccionadora, proporcionando 177.3 g de fluoro-acetato etílico bruto que tiene un intervalo de ebullición de 116-120°C.
- El material es redestilado a través de una columna fraccionadora, dando fluoro-acetato etílico purificado que hierve a 114-118°C.
- En un frasco de fondo redondo, de tres cuellos y dos litros de capacidad, provisto de agitador, embudo cuentagotas y condensador de reflujo, se coloca 880 ml de éter dietílico absoluto, y en éste se suspende 47.6 g (1.22 mols) de potasio cortado en trozos de 5 mm. Se añade a gotas, mientras se agita, 220 ml de etanol absoluto, con lo que el calor de reacción produce el reflujo. A fin de obtener la disolución completa del potasio, la mezcla es refluja finalmente en un baño de vapor. La mezcla reaccional entonces es enfriada en un baño de hielo, y se le añade a gotas una mezcla de 135 g (1.22 mols) de fluoro-acetato etílico y 96.4 g (1.3 mols) de formiato etílico recién destilado, mientras se agita y enfría, durante un período de dos horas y media. Al terminar la adición del formiato de etilo, la mezcla de reacción es agitada durante una hora adicional mientras se enfría y luego es dejada reposar durante la noche a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, el precipitado cristalino que se ha formado es filtrado por aspiración, lavado con éter dietílico y secado en desecador al vacío. El producto comprende esencialmente el enolato

240846

20



potásico de fluoromalonaldehidato de etilo (nomenclatura alternativa, la sal potásica del éster etílico del ácido fluoromalonaldehídico).

- Se refluja una mezcla de 103.6 g (0.6 mol) del enolato potásico del fluoromalonaldehidato etílico recién preparado, 83.4 g (0.3 mol) de sulfato de S-metilisotiuronio y 32.5 g (0.6 mol) de metóxido sódico, agitando, en 1500 ml de metanol absoluto. Al principio los reactivos se disuelven en grado importante, pero muy poco después se produce precipitación.
5. La mezcla reaccional es refluja durante dos horas y al término de este tiempo es evaporada a sequedad en vacío. El residuo es tratado con 280 ml de agua, se observa una disolución incompleta. La mezcla obtenida es clarificada filtrándola a través de carbón vegetal. El filtrado es acidificado (a una reacción ligeramente ácida al congo) por adición de ácido clorhídrico acuoso concentrado que contiene 37% en peso de HCl (son necesarios 48 ml). El material que se ha cristalizado de la solución acidificada es filtrado, lavado hasta quedar libre de sulfatos con agua y secado a 100°C. Proporcionando
10. éter S-metílico de 2-tio-5-fluoro-uracilo bruto, con un intervalo de fusión de 202 a 221°C. Este último material es recristalizado disolviéndolo en 2035 ml de acetato de etilo hirviendo y enfriándolo a -20°C, proporcionando éter S-metílico de 2-tio-5-fluoro-uracilo, punto de fusión 230-237°C,
15. en un estado de pureza suficiente que puede ser utilizado directamente para el paso siguiente. Se recristaliza una muestra del material de agua (alternativamente, de acetato etílico) elevándose así el punto de fusión a 241-243°C. Para el análisis, el material es purificado ulteriormente sublimándolo
20. en vacío a 140-150°C/0.1 mm.
- 25.
- 30.



2 40846

5. Se refluja una solución de 10.0 g de éter S-metílico del 2-tio-5-fluoro-uracilo purificado, punto de fusión 230-237°C, en 150 ml de ácido clorhídrico acuoso concentrado (que contiene aproximadamente 37% en peso de HCl), bajo nitrógeno durante cuatro horas. La mezcla reaccional entonces es evaporada en vacío. El residuo amarronado cristalino es recristalizado de agua. El producto recristalizado resultante es purificado ulteriormente por sublimación al vacío a 190-200°C (temperatura de baño)/0.1 mm de presión. Se obtiene 10. 5-fluoro-uracilo en forma de cristales incoloros o de tinte escarlata, punto de fusión 282-283°C (con descomposición).

15. La invención es divulgada ulteriormente en los siguientes ejemplos, que son ilustrativos pero no limitativos de la misma. Las temperaturas estan indicadas en grados centígrados.

E J E M P L O 1.

Mercurio-di-5-fluoro-uracilo.

20. A una solución de 2.3 g (17.7 mM) de 5-fluoro-uracilo en 82 ml de hidróxido sódico acuoso 0.086 N, se añade una solución de 4.81 g (17.7 mM) de cloruro mercúrico en 16 ml de etanol. El pH de la mezcla es ajustado a 5.1 por adición de 8.5 ml de hidróxido sódico acuoso normal, después de lo cual precipita el mercurio-di-5-fluoro-uracilo. La mezcla es dejada reposar durante la noche a 4°C, y entonces el producto cristalino es filtrado y lavado hasta quedar libre de cloro, con 25. agua, luego con etanol y finalmente con éter dietílico. Rendimiento 3.3 g (79.4%).

5-fluoro-2',3',5'-tri-O-benzoiluridina.

30. A 245 ml de éter dietílico anhidro previamente saturado con cloruro de hidrógeno a 0°, se añade 13.2 g (26.2 mM)

240846

- de 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-beta-D-ribose Kissmann y otros, J.A.C.S. 77, 21 (1955)7. El frasco tapado es dejado reposar a 4° durante 8 días. El disolvente es eliminado entonces al vacío y se añade 3 veces 40 ml de benceno anhidro
5. al residuo y cada vez es extraído en vacío. El residuo de cloruro de 2,3,5-tri-O-benzoil-beta-D-ribofuranosilo es disuelto en 73 ml de benceno.
- Se prepara una suspensión seca del mercurio-di-5-fluoro-uracilo suspendiendo 6 g (13.1 mM) de dicha sal mercuríca en 130 ml de xileno y destilando 40 ml de xileno. Los restantes 90 ml de suspensión son calentados y se les añade, agitando, los 73 ml de solución bencénica de cloruro de 2,3,5-tri-O-benzoil-beta-D-ribofuranosilo. La mezcla es refluja durante una hora y media y filtrada mientras está caliente.
10. 15. El precipitado cristalino insoluble, punto de fusión 236-257°, es identificado como 5-fluoro-uracilo impuro: 2.78 g, lo que representa una recuperación de aproximadamente 82%. El filtrado es enfriado, con lo que se cristaliza la 5-fluoro-
20. -2',3',5'-tri-O-benzoil-uracilribofuranosida. Este precipitado cristalino es filtrado, lavado con un poco de benceno y luego con éter dietílico, rendimiento 1.9 g, punto de fusión 185-189°. Este material es disuelto en 22 ml de acetato etílico tibio, luego se añade 54 ml de éter de petróleo
25. (30-60°); la mezcla es dejada reposar en el refrigerador, con lo que se cristalizan 0.85 g de un producto puro de punto de fusión 207-209°.
- El filtrado de benceno-xileno, al quedar en reposo, da una segunda cosecha (2.07 g) de producto bruto, punto de fusión 182-184°. Este es recristalizado de la manera indicada
- 30.

240846



.7.

previamente, disolviéndolo en 25 ml de acetato de etilo tibio y añadiendo 35 ml de éter de petróleo (30-60°), obteniéndose así 1.33 g de 5-fluoro-2',3',5'-tri-O-benzoil-uracilribofuranosida pura de punto de fusión 207-209°.

5. La adición de 500 ml de éter de petróleo (30-60°) al licor madre produce una tercera cosecha de producto gomoso. Este es separado por decantación de los licores, y es disuelto en 110 ml de cloroformo. Se filtra un poco de material insoluble. El filtrado de cloroformo es liberado de mercurio lavándolo con tres porciones de 20 ml de solución acuosa de yoduro potásico (que contiene 30% en peso de KI), luego es lavado cinco veces con agua y finalmente es secado sobre sulfato sódico. El cloroformo es eliminado al vacío en un baño de agua, dejando un aceite que solidifica al ser tratado con éter de petróleo (30-60°). El sólido es filtrado y lavado con éter de petróleo (30-60°). Rendimiento, 5,83 g. El material es recristalizado de la manera descrita anteriormente, disolviéndolo en 18 ml de acetato etílico tibio y añadiendo 25 ml de éter de petróleo (30-60°), dando así 0.87 g de un compuesto purificado, punto de fusión 196-200°. Una segunda recristalización de 10 ml de acetato etílico, al que se había añadido 32 ml de éter de petróleo (30-60°), proporciona 0.53 g de producto puro, punto de fusión 207-209°.
- 10.
- 15.
- 20.

25. El rendimiento total de producto puro de punto de fusión 207-209° es 2.71 g, correspondiente a 18% del teórico, basado sobre el 5-fluoro-uracilo puesto en reacción, sin tener en cuenta el 5-fluoro-uracilo recuperado.

5-fluoro-uridina.

30. Se calienta una suspensión de 1 g (1.74 mm) de 5-fluoro-2',3',5'-O-benzoil-uracilribofuranosida de punto de

240846



.8.

- fusión 207-209° en 20 ml de amoníaco etanólico (saturado a 0°), en un tubo sellado, a 100° durante 16 horas. La solución marrón obtenida es evaporada a sequedad en vacío. El residuo es recogido tres veces con 30 ml de agua y cada vez es evaporado a sequedad. El residuo semicristalino marrón es recogido con 30 ml de agua y la suspensión turbia obtenida es extraída con 5 porciones de 10 ml de éter dietílico, rechazándose el extracto etéreo. La capa acuosa es evaporada a sequedad en vacío dando un residuo amarronado espumoso que es disuelto en 2 ml de etanol. La adición de 2 ml de éter dietílico precipita 220 mg de un sólido color canela.
- 5.
- 10.

- Al licor madre se le añade 30 ml de éter dietílico de modo que se precipita una segunda cosecha de producto, punto de fusión 143-144° (con reblandecimiento previo); peso, 35 mg.
- 15.

- El licor madre de este producto es evaporado a sequedad en vacío, y el residuo obtenido es recogido con 0.5 ml de etanol. La adición de 10 ml de éter dietílico precipita una tercera cosecha de producto, punto de fusión 136-138° (con reblandecimiento previo); peso, 70 mg;
- 20.

- Para la purificación ulterior del N-ribosido del 5-fluoro-uracilo bruto, la primera cosecha de 220 mg es disuelta en 1 ml de solución acuosa normal de hidróxido sódico, produciendo con ello una solución que contiene sal sódica de 5-fluoro-uridina. Entonces esta solución es pasada a través de una columna de 1.1 cm x 23 cm de "Dowex 1-X4" (Dow Chemical Co., Midland, Michigan; una resina intercambiadora de aniones consistente en un copolímero enlazado transversalmente, de estireno con divinil-benceno  $\frac{4}{100}$  del último), que contiene grupos amonio cuaternarios como grupos
- 25.
- 30.



240846

- funcionales), con un tamaño de malla 100-200, previamente convertida a la forma de formiato. La resina es lavada con agua hasta que las aguas de lavado son neutras. Entonces se efectúa la elución con ácido fórmico acuoso 0.01 N, siendo recogido el eluido a una razón de aproximadamente 1 ml por minuto, en fracciones de 25 ml. Cada fracción es examinada individualmente con respecto a la absorción ultravioleta; en cada una de las fracciones 2 a 6, la relación de las absorbancias 280 m $\mu$ /260 m $\mu$  es 0.99 (pH 14). La absorbancia total (densidad óptima observada x dilución de la muestra x volumen total en ml) es 2070,  $\lambda$  max. 270 m $\mu$  (pH 14).
- Las fracciones 2 a 6 son combinadas entonces y evaporadas a sequedad en vacío, a 50°. El residuo aceitoso es disuelto en 0.3 ml de etanol y se añade 4 ml de éter dietílico a la solución, produciendo un precipitado amorfo. Este es filtrado y disuelto en 3 ml de etanol a 60°. Se añade éter dietílico a la solución hasta que empieza a aparecer un enturbiamiento. Luego la mezcla es dejada reposar durante la noche. La ligera cantidad de precipitado amorfo que resulta es filtrada. El filtrado después de evaporación al vacío a 45°, proporciona un residuo cristalino de 5-fluoro-uridina que pesa 48 mg. Al ser observada en estado caliente bajo el microscopio, la substancia funde a 151-152°, se resolidifica, y luego funde nuevamente a 180-182° después de algo de reblandecimiento a 165°. La absorción ultravioleta es la característica de una ribosida, y es similar a la de la uridina, pero con un cambio del máximo a una longitud de onda mayor. Según era de esperar para una ribosida, y en contraste con la pirimidina libre, no hay prácticamente cambio del máximo en medio alcalino: al pH 7.2,  $\lambda$  max. = m $\mu$ ,  $\epsilon$  = 8120; al pH 14,  $\lambda$  max. = 270 m $\mu$



240846

$\epsilon = 6500.$

- La segunda cosecha (35 mg de punto de fusión 143-144°) y la tercera cosecha (70 mg de punto de fusión 136-138°) de N-ribosida de 5-fluoro-uracilo bruta mencionadas anteriormente, son combinadas y purificadas por cromatografía mediante intercambio de iones, según se ha descrito antes, obteniéndose así 90 mg de material cristalino purificado; punto de fusión microscópico, 147-152°, se resolidifica, luego funde nuevamente a 177-178°, con reblandecimiento previo a 172°.
- 5.
10. Al pH 7.2,  $\lambda$  max. = 270 m $\mu$ ,  $\epsilon = 7540$ ; al pH 14,  $\lambda$  max. = 270 m $\mu$ ,  $\epsilon = 6330$ .

- El rendimiento total de 5-fluoro-uridina es de 138 mg, esto es 30.3% a base de la tribenzoil-5-fluoro-uridina, 5.5% a base de la 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-beta-D-ribosa, y 4.3% a base del 5-fluoro-uracilo puesto en reacción.
- 15.

- La 5-fluoro-uridina presenta propiedades ácidas y forma sales con las bases. La invención incluye sales obtenidas por reacción de 5-fluoro-uridina con bases aceptables medicinalmente, por ejemplo hidróxidos de metales alcalinos, hidróxidos de metales alcalino-térreos, amoníaco, bases orgánicas atóxicas tales como etanolamina, y similares.
- 20.

- La 5-fluoro-uridina y sus sales con bases aceptables medicinalmente son útiles como compuestos antibacterianos, siendo activos, por ejemplo contra el St. aureus, B. subtilis y B. simplex, asimismo como compuestos antifúngicos contra los hongos tales como Scopulariopsis brevicaulis y C. albicans.
- 25.

EJEMPLO 2.

- Se hace crecer células de Streptococcus fecalis (ATCC 8043) en el medio de contraste de ácido fólico AOAC
- 30.



- [Lepper, Official and Tentative Methods de la Association of Official Agricultural Chemists, Washington, D.C., 7th Edition, 784 (1950)] suplementado con 2 mg por litro de timina; según las indicaciones de Prusoff. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 85, 564 (1954). Después de 20 horas de incubación a 37°, las células son recogidas por centrifugación. Las células recogidas son lavadas tres veces con cuatro volúmenes de solución tamponada de fosfato potásico (solución acuosa  $\frac{M}{15}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ajustado al pH 8.0 por adición de KOH acuoso 2 N) y las células húmedas son pesadas. Las células son suspendidas finalmente en la anterior solución tamponada de fosfato potásico y molidas en un homogeinizador de tejido de vidrio.
- Se prepara una cantidad de preparación de enzima equivalente a 900 mg de células húmedas completando hasta 25 ml con la anterior solución tamponada de fosfato potásico. Se disuelve 150 mg (1.15 mM) de 5-fluoro-uracilo y 1.0 g de timidina (4.12 mM) en 15 ml de la solución tamponada de fosfato potásico anterior. Las dos soluciones son mezcladas y la mezcla es incubada a 37° durante 18 horas. Después de este tiempo la acción enzimática es detenida por la adición de cuatro volúmenes de acetona y un volumen de éter dietílico libre de peróxidos. Los sólidos precipitados son separados por filtración, y el filtrado es evaporado bajo nitrógeno a presión reducida hasta que substancialmente todo el disolvente orgánico volátil ha sido eliminado. Quedan unos 20 ml de solución acuosa esencialmente libre de disolvente orgánico. Esta solución es diluída a 100 ml con agua destilada. Se somete diez microlitros de esta solución a cromatografía descendente sobre un papel tamponado con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 N (pH 7.8), utilizando una mezcla de disolventes de alcohol amílico terciario: agua:
- 5.
  - 10.
  - 15.
  - 20.
  - 25.
  - 30.

240846



éter n-butílico (80 : 13 : 7 en volumen). Una mancha visible bajo la luz ultravioleta y que tiene un  $R_f = 0.55$  es lixiviada con HCl 0.1 N y ensayada con miras a deoxiribosa por el método de Stumpf, J. Biol. Chem. 169, 367 (1947). Este análisis indica la presencia de un mínimo de 85.5 mg (0.35 mM) de 2'-deoxi-5-fluoro-uridina en la mezcla reaccional libre de proteínas.

10. La 2'-deoxi-5-fluoro-uridina presenta propiedades ácidas y forma sales con las bases. La invención incluye sales obtenidas haciendo reaccionar 2'-deoxi-5-fluoro-uridina con bases aceptables medicinalmente, por ejemplo hidróxidos de metales alcalinos, hidróxidos de metales alcalino-térreos, amoníaco, bases orgánicas atóxicas como etanolamina, y similares.

15. La 2'-deoxi-5-fluoro-uridina y sus sales con bases aceptables medicinalmente son útiles como compuestos antibacterianos y antifúngicos, siendo activos, por ejemplo, contra *St. aureus*, *Sarcina lutea*, *B. subtilis*, *E. bacillus*, *B. simplex*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *C. albicans*, y similares.

20. E J E M P L O 3.

25. Se cultiva células de *Streptococcus fecalis* (ATCC 8043) en el mismo medio de contraste de ácido fólico AOAC identificado en el ejemplo 2 anterior, suplementado con 2 mg por litro de timina. Después de 20 horas de incubación a 37°, las células son recogidas por centrifugación. Las células recogidas son lavadas tres veces con cuatro volúmenes de la misma solución tamponada de fosfato potásico, identificada en el ejemplo 2, y las células húmedas son pesadas. Las células son suspendidas finalmente en la solución tamponada de fosfato potásico anterior, y molidas en un homogeinizador de

30.

240846



tejidos de vidrio.

- Una cantidad de preparación de enzima equivalente a 4.06 g de células húmedas es completada hasta 105 ml con la solución tamponada de fosfato potásico identificada anteriormente.
5. 200 mg (1.54 mM) de 5-fluoro-uracilo y 1.50 g (6.16 mM) de timidina son disueltos en 15 ml de la solución tamponada de fosfato potásico referida anteriormente. Las dos soluciones son mezcladas, haciendo un volumen total de 120 ml. La mezcla es incubada a 37° durante 18 horas. Después de este
10. tiempo la acción enzimática es interrumpida por la adición de cuatro volúmenes de acetona y 1 volumen de éter dietílico libre de peróxidos. Los sólidos precipitados son separados por filtración, y el filtrado es evaporado bajo nitrógeno a presión reducida hasta que substancialmente todo el disolvente orgánico volátil ha sido eliminado. Quedan unos 20 ml de
15. solución acuosa. Esta solución es diluída a 100 ml con agua destilada.

- La solución es evaporada nuevamente en vacío hasta 5 ml y vuelta alcalina por adición de 20 ml de solución acuosa normal de hidróxido sódico, produciendo con ello una mezcla que contiene sales sódicas de: N-deoxi-ribosida del
20. 5-fluoro-uracilo, timina, timidina y 5-fluoro-uracilo. Esta mezcla es purificada por adsorción sobre una resina intercambiadora de iones y subsiguiente elución mediante soluciones
25. tamponadas de acidez gradualmente creciente; con lo cual los componente de pirimidina de la mezcla son eluidos en el orden siguiente: timidina, timina, 5-fluoro-uracilo y 2'-deoxi-5-fluoro-uridina. La purificación es efectuada haciendo pasar la mezcla alcalina mencionada anteriormente a través de una
30. columna de 2.2 cm x 27 cm de "Dowex 1-X4" (identificada en el

240846

20



.14.

- ejemplo 1 anterior), de tamaño de malla 100-200, convertida previamente a la forma de formiato y lavada a neutralidad como en el ejemplo 1. Entonces la columna es eluída con 280 ml de solución acuosa tamponada de formiato amónico (pH 9.8)
5. que tiene una normalidad de 0.1 con respecto al ion de formiato. El eluido no contiene ningún material que absorba las radiaciones ultravioleta. La elución es continuada con solución acuosa tamponada de formiato amónico (pH 7.4) que tiene una normalidad de 0.1 con respecto al ion de formiato, a una
10. velocidad de flujo de 46 ml por hora. Luego la elución es continuada todavía con solución acuosa tamponada de formiato amónico (pH 6.5) que tiene una normalidad de 0.1 con respecto al ion de formiato, a una razón de flujo de 60 ml por hora. Se separa fracciones a intervalos de 30 minutos y se las examina individualmente con vistas a la absorción ultravioleta
15. a longitudes de onda de 260 m $\mu$  y 280 m $\mu$  (pH 14).

20



# 240846

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
7.4	1- 5	0	0	-	-	-	-	-
7.4	6-17	23700	24500	1.04 a)	2.33	2.41	-	-
7.4	18-26	0	0	-	-	-	-	-
6.5	27-33	0	0	-	-	-	-	-
6.5	34-43	3760	5870	1.56 b)	-	-	0.56	0.44 c)
6.5	49-50	0	0	-	-	-	-	-

I = pH del eluente  
 II = Fracciones  
 III = Absorbancia total (pH 14) a 260 mμ  
 IV = Absorbancia total (pH 14) a 280 mμ  
 V = Relación promedio 280 mμ/260 mμ  
 VI = Timina (mM)  
 VII = Timidina (mM)  
 VIII = 5-fluoro-uracilo (mM)  
 IX = 2'-deoxi-5-fluoro-uridina (mM)  
 a) = aumenta gradualmente de 0.75 a 1.5  
 b) = disminuye gradualmente de 1.97 a 0.98  
 c) = 0.5 mM de deoxi-ribosa, ensayado por el método de Stumpf, op. cit.

5. El examen de los espectros de absorción ultravioleta de las fracciones individuales, y la cromatografía sobre papel de las fracciones individuales, muestra que las fracciones 6 a 17, inclusive, contienen sólo timina y timidina, mientras que las fracciones 34 a 48, inclusive, contienen los compuestos fluoro. Las fracciones 34 a 48, inclusive, por tanto son combinadas y evaporadas a sequedad en vacío. El residuo obtenido es disuel-

240846



.16.

- to en 30 ml de la fase superior de una mezcla de dos fases obtenida mezclando 60 volúmenes de acetato etílico, 35 volúmenes de agua y 5 volúmenes de ácido fórmico. Luego se construye una columna de 4.4 cm x 49 cm humedeciendo 285 g de polvo de celulosa (sin cenizas, calidad normal) con la fase superior del sistema mencionado anteriormente de acetato etílico-agua-ácido fórmico, y atacando la celulosa húmeda en el tubo de absorción con una varilla. Los 30 ml de solución son hechos pasar entonces a través de la columna. La elución es llevada a cabo con la fase superior del mismo sistema de acetato etílico-agua-ácido fórmico mencionado anteriormente, a una velocidad de flujo de 40 ml por hora, siendo recogidas las fracciones a intervalos de media hora. Las fracciones son examinadas individualmente en cuanto a absorción ultravioleta a longitudes de onda de 260  $\mu$  y 280  $\mu$  (pH 14).

I	II	III	IV	V	VI
1-56	0	0	-	-	-
57-93	1405	3735	2.61	0.57	0.01
94	0	0	-	-	-
95-96	118	124	1.05	despreciable	0.02
97-104	1275	1905	0.92	-	0.38 a)

I = Fracciones  
 II = Absorbancia total (pH 14) a 260  $\mu$   
 III = Absorbancia total (pH 14) a 280  $\mu$   
 IV = Relación promedio 280  $\mu$ /260  $\mu$   
 V = 5-fluoro-uracilo (mM)  
 VI = 2'-deoxi-5-fluoro-uridina (mM)

a) = 0.39 mM de deoxi-ribosa, ensayado por el método de Stumpf, op. cit.

240846



.17.

Las fracciones 97 a 104 son combinadas y evaporadas a sequedad en vacío a 45°. El residuo de 2'-deoxi-5-fluoro-uridina es obtenida como un vidrio incoloro. Rendimiento 96 mg (25.3%). El compuesto presenta la absorción ultravioleta

5. característica de una deoxi-ribosida, similar a la de la deoxi-uridina, pero con un desplazamiento del máximo hacia las longitudes de onda más largas; según era de esperar para una deoxiribosida, y en contraste con la pirimidina libre, sólo existe un ligero desplazamiento del máximo en medio alcalino: al pH 7.2  $\lambda$  max. = 268 m $\mu$ ,  $\epsilon$  = 7570; al pH 14,  $\lambda$  max. = 270 m $\mu$ ,  $\epsilon$  = 6480.

15. La invención, dentro de su esencialidad, puede ser desarrollada en otras formas de realización que difieran en detalle de la indicada a título de ejemplo, a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba. Podrá, pues, realizarse con los medios y aparatos más adecuados, por quedar todo ello comprendido dentro del espíritu de las reivindicaciones.

= . =

240846 20



.18.

N O T A

Descrito el objeto de la invención, se declara nuevas las siguientes reivindicaciones, con prioridad estadounidense Serial No 647.489 del 21 de Marzo de 1957.

5. 1. Procedimiento para la preparación de N-glicósidos de 5-fluoro-uracilo y sales de los mismos con bases aceptables medicinalmente, el cual comprende el hacer reaccionar 5-fluoro-uracilo con cloruro de mercurio(II), tratar el mercurio-di-5-fluoro-uracilo obtenido con un halogenuro de glicano acilado, desacilar el N-glicósido de 5-fluoro-uracilo obtenido y, en caso deseado, convertir el producto de reacción en una sal con una base.
10. 2. Procedimiento según la reivindicación 1, el cual comprende el utilizar un halogenuro de ribosa acilado.
15. 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque comprende el utilizar halogenuro de 2,3,5-tri-O-benzoil-beta-D-ribofuranosilo.
20. 4. Procedimiento según la reivindicación 1, el cual comprende el transferir enzimáticamente 2-deoxi-ribosa de una 2-deoxi-ribosida a 5-fluoro-uracilo y, en caso deseado, convertir la 2'-deoxi-5-fluoro-uridina obtenida en una sal con una base.
25. 5. Procedimiento según la reivindicación 4, el cual comprende el utilizar timidina como 2-deoxi-ribosida.
6. Procedimiento según las reivindicaciones 4 y 5, el cual comprende el utilizar Streptococcus fecalis (ATCC 8043) como suministrador de enzimas.

240846<sup>20</sup>



.19.

7. Procedimiento para la preparación de N-glicósidos de 5-fluore-uracilo.

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

5.

Madrid, a 20 de Marzo de 1958

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

p.a.

JAIME ISERN MIRALLES

O/  
M:mm.  
N:mr.