



313097

memoria descriptiva

CLASE DE REGISTRO	Una Patente de Invención, por veinte años.
NOMBRE Y NACIONALIDAD DEL SOLICITANTE	Lepetit S.p.A. (sociedad italiana)
RESIDENCIA Y DOMICILIO	Via Roberto Lepetit, 8 Milano (Italia)
<input type="checkbox"/> OBJETO	" PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR 5-NITRO-2'-DEOXIURIDINA "
INVENTOR	Yelahanka Krishnamurthy Srinivas Murthy. de nacionalidad india
PRIORIDAD	Solicitud patente británica nº 21.935/62 del 27 de Mayo de 1964.



313097

.. 1 -

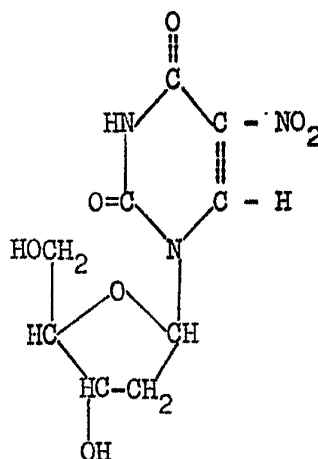
1

El presente invento se refiere a un procedimiento para la preparación de una sustancia nueva antiviral.

5

Más particularmente la sustancia antiviral que forma el objeto del procedimiento según el invento, es 5-nitro-2'-deoxiuridina de la fórmula

10



15

Un objeto de este invento es procurar el nuevo agente antiviral, 5-nitro-2'-deoxiuridina, teniendo un grado de actividad muy alto, en muchos casos mucho más alto que la actividad de agentes antivirales bien conocidos de estructura similar, tal como 5-yodo-2'-deoxiuridina.

20

Otro objeto del presente invento es procurar un procedimiento conveniente para la preparación de 5-nitro-2'-deoxiuridina en rendimientos comercialmente útiles.

25

El procedimiento consiste en someter 5-nitrouracilo a la acción de una enzima capaz de convertirle en el nucleósido 5-nitro-2'-deoxiuridina. A este fin, la enzima se prepara primeramente por medio de un procedimiento microbiológico, por fermentación en un medio de cultivo conteniendo una



313097

1 fuente asimilable de carbono, una fuente asimilable de nitrógeno y sales minerales en las cantidades, que son usuales en procedimientos de fermentación, un micro-organismo que forme dicha enzima durante la fermentación. Aunque se tiene la intención de
5 que pueda utilizarse cualesquiera de estos micro-organismos, a condición de que produzca un rendimiento razonable de la enzima, se ha hallado que un organismo particularmente adecuado es Lactobacillus leichmannii ATCC 7830. La fermentación puede ejecutarse como es usual, por ejemplo, incubando el micro-organismo
10 mo a una temperatura entre 30 y 40°C durante un periodo variable de 6 a 24 horas. Al final de la fermentación, las células del micro-organismo son aisladas, por ejemplo, por centrifugación, y se someten a desintegración con el fin de dejar libre la enzima, que está contenida en ellos. Un desintegrador ultrasonico
15 puede ser empleado utilmente a este objeto, que se hace actuar sobre una suspensión neutralizada de células; la enzima pasa en solución y puede almacenarse, después de separación de los residuos celulares, a bajas temperaturas en condición congelada.

20 Para la reacción enzimática se incubaba 5-nitrouracilo con la enzima en presencia de timidina. En el curso de esta incubación la mitad de deoxiribosa de timidina se transfiere a 5-nitrouracilo, dando 5-nitro-2'-deoxiuridina. La incubación se ejecuta a temperaturas entre alrededor de 30° y 40°C,
25 y preferentemente 37°C, durante 2-5 horas, en una solución neutralizada a un pH entre alrededor de 6 y 7, conteniendo timidina y 5-nitrouracil en proporciones mutuas variables, que puede variar entre 10:1 y 1:10, y un volumen adecuado de la preparación



313097

1

cruda de enzima obtenida como se describe arriba. Al final de la incubación el producto 5-nitro-2'-deoxiuridina puede aislarse a través de varios procedimientos, pero preferentemente por cromatografía. Mientras se hace referencia a los Ejemplos para una mejor explicación de los procedimientos de aislamiento, ocasionalmente puede observarse que agua es un buen disolvente para cromatografía en este caso particular. Las propiedades del producto obtenido se registran en el Ejemplo 1.

5

EJEMPLO 1

10

5-nitro-2'-deoxiuridina.

Dos litros de un medio de la siguiente composición.

15

Extracto de carne	5 g.
peptona	5 g.
extracto de levadura	5 g.
caseína hidrolizada enzimáticamente	10 g.
lactosa	20 g.
NaCl	1.5 g.
Agua	1000 ml.
pH final	7.3

20

25

distribuido en porciones de 100 ml en matraces Erlenmeyer de 500 ml se inoculan con el cultivo de L. Leichmannii cultivado en un microinoculum medium y se incubó en un sacudidor alternativo a 37°C durante 10 horas. Las células recogidas por centrifugación se lavan con un amortiguador de fosfato M/15 (pH 6.5)

19



313097

1

y después, una vez hecha otra centrifugación a velocidad moderada (5.000 g.), resuspendidas en 20 ml. de dicho amortiguador de fosfato. Esta suspensión está sometida a un desintegrador ultrasónico y los residuos celulares resultantes se centrifugan a 10.000 g por 10 minutos. El producto que sobrenada, representa la preparación cruda de enzima y está almacenado en estado congelado a -40°C.

5

10

15

20

25

Para la reacción enzimática una solución de timidina (0,5 g.) a la que se agrega 0,1 g de 5-nitrouracil y 50 ml. de la preparación cruda de enzima se prepara hasta 500 ml en amortiguador de fosfato M/15 (pH 6.5). La solución es incubada a 37°C durante 3 horas, se calienta en baño de agua para coagular las proteínas y se centrifuga. El producto, que sobrenada, se evapora a sequedad al vacío. El residuo se extrae con 10 x 10 ml de etanol caliente y los extractos combinados se evaporan a sequedad al vacío. El residuo se vuelve a disolver en la cantidad mínima de agua. Esta solución se cromatografía en una columna de 4 x 30 cm de formato de Dowex, que se ha equilibrado con 0,1 M de formato de amonio ajustado a pH 6.0. El amortiguador eluye primero timidina seguida de cerca por tiamina. El pH se cambia después a 3.5. Bajo estas condiciones se eluye 5-nitro-2'-deoxiuridina. La solución se evapora a sequedad a 40°C al vacío y se coevapora dos veces con etanol absoluto. El residuo seco se extrae después con 5 x 30 ml. de etanol, se evaporan los extractos combinados a 40°C al vacío para dar un aceite incoloro que se solidifica al reposar. Este último, redisolto en 20 ml. de etanol y evaporado a pequeño volumen,



313097

al reposar da 5-nitro-2'-deoxiuridina.

Espectros ultravioleta

PH	λ max m μ	ϵ mol
1	237	8600
1	305	10600
7.38	323	11450

El Rf en cromatografía ascendente de capa fina en etanol-amonio-acetato 7:3 (pH 7.5) es 0,55. El Rf en cromatografía descendente de papel, en Na₂HPO₄ solución saturada con alcohol isoamílico, es 0,82.

EJEMPLO 2

Dos litros de un medio de la siguiente composición

Extracto de levadura	5 g.	DL-triptofano	0,1 g.
Dextrosa	10 g.	L-Cisteina	0.2 g.
Acetato de Sodio	10 g.	acido p-amino-benzóico	0.001 g.
Citrato sódico	10 g.	Biotina	2 Y
Enzima hidrolizada de caseina	5.6 g.	Acido glutámico	10 Y
KH ₂ PO ₄	3 g.	Niacina	1000 Y
K ₂ HPO ₄	3 g.	Pantotenato de calcio	200 Y
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.8 g.	Piridoxina	200 Y
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.17 g.	Tiamina	200 Y
Tween 80	1 g.	Riboflavina	400 Y
Acido oléico	0.1 g.	Adenina	0.01 g.
Asparagina	0.1 g.	Guanina	0.01 g.
MnSO ₄ .H ₂ O	0.16 g.	Uracil	0.01 g.
		H ₂ O	1000 ml.

313097



- 6 -

1 distribuidos en porciones de 100 ml. en matraces Erlenmeyer de
500 ml. se inoculan con un cultivo de L. leichmannii cultivado
en caldo de microinoculum (difco) y se incubó a 37°C durante
12 horas. Las células recogidas por centrifugación a 5000 g. se
5 lavan con amortiguador de fosfato M/30 (pH. 6.5) y entonces des-
pués de otra centrifugación a la misma velocidad, se vuelve a
suspender en una cantidad suficiente de dicho amortiguador de
fosfato para obtener una suspensión de una densidad de 6.5% de
transmisión de luz (Klett). Esta suspensión se somete a desinte-
10 gración ultrasónica y los residuos celulares resultantes se cen-
trifugan a 10.000 g. durante 10 minutos. El producto que sobre-
nada representa la preparación cruda de enzima y se almacena
en estado congelado a -40°C.

Para la reacción enzimática se prepara
15 una solución de 5-nitrouracilo (1 g.) a la que se añade 0.2 g.
de timidina y 80 ml. de la preparación cruda de enzima se ob-
tiene hasta 160 ml. con 0.25 M de amortiguador de acetato con
pH 5.8. La solución se incuba a 37°C durante 150 minutos. Des-
pués de esta incubación las proteínas se precipitan por la adi-
20 ción de tres volúmenes de etanol y se separan por centrifuga-
ción a velocidad moderada. El producto, que sobrenada, se con-
centra a 25 ml. al vacío, se filtra y transfiere sobre una
columna de 4 x 30 cm. de Dowex 1-formato que ha sido equilibra-
da con formato de amonio de 0.1 M ajustado a pH 6.0. La cromatografía
25 de primero timidina seguida de timina. El pH se varía
después a 3.5. En estas condiciones la 5-nitro-2'-deoxiuridina
se eluye. Las fracciones se recogen y concentran a ~50 ml. a
40°C al vacío. Esta solución se extrae 16 veces con n-butanol



313097

1

saturado con agua. El extracto de butanol se evapora a sequedad al vacío a 45°C. El residuo se disuelve en 25 ml. de etanol absoluto.

5

Esta solución se concentra lentamente al vacío a pequeño volumen. Al enfriar sobre hielo cristaliza la 5-nitro-2'-deoxiuridina, produciendo 110 mg. de producto puro.

Se hizo una comparación de la actividad antiviran en tubo de ensayo de 5-nitro-2'-deoxiuridina y otros deoxinitrósidos. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

10

Actividad en tubo de ensayo de 5-nitro-2'-deoxiuridina y otros deoxinitrósidos.

Compuesto	Citotoxicidad.	Vacuna	H. zoster
5-yodo-2'-deoxiuridina	250 V/ml	4-2 V/ml	1 V/ml
5-bromo-2'-deoxiuridina	250 V/ml	4-2 V/ml	-
5-cloro-2'-deoxiuridina	250 V/ml	4-2 V/ml	-
5-bromo-2'-deoxicididina	125 V/ml	4-2 V/ml	-
5-nitro-2'-deoxiuridina	500 V/ml	0.016-0.008 /ml	0-1 V/ml

15

20

5-nitro-2'-deoxiuridina es también activa como virus de viruela de ovejas en la misma concentración que la vacuna.

25

Las concentraciones arriba mencionadas indican los niveles a los que se obtiene una completa inhibición de efecto citofático del virus correspondiente.

Para los fines de terapia humana puede administrarse tópicamente 5-nitro-2'-deoxiuridina en forma de unturas o soluciones. Alternativamente la sustancia puede darse oral-



313097

1 mente o por via parenteral.

N O T A

5 La presente patente de invención, comprende las siguientes reivindicaciones:

10 1.- Procedimiento para preparar 5-nitro-2'-deoxiuridina, caracterizado por comprender la operación de someter 5-nitrouracilo a la acción de una enzima capaz de transferir la mitad de deoxiribosa de timidina a 5-nitrouracilo, en presencia de dicha timidina.

15 2.- Procedimiento para preparar 5-nitro-2'-deoxiuridina, caracterizado por comprender la operación de someter 5-nitrouracilo a la acción de la enzima producida durante la fermentación de Lactobacillus leichmannii, en presencia de timidina.

20 3.- Procedimiento para preparar 5-nitro-2'-deoxiuridina caracterizado porque se incuba a 30-40°C durante 2-5 horas a un pH entre alrededor de 6 y 7 una solución acuosa conteniendo 5-nitrouracilo y timidina en una proporción de 10:1 a 1:10 en presencia de la actividad producida durante la fermentación de Lactobacillus leichmannii.

25 4.- Procedimiento para preparar 5-nitro-2'-deoxiuridina.

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

Madrid

19 MAYO 1965

CARLOS ROEB