

P. 44.417.-

Case Nº F1696 Q

378351

REGION TECNOL.  
CLASIFICACION I.P.T.  
CLASE C07 A61  
SUBCLASE D K

**Memoria descriptiva**



para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de TANABE SEIYAKU CO., LTD.

entidad / ~~de nacionalidad~~ japonesa

con domicilio en 21, 3-chome, Doshomachi, Higashi-ku, Osaka,  
Japón

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR ACIDO 4-(9-ADENIL)  
-2,3-DIHIIDROXI-BUTIRICO" (Clase Internacional C07d)

**ANULADO**

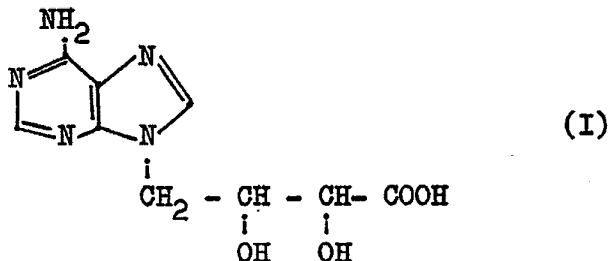
**PROHIBIDA: LA CONSULTA  
Y LA EXPEDICION DE COPIAS  
Y CERTIFICACIONES**

11.5.70



19

Este invento se refiere a un nuevo derivado de adenina representado por la fórmula:



y sus sales farmacéuticamente aceptables. Este invento se refiere también al procedimiento para prepararlo.

5           Se ha logrado aislar una nueva sustancia hipocoles-  
 terolémica (designada en lo que sigue como "lentinacina")  
 a partir de un hongo comestible "Shiitake" (*Lentinus edo-*  
*des* Sing.), en forma de cristales puros, y se confirmó su  
 estructura química como la de ácido 4-(9-adenil)-2-(R),  
 10   3(R)-dihidroxi-butírico (configuración D-eritro), por es-  
 pectrometría, por estudio de degradación y por síntesis to-  
 tal adicional.

15           Se ha encontrado que la lentinacina consta de car-  
 bono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Se determinó que el  
 peso molecular de la lentinacina era de 253 por espectro-  
 metría de masas (pico o máximo principal a m/e 253, y pi-  
 cos fragmentarios a m/e 236, 218, 208, 178, 174, 148 y  
 135).

20           El análisis elemental de la lentinacina resultó ser  
 el siguiente: 42,78% de carbono, 4,34% de hidrógeno, 27,51%  
 de nitrógeno.

          Por lo tanto, la fórmula empírica de la lentinacina  
 se determinó que era  $C_9H_{11}O_4N_5$ , lo que requiere 42,69% de  
 carbono, 4,39% de hidrógeno y 27,67% de nitrógeno.

25           La lentinacina dió resultados negativos en todas las



reacciones de color para azúcares, esteroides y alcaloi-  
des. La lentinacina tiene al menos un grupo carboxílico,  
dado que forma un éster y es adsorbida sobre una resina  
de intercambio de aniones débil. El espectro de absorción  
de ultravioletas de la lentinacina es específico de los  
de los compuestos de adenina-9-sustituídos (véase J.A.C.S.  
84, 2148 (1962)).

U.V. máximo de lentinacina (ácido libre)  
261,5 m $\mu$  (en H<sub>2</sub>O); 259,5 m $\mu$  (en HCl 1N)  
262 m $\mu$  (en NaOH 1 N).

La espectrometría de masas del éster metílico de la  
lentinacina muestra un pico con el número de masa 135, que  
corresponde a la adenina. El espectro de resonancia magné-  
tica nuclear de la sal sódica de lentinacina tenía las si-  
guientes señales características: (100 MHz en D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm)  
8,04 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 4,40-4,10 (m, 4H), todas las  
cuales eran específicas del desplazamiento químico de pro-  
tones en posiciones 2 y 8 del esqueleto de adenina 9-sus-  
tituída. Se obtuvieron glicina y ácido 4-amino-2,3-dihí-  
droxi-butírico por la degradación ácida de lentinacina. La  
formación de glicina por la degradación es aceptada como  
característica de compuestos de adenina, tal como se in-  
forma en *Biochimica et Biophysica Acta* 58, 585 (1962). La  
configuración estérea del ácido 4-amino-2,3-dihidroxibutí-  
rico obtenido a partir de lentinacina se confirmó, por sín-  
tesis pasando por ácido 4-amino-4-desoxi-2,3-O-isopropili-  
dén-D-eritrónico, que era del tipo D-eritro (es decir con-  
figuración 2(R), 3(R)).

Por consiguiente, se confirmó que la estructura quí-



mica de la lentinacina era la de ácido 4-(9-adenil)-2(R),  
3(R)-dihidroxi-butírico. La lentinacina recristalizada en  
agua caliente funde a 261-263°C con descomposición.

El hemidrato de la sal sódica se encuentra en forma  
de laminillas incoloras que se descomponen a 266-268°C  
( $[\alpha]_D^{20} = +45,5^\circ$  (c = 1, en H<sub>2</sub>O)).

La configuración estérea de la lentinacina fué con-  
firmada además como del tipo D-eritro mediante la síntesis  
total. Las propiedades físico-químicas de la lentinacina  
sintetizada coincidían con las de la lentinacina natural.  
Más aún, la lentinacina sintética mostró un notable efec-  
to hipocolesterolémico, igual que el de la lentinacina na-  
tural.

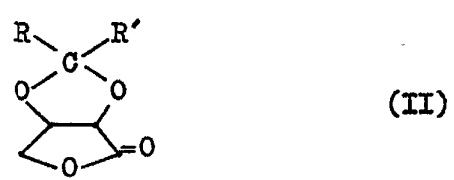
La lentinacina es aislada extrayendo *Lentinus edodes*  
Sing. en forma de polvo con una solución acuosa que con-  
tiene aproximadamente 70% de un alcohol inferior conven-  
cional tal como metanol, etanol; eliminando las sustancias  
insolubles del extracto; adsorbiendo, si se requiere, la  
porción hipocolesterolémica sobre una resina de intercam-  
bio de cationes tal como (Dowex 50 W, Amberlite IR-120  
(forma H<sup>+</sup>)) para eliminar las sustancias no catiónicas que  
no son adsorbidas sobre dicha resina, seguido por la elu-  
ción de la porción hipocolesterolémica adsorbida con amo-  
niaco acuoso desde la resina, adsorbiendo ingredientes áci-  
dos en el eluato sobre una resina de intercambio de anio-  
nes débil tal como (Amberlite IR 45 (forma Cl<sup>-</sup>)); eluyen-  
do la porción eficaz desde dicha resina con un ácido volá-  
til tal como acético; fraccionando el eluato cromatográfi-  
camente sobre una resina de intercambio de cationes tal  
como Amberlite CG-120 para recoger la fracción hipocoles-



terolémica que muestra un máximo de absorción a aproximadamente 262 m $\mu$ ; y recuperando lentinacina cristalina de la fracción después de desalificar sobre resina de intercambio de iones.

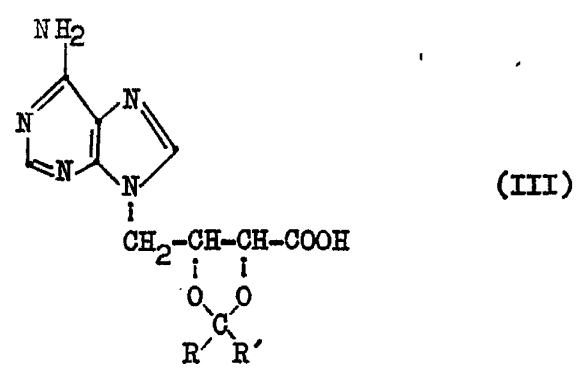
5 Un ejemplo preferido de la extracción está mostrado en el Ejemplo 1 que se describe a continuación.

De acuerdo con una realización del presente invento, el compuesto (I) puede ser preparado sintéticamente haciendo reaccionar un cetal o acetal de 2,3-dihidroxi-eritrono-  
10 lactona representado por la fórmula



en que  $\begin{matrix} R \\ \diagdown \\ C \\ \diagup \\ R' \end{matrix}$  es el radical residual de dicho acetal o

cetal, con una sal metálica de adenina en su posición 9 para proporcionar el correspondiente derivado de ácido 4-(9-adenil)-2,3-dihidroxi-butírico representado por la  
15 fórmula



en que  $\begin{matrix} R \\ \diagdown \\ C \\ \diagup \\ R' \end{matrix}$  tiene los mismos significados que se indican arriba, después de lo cual el compuesto (III) es hidro



19

lizado para dar el compuesto (I).

En calidad de sal metálica de adenina, se prefiere emplear una sal de metal alcalino tal como sal de sodio, sal de litio, sal de potasio, que se puede preparar de un modo convencional, por ejemplo haciendo reaccionar adenina con hidruro de sodio, sodio metálico, hidróxido de sodio, amida de sodio, amida de litio, carbonato de potasio, hidróxido de potasio, en un disolvente apropiado a la temperatura ambiente o bajo calentamiento moderado. Ejemplos preferidos del radical residual del anterior acetal o cetal son los radicales etilideno, isopropilideno y bencilideno.

La reacción de condensación de la sal metálica de adenina con la lactona (II) se lleva a cabo preferiblemente bajo calentamiento, produciendo de este modo la correspondiente sal metálica del compuesto (III). La sal metálica del compuesto (III) es convertida con facilidad en el correspondiente ácido libre de (III) de un modo convencional, tal como neutralización o tratamiento con una resina de intercambio de iones. En calidad de disolvente de reacción para la formación de la anterior sal metálica de adenina y para la subsiguiente reacción de condensación con el compuesto (II), se pueden emplear preferiblemente dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dimetilacetamida, sus mezclas con piridina o similares.

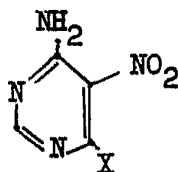
El compuesto intermedio (III), o su sal metálica, es hidrolizado a continuación para eliminar el grupo protector  $\begin{matrix} R \\ | \\ C \\ | \\ R \end{matrix}$  de grupos 2,3-dihidroxi, después de ser separado del producto de reacción, o sin separación. Dicha hidrólisis puede efectuarse de una manera convencional



tal como hidrólisis ácida, por ejemplo añadiendo un ácido mineral diluído tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, a la temperatura ambiente o a una temperatura elevada.

5 El ácido 4-(9-adenil)-2,3-dihidroxi-butírico resultante puede ser aislado de la mezcla de reacción de un modo convencional, por ejemplo adsorbiendo sal inorgánica y la adenina no reaccionada remanente sobre una resina de intercambio de iones.

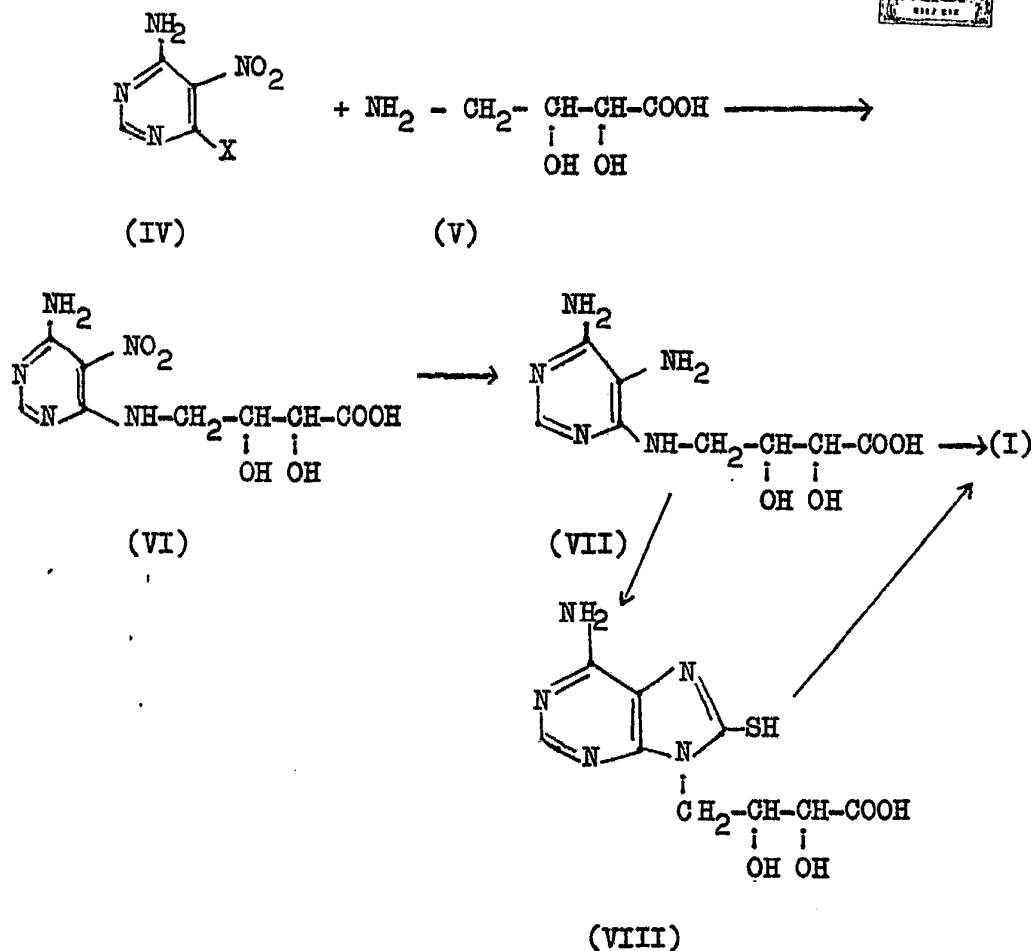
10 De acuerdo con otra realización del presente invento, el compuesto (I) puede ser preparado haciendo reaccionar 4-halo-5-nitro-6-amino-pirimidina, representada por la fórmula



(IV)

15 en que X es un átomo de halógeno tal como átomos de cloro, bromo o flúor, con ácido 4-amino-2,3-dihidroxi-butírico (V) para proporcionar ácido 4-[(6-amino-5-nitro-4-pirimidil)-amino]-2,3-dihidroxi-butírico (IV), reduciendo el producto (VI) para convertir su grupo nitro en un grupo amino, y sometiendo el ácido 4-[(5,6-diamino-4-pirimidil)-amino]-2,3-dihidroxi-butírico (VII) resultante a una reac  
20 ción de cierre de ciclo.

La anterior reacción puede ser ilustrada por las siguientes ecuaciones:



en que X tiene los mismos significados que se especifican más arriba.

La primera reacción de condensación de los compuestos (IV) y (V) se lleva a cabo preferiblemente en un disolvente apropiado, tal como agua, tetrahydrofurano, acetona, dioxano, o una mezcla de estos en presencia de una base tal como bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, carbonato de potasio. Se prefiere llevar a cabo la reacción a la temperatura ambiente o a una temperatura ligeramente elevada.

El compuesto (VI) así preparado es reducido a continuación para dar el compuesto (VII) de una manera convencional para convertir un grupo nitro en un grupo amino. El



19

método más apropiado para este fin es la reducción catalítica utilizando paladio sobre carbono, níquel Raney o similares en un disolvente tal como agua, metanol o etanol. Los métodos son aplicables al compuesto (VI) tanto en la forma de ácido libre como de sales, tales como la sal sódica o la sal potásica. La reacción se puede llevar a cabo a la temperatura ambiente bajo la presión atmosférica o bajo presión elevada. Alternativamente, la reducción del compuesto (VI) se puede llevar a cabo químicamente, por ejemplo empleando un agente reductor sulfurado tal como una sal de tiosulfato.

El ácido 4-(5,6-diamino-4-pirimidil)-amino-2,3-dihidroxi-butírico (VII) así obtenido puede ser empleado como material de partida para la reacción final de cierre de ciclo con o sin aislamiento desde la mezcla de reacción. La reacción de cierre de ciclo se puede llevar a cabo de dos maneras, a saber:

i) por reacción con un derivado de tiocarbonato tal como disulfuro de carbono, tiourea o ditiocarbonato, para proporcionar ácido 4-(8-mercapto-9-adenil)-2,3-dihidroxi-butírico (VIII) seguido por una reacción de desulfuración convencional.

o ii) por reacción con un derivado de ácido fórmico tal como ácido fórmico, formamida, una combinación de estos, formamidina, ortoformiato y tioformamida.

El primer tipo de cierre de ciclo i) se lleva a cabo preferiblemente en un disolvente apropiado tal como dimetilformamida, piridina, dimetilacetamida, con calentamiento. La subsiguiente reacción de desulfuración se lleva a cabo, por ejemplo, calentando el compuesto intermedio (VIII) con



níquel Raney en un disolvente tal como agua durante unas pocas horas.

El último tipo de cierre de ciclo ii) se puede llevar a cabo calentando simplemente con ácido fórmico o con los derivados de este arriba ilustrados, con o sin utilización de disolvente para el mismo.

Opcionalmente, una pequeña cantidad de isómero de aminopurina 6-sustituída puede ser producida como subproducto, pero el isómero puede ser separado con facilidad del compuesto (I) buscado por métodos cromatográficos o utilizando la diferencia entre sus solubilidades en un disolvente convencional.

La reacción anterior puede ser aplicable igualmente a los respectivos isómeros ópticos de los compuestos (II) y (V) sin racomización. Por lo tanto, si se emplean 2,3-O-protegida-D-eritronolactona y ácido 4-amino-D-eritro-2,3-dihidroxi-butírico en calidad de los compuestos de partida (II) y (V), respectivamente, se puede preparar sintéticamente de modo completo la misma sustancia que la lentinacina natural. Además de ello, si se emplean 2,3-O-protegida-DL-eritronolactona y ácido 4-amino-DL-eritro-2,3-dihidroxi-butírico en calidad de los compuestos de partida (II) y (V), respectivamente, se puede obtener la mezcla racémica que contiene 50% de una sustancia igual a la lentinacina natural.

El compuesto (I) así preparado puede ser convertido adicionalmente en sus sales estables y farmacéuticamente aceptables tales como las sales de sodio, de potasio, de calcio, de magnesio, de aluminio, todas las cuales mantienen la actividad hipocolesterolémica igual que el



ácido libre del compuesto (I).

5 Sal de potasio:  $C_9H_{10}O_4N_5K \cdot 1/2H_2O$ , placas incoloras, p. de f. 261-265°C (con descomposición), fácilmente solubles en agua, prácticamente insolubles en etanol o en otros disolventes orgánicos.

Sal de calcio:  $(C_9H_{10}O_4N_5)_2 Ca \cdot H_2O$ , primas incoloras, p. de f. por encima de 288°C, apenas solubles en agua, prácticamente insolubles en disolventes orgánicos.

10 Sal de magnesio:  $(C_9H_{10}O_4N_5)_2 Mg \cdot H_2O$ , polvo cristalino, p. de f. por encima de 300°C, apenas soluble en agua, prácticamente insoluble en disolventes orgánicos.

La actividad hipocolesterolémica de la lentinacina fue estimada en los experimentos farmacológicos de la firma solicitante como aproximadamente 20 veces más potente que la del Clofibrato (nombre químico: 2-paraclorofenoxi-2-metil-propionato de etilo) que ha sido conocido hasta ahora como uno de los agentes hipocolesterolémicos más eficaces. Un ejemplo de experimento comparativo de sus actividades hipocolesterolémicas e hipotrigliceridémicas es el siguiente:

25 Experimento. La lentinacina fué añadida como suplemento, en forma de sal de sodio, a una dieta de alimentación comercial (vendida por Japan CLEA Company), con la cual ratas machos de la raza Sprague-Dawley, que pesaban 140-160 g, fueron mantenidas durante 7 días (consistiendo cada grupo de ensayo en 8 ratas).

30 Después del periodo experimental, se determinó la cantidad total de colesterol y de triglicéridos en el suero de ratas por el método de Zak y por el método de Van Handel y Zilversmit respectivamente.



El porcentaje de disminución de colesterol total y de triglicéridos totales en el suero fue calculado por la siguiente fórmula:

$$5 \quad \text{Disminución \%} = \left( 1 - \frac{\text{Nivel principal de colesterol total o de triglicéridos totales en el grupo medicado}}{\text{Nivel medio de colesterol total o de triglicéridos totales en el grupo testigo}} \right) \times 100$$

Los resultados están mostrados en la Tabla 1.

10 Tabla I

	<u>Suplementos Compuestos en la dieta (%)</u>	<u>Porcentaje de disminución de colesterol total en el suero (%)</u>	<u>Porcentaje de disminución de triglicéridos totales en el suero (%)</u>
	Lentinacina		
15	(Sal de Na, hemihidrata-da) 0,01	26	49
	" 0,005	20	30
	" 0,002	15	21
	" 0,001	8	19
20	Clofi-brato 0,2	28	62
	" 0,1	21	34
	" 0,05	15	31

25 Además la toxicidad aguda y la toxicidad crónica de la lentinacina son extremadamente bajas. Por ejemplo, las cinco ratones a los que se administraron oralmente o intravenosamente 1000 mg/kg de lentinacina sobrevivieron todos durante mas de 14 días. Las 10 ratas a las que se administraron oralmente 500 mg/kg diariamente de lentinacina sobrevivieron durante más de un mes, y 7 de 10 ratas a las que se administraron oralmente 1000 mg/kg diariamente de lentinacina supervivieron durante más de un mes.



La lentinacina y sus sales farmacéuticamente aceptables son particularmente ventajosas para tratar o evitar hipercolesterolémias que están acompañadas de arterioesclerosis, hipertensión, infarto cardíaco, angina de pecho, cerebromalacia, o accidente vascular cerebral. Pueden ser utilizadas en formas susceptibles de ser suministradas para administración oral o parenteral en asociación con un excipiente farmacológicamente aceptable. Las dosis diarias preferidas son de aproximadamente 100 a 300 mg (calculado en forma de ácido libre) para adultos. No aparece con tales dosis ningún efecto secundario desfavorable.

Ejemplo 1.-

(1) 1 kg de caperuzas secas de hongo, *lentinus edodes* Sing. es reducido a forma de polvo y se añaden al polvo 5 litros de etanol acuoso al 80%. La mezcla es agitada vigorosamente a la temperatura ambiente durante 4 horas. A continuación, la mezcla es filtrada y el filtrado es hecho pasar a través de una columna rellena con 0,4 litros de Amberlite IR-120 (forma  $H^+$ ). Después de lavar la columna hasta que la solución que ha sido hecha pasar se vuelve neutra, la columna es eluída con amoniaco acuoso al 4% y el eluato es concentrado. El residuo es disuelto en agua y la solución es hecha pasar a través de una columna rellena con 0,4 litros de Amberlite IR-45 (forma  $Cl^-$ ). Después de lavar la columna con 2 litros de agua, la columna es eluída con 2 litros de ácido acético 1 N y el eluato es concentrado hasta 50 ml. El concentrado es cromatografiado sobre una columna (de 3,6 x 150 cm) de Amberlite CG-120 a 50°C (disolvente: soluciones tampón de citrato de sodio de pH 3,25 y pH 4,25, caudal 480 ml/hora)



y se recogen las fracciones entre 6,300 - 7,280 ml. La fracción es adsorbida nuevamente sobre Amberlite IR 120 y es eluída con amoníaco acuoso. Se añade etanol al 70% al eluato concentrado para separar por cristalización 0,495 g de hemidrato de sal sódica de lentinacina, es decir -  
5 4-(9-adenil)-D-eritro-2,3-dihidroxi-butirato de sodio hemihidrato en forma de placas transparentes incoloras que se descomponen a 266-268°C después de recristalización repetida en etanol acuoso al 70% y se seca sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bajo  
10 presión reducida a aproximadamente 45°C).

$$[\alpha]_D^{20} = + 45,52 \quad (C = 1, \text{ en } H_2O)$$

La sal de sodio es soluble en agua, pero apenas soluble en etanol, insoluble en cloroformo, éter de petróleo u otros disolventes orgánicos convencionales.

15 (II) A partir de la anterior sal de sodio se preparan los siguientes cristales de una manera convencional.

Acido libre de lentinacina: P. de f. 261-263°C (después de recristalización en agua caliente, apenas soluble en agua).

20 Ester metílico de lentinacina: P. de f. 218-221°C (agujas incoloras (después de recristalización en metanol).

Clórhidrato de éster metílico de lentinacina: P. de f. 193-196°C. Agujas incoloras (después de recristalización en etanol-acetona).

25 Ejemplo 2

540 mg de adenina son disueltos en 60 ml de dimetilformamida, se añaden a la solución 210 mg de hidruro de sodio oleoso al 62,5% y la mezcla es agitada durante 2 horas a 70°C. Se añaden a la mezcla, en porciones, 700 mg de

19 MAY



2,3-O-isopropiliden-D-eritronolactona y la mezcla es agitada a  $140^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 15 horas. A continuación, la dimetilformamida es eliminada de la mezcla por evaporación bajo presión reducida, se añaden al residuo 10 ml de ácido clorhídrico al 10%, y la mezcla es calentada a  $60-80^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Después de concentración de la mezcla bajo presión reducida, se añaden al residuo 20 ml de agua y se neutralizan con amoníaco acuoso al 5%. La solución es hecha pasar a continuación a través de una columna de 50 ml de Amberlite IR-120 (forma  $\text{H}^+$ ), y la columna es eluida con amoníaco acuoso al 5%. El disolvente es eliminado del eluato por evaporación bajo presión reducida, se añade al residuo una pequeña cantidad de agua y la adenina insoluble remanente es separada por filtración. Una pequeña cantidad de bicarbonato de sodio es añadida al filtrado, y se añade al filtrado una cantidad suficiente de etanol para separar por cristalización 4-(9-adenil)-D-eritro-2,3-dihidroxi-butirato de sodio crudo. Después de secar con calentamiento bajo presión reducida, se obtienen 470 mg de cristales de color pardo ligeramente amarillento que se descomponen a  $225-229^{\circ}\text{C}$ . Los cristales son purificados para formar escamas incoloras que se descomponen a  $266-268^{\circ}\text{C}$ , después de recristalización repetida en etanol acuoso al 80%.

### Ejemplo 3

Una mezcla de 8,1 g de adenina, 254 g de hidruro de sodio oleoso (al 62,5%) y 250 ml de dimetilformamida es calentada a  $80-85^{\circ}\text{C}$  durante 1,5 horas. 7,9 g de 2,3-O-isopropiliden-D-eritronolactona son añadidos a la mezcla, y la mezcla es calentada con agitación a  $140 \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 12 ho



ras. Después de evaporación del disolvente, el residuo es disuelto en 40 ml de agua y la sustancia insoluble remanente es separada por filtración. El filtrado es tratado similarmente con Amberlite IR-120 (forma H<sup>+</sup>) tal como se describe en el Ejemplo 2, y el eluato es concentrado para separar por cristalización ácido 4-(9-adenil)-D-eritro-2,3-isopropiliden-dioxi-butírico, que se descompone a 170-175°C.

Los cristales son disueltos en solución acuosa diluida de bicarbonato de sodio y la solución es decolorada, y después de esto es neutralizada con ácido fórmico al 3%, con lo que se obtienen 2,0 g de prismas incoloros purificados de ácido, que se descomponen a 222-224°C.

IR. <sup>nujol</sup> máx. ; 3400, 3320, 3180, 1680, 1620, 1230, 1210, 1170, 1070, cm<sup>-1</sup>

U.V. máx.; 263 m $\mu$  (en agua)

R.M.N. ; (D<sub>2</sub>O, NaOD)

$\tau$  = 1,89 (s, 1H), 1,95 (s, 1H), 5,70 (q, 2H), 5,15 (m, 2H)  
8,40 (s, 2H), 5,15 (m, 2H), 8,40 (s, 3H) 8,65 (s, 3H)

100 mg de los cristales son calentados con 1 ml de ácido clorhídrico al 10% a 60-70°C durante 30 minutos. El pH de la mezcla es ajustado a 3,5 con hidróxido de sodio al 10% y los cristales resultantes son recogidos por filtración. Los cristales son disueltos en solución acuosa de bicarbonato de sodio y se añade a la solución una cantidad suficiente de etanol para separar por cristalización 4-(9-adenil)-D-eritro-2,3-dihidroxi-butirato de sodio, hemihidrato.

P. de f. (con descomposición) 263-265°C. Rendimiento: 89 mg.



Ejemplo 4

2,2 g de adenina son suspendidos en 65 ml de dime-  
tilformamida y se añaden a la suspensión 375 mg de hidru-  
ro de sodio. Después de agitar la suspensión a 60°C duran-  
te 45 minutos, se añaden a la suspensión 2,16 g de 2,3-0  
-etilidén-D-eritronolactona. La mezcla es calentada a re-  
flujo durante 8 horas en una atmósfera de nitrógeno. Des-  
pués, la mezcla de reacción es filtrada y se evapora di-  
metilformamida desde el filtrado bajo presión reducida.  
Se añade al residuo una pequeña cantidad de agua y la mez-  
cla es dejada reposar durante la noche en una nevera. Des-  
pués, la mezcla es filtrada y el filtrado es hecho pasar  
a través de una columna de Dowex 50 W. La columna es eluí-  
da con amoníaco acuoso y el disolvente es evaporado del  
eluato bajo presión reducida para dar ácido 4-(9-adenil)  
-D-eritro-2,3-etilidén-dioxi-butírico crudo. El producto  
es disuelto en 15 ml de agua y un tercio de la solución  
es purificado por cromatografía en capa delgada preparati-  
va sobre gel de sílice (disolvente eluyente: ácido acéti-  
co:butanol:agua =1:4:5) para dar prismas incoloros que se  
descomponen a 241-243°C. Rendimiento: 200 mg.

Los cristales son calentados con 5 ml de ácido sul-  
fúrico al 20% sobre baño María, son neutralizados con amo-  
níaco acuoso y son concentrados bajo presión reducida. El  
concentrado es dejado reposar en un baño de hielo, con lo  
que se obtienen cristales de ácido 4-(9-adenil)-D-eritro  
-2,3-dihidroxi-butírico.

P. de f. 252-254°C (con descomposición).

Una cristalización adicional en agua proporciona la  
muestra purificada de punto de descomposición 261-263°C.



La parte remanente de la solución acuosa del ácido 4-(9-adenil)-D-eritro-2,3-etilidendioxi-butírico crudo es añadida a 20 ml de ácido sulfúrico al 20% y la mezcla se hierve durante 2 horas. La mezcla es neutralizada con amoníaco acuoso y es hecha pasar a través de una columna de Dowex 50 W. La columna es eluida con amoníaco acuoso y el eluato es concentrado bajo presión reducida. Se añade al residuo solución acuosa de bicarbonato de sodio hasta que cesa la efervescencia. Entonces, la mezcla es decolorada, filtrada y el filtrado es concentrado. Se añade al concentrado una cantidad apropiada de etanol mientras está caliente. Después de enfriar, los cristales resultantes son secados en aire para dar 650 mg de 4-(9-adenil)-D-eritro-2,3-dihidroxi-butirato de sodio.  $2,5H_2O$  en forma de laminillas incoloras. Después de secar bajo presión reducida a aproximadamente  $45^{\circ}C$ , los cristales son identificados con el hemihidrato de sal sódica de lentinacina.

#### Ejemplo 5

393 mg de hidruro de sodio oleoso (al 64%) y 1,48 g de adenina son suspendidos en 45 ml de dimetilformamida y la suspensión es agitada a  $45-60^{\circ}C$  durante una hora. Se añaden a la mezcla 2,06 g de 2,3-O-bencilidén-D-eritrono-lactona en una atmósfera de nitrógeno a  $140-150^{\circ}C$  durante 12 horas. Se elimina dimetilformamida por evaporación desde la mezcla, y el residuo es disuelto en 10 ml de agua. La solución es dejada reposar durante la noche en una nevera y es filtrada. El filtrado es concentrado hasta se quedan bajo presión reducida y el residuo es ajustado a pH 4 con ácido fórmico 0,5 N. El precipitado es separado



por filtración y el filtrado es liofilizado, con lo que se obtienen 3,0 g de ácido 4-(9-adenil)-D-eritro-2,3-bencildendioxibutírico crudo. El producto crudo es purificado para formar los cristales que se descomponen a 191-193°C, por cromatografía en polvo de celulosa seguido por recristalización en etanol acuoso, 2 g del producto crudo anterior son calentados con 10 ml de ácido clorhídrico al 5% a 50°C durante una hora, y la mezcla es extraída con acetato de etilo para eliminar benzaldehído. A continuación, la mezcla es hecha pasar a través de una columna de Amberlite IR.120 y la columna es eluída con amoníaco acuoso. El eluato es concentrado bajo presión reducida y el residuo es ajustado a pH 4 con ácido fórmico. La mezcla es dejada reposar durante la noche, con lo que se obtienen, en forma de cristales crudos, 0,8 g de ácido 4-(9-adenil)-D-eritro-2,3-dihidroxibutírico. Los cristales son purificados tal como se describe en el Ejemplo 4, para proporcionar 480 mg de cristales de la sal sódica.hemihidrato que se descomponen a 244-246°C. Después de purificación adicional tal como se describe en el Ejemplo 1, se obtienen cristales de punto de descomposición 266-268°C.

#### Ejemplo 6

(I) Una mezcla de 2,88 g de 4-cloro-5-nitro-6-amino-pirimidina, 1,49 g de ácido 4-amino-D-eritro-2,3-dihidroxibutírico, 3,6 g de bicarbonato de sodio, 80 ml de agua, y 40 ml de tetrahidrofurano, es agitada durante 11 horas a la temperatura ambiente. Después, se añaden a la mezcla 100 ml de agua y la mezcla es extraída con cloroformo para eliminar la 4-cloro-5-nitro-6-amino-pirimidina remanente.



La capa acuosa es ajustada a pH 3,5-4,0 con ácido clorhídrico al 10%, y los cristales precipitados son recogidos por filtración. Los cristales son secados para dar 2,58 g de ácido 4-[(6-amino-5-nitro-4-pirimidil)-amino]-D-eritro-2,3-dihidroxi-butírico en forma de polvo ligeramente amarillento que descompone a 215-218°C. Una cristalización posterior en agua proporciona prismas ligeramente amarillentos que se descomponen a 220-223°C.

I.R. nujol 3420, 3250, 3130, 2300, 1680 (sh)  
máx 1600, 1520, 1235, 1146, 1080 cm<sup>-1</sup>

U.V. máx en estado neutro y alcalino: 346 m $\mu$   
en estado ácido 342, 296, 242 m $\mu$

Poder rotatorio relativo:  $[\alpha]_D^{23} = +67^\circ$  (C = 1, -HClLN)

$[\alpha]_D^{23} = +32^\circ$  (C = 1, -NaOHLN)

Análisis calculado para C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub>N<sub>5</sub> :

C 35,17; H 4,06; N 25,64

Encontrado: C 34,84; H 4,18; N 26,02

(II-i) Una mezcla de 500 mg de ácido 4-[(6-amino-5-nitro-4-piridil)-amino]-D-eritro-2,3-dihidroxi-butírico, 200 ml de agua y 200 mg de 10% de paladio sobre carbono es agitada durante 45 minutos bajo presión de hidrógeno (presión inicial 2,17 kg/cm<sup>2</sup>). A continuación, el catalizador es separado por filtración y el filtrado es concentrado hasta sequedad bajo presión reducida sobre un baño María, cuya temperatura es mantenida a 60°C o una temperatura ligeramente menor de 60°C. De este modo, se obtiene ácido 4-[(5,6-diamino-4-pirimidil)-amino]-D-eritro-2,3-



-dihidroxi-butírico de modo cuantitativo, en forma de agujas ligeramente parduzcas. Cuando los cristales son recristalizados en agua, se obtienen cristales que se descomponen a 230-235°C.

- 5 I.R. <sup>nujol</sup> máx. ; 3300, 2320, 2000 - 1800, 1675,  
1600, 1560, 1500, 1130, 1040, 940 cm<sup>-1</sup>  
U.V. máx. 281,5 mμ (pH 6,42), 280 mμ (pH 12,25),  
289 mμ (pH 1,31)

Análisis calculado para: C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>

- 10 Encontrado : C 39,50; H 5,39; N 28,80  
: C 39,17; H 5,56; N 28,53

- 15 Las agujas ligeramente parduzcas anteriores son disueltas en una mezcla de 30 ml de dimetilformamida y 7 ml de disulfuro de carbono y la mezcla es calentada a 80°C durante 5 horas. A continuación, la mezcla de reacción es concentrada bajo presión reducida y el residuo es pulverizado en éter, con lo que se obtienen 410 mg de ácido -
- 20 4-(8-mercapto-9-adenil)-D-eritro-2,3-dihidroxi-butírico en forma de polvo pardo. El polvo es disuelto en 25 ml de agua y es decolorado. La solución es ajustada a pH 7,0 con hidróxido de sodio acuoso y se añaden 2 ml de níquel de Raney W-7. La mezcla es calentada a reflujo durante 2 horas, es enfriada, es filtrada y el filtrado es concentrado bajo presión reducida para dar 135 mg de cristales blancos ligeramente amarillentos. Los cristales son recristalizados en agua y los cristales resultantes son secados
- 25 bajo presión reducida a aproximadamente 45°C para dar placas incoloras de 4-(9-adenil)-D-eritro-2,3-dihidroxi-butirato de sodio.hemihidrato, que se descompone a 255-258°C.



Una cristalización adicional en etanol acuoso al 70% proporciona la mezcla purificada que se descompone a 266-268°C.

Los espectros de I.R. y U.V. de los cristales son idénticos a los del producto del Ejemplo 1.

- 5 (II-ii). 273 mg de ácido 4-(6-amino-5-nitro-4-piridil)-amino-D-eritro-2,3-dihidroxi-butírico son disueltos en una mezcla de 20 ml de ácido clorhídrico al 1% y 20 ml de metanol. Se añaden a la solución 270 mg de 10% de paladio de carbono y la mezcla es agitada durante 2 horas
- 10 bajo presión de hidrógeno (presión inicial 2,45 kg/cm<sup>2</sup>). A continuación, el catalizador es separado por filtración y el filtrado es concentrado bajo presión reducida con calentamiento a una temperatura que no pasa de 60°C. Se añaden 4 ml de ácido fórmico al ácido 4-(5,6-diamino-4-pirimidil)-amino-D-eritro-2,3-dihidroxi-butírico resultante
- 15 y la mezcla es calentada a aproximadamente 60°C hasta que se forma una solución. La solución es concentrada bajo presión reducida y se añaden al residuo 4 ml de formamida. La mezcla es calentada a 120°C durante 1 hora y a 160°C durante 30 minutos, sucesivamente. Después de enfriar, la
- 20 mezcla es vertida en 30 ml de agua y la mezcla es filtrada. El filtrado es hecho pasar a través de una columna de Amberlite IR-120 (forma H<sup>+</sup>) y la columna es eluida con amoníaco acuoso al 5%. La solución en amoníaco es concentrada y el residuo es
- 25 recristalizado en agua, con lo que se obtienen 70 mg de sustancia sólida ligeramente amarillenta que se descompone a 270-280°C. La sustancia es cristalizada nuevamente en agua para proporcionar 31 mg de ácido 4-(9-adenil)-D-eritro-2,3-dihidroxi-butírico purificado
- 30 que se descompone a 261-263°C, que es idéntico a la len



tinacina natural.

15 15 mg del producto son disueltos en 1 ml de solución  
acuosa que contiene 7,5 mg de bicarbonato de sodio y la so-  
lución es concentrada hasta sequedad bajo presión reduci-  
da. El residuo es recristalizado en etanol acuoso al 80%  
y los cristales resultantes son secados bajo presión redu-  
cida a aproximadamente 45°C, con lo que se obtienen cuan-  
titativamente placas finas incoloras de 4-(9-adenil)-D-eri-  
tro-2,3-dihidroxi-butirato de sodio-hemihidrato que se  
10 descomponen a 241-243°C. Una cristalización adicional en  
etanol al 70% proporciona una muestra purificada de punto  
de descomposición 266-268°C, que es idéntica al producto  
del Ejemplo 1 por la comparación de los espectros I.R. y  
U.V. y por cromatografía en capa delgada.

15 Ejemplo 7

(I) 2,0 g de 6-amino-5-nitro-4-cloro-pirimidina son  
disueltos en 50 ml de acetona y la solución es añadida go-  
ta a gota a 15 ml de una solución acuosa que contiene 1,6  
g de ácido 4-amino-DL-eritro-2,3-dihidroxi-butírico, 0,66  
20 g de hidróxido de potasio y 1,0 g de carbonato de pota-  
sio. La mezcla es agitada a 40-45°C durante 3 horas. Des-  
pués, se elimina acetona desde la mezcla por evaporación  
y la mezcla es filtrada. El filtrado es acidificado con  
ácido fórmico y los cristales resultantes son recogidos  
25 por filtración, con lo que se obtienen 1,86 g de ácido  
4-[(6-amino-5-nitro-4-pirimidil)-amino]-DL-eritro-2,3-di-  
hidroxi-butírico que se descomponen a 195-197°C.

19



I.R.  $\nu_{\text{máx.}}$  ; 3400, 3280, 3100, 1650, 1610  
1520, 1460, 1380, 1230  $\text{cm}^{-1}$

U.V.  $\lambda_{\text{máx}}$  ; 346  $\text{m}\mu$  en  $\text{H}_2\text{O}$

342  $\text{m}\mu$  en  $\text{H}^+$

346  $\text{m}\mu$  en  $\text{OH}^-$

5

10

15

20

25

30

(II) 1,8 g de ácido 4-[[6-amino-5-nitro-4-pirimidil)-amino]-DL-eritro-2,3-dihidroxi-butírico son disueltos en 20 ml de solución acuosa que contiene 0,37 g de hidróxido de potasio. Se añade a la solución 1 ml de níquel Raney, y la solución es agitada bajo presión de hidrógeno (presión inicial 4,2  $\text{kg}/\text{cm}^2$ ). A continuación, el catalizador de níquel se elimina por filtración y el filtrado es neutralizado con ácido fórmico. El filtrado es concentrado hasta sequedad bajo presión reducida y la sustancia viscosa remanente es disuelta en agua. La solución es hecha pasar a través de una columna de Dowex 50 W (forma  $\text{H}^+$ ) y la columna es eluída con amoníaco acuoso. El eluato es concentrado hasta sequedad bajo presión reducida, con lo que se obtienen 700 mg de ácido 4-[[5,6-diamino-4-pirimidil)-amino]-DL-eritro-2,3-dihidroxi-butírico en forma de un polvo amorfo. Se añaden al polvo 15 ml de formamida y la mezcla es calentada a reflujo moderadamente en una atmósfera de nitrógeno durante 30 minutos. A continuación, se elimina formamida desde la mezcla por evaporación bajo presión reducida y se añade al residuo una cantidad suficiente de etanol para provocar cristalización. Los cristales son purificados por cromatografía en capa delgada preparativa sobre gel de sílice (disolvente eluyente: ácido acético:n-butanol:agua = 1:4:5) y sucesivamente por cromatografía con Dowex 50 W (forma  $\text{H}^+$ ) con lo que se obtienen en for

26 JUL



5 ma de cristales, 200 mg de ácido 4-(9-adenil)-DL-eritro-2,3-dihidroxi-butírico. Los cristales son purificados adicionalmente por recristalización en etanol acuoso para dar cristales purificados que se descomponen a 252-254°C.

nujol  
I.R. máx. ; 3250, 3180, 3100, 1680,  
1610, 1510, 1460, 1415,  
1380, 1200 cm<sup>-1</sup>

10 Esta solicitud, que corresponde a las presentadas en Japón el 26 de Mayo de 1969, bajo los números 41.130 y 41.131, y el 30 de Mayo de 1969, bajo el número 42.625, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

15

REIVINDICACIONES

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

25 1º.- Un procedimiento para preparar ácido 4-(9-adenil)-2,3-dihidroxi-butírico y sus sales farmacéuticamente aceptables, que comprende hacer reaccionar un acetal o cetal de 2,3-dihidroxi-eritronolactona repre-

20.7.72



26 JUL



con derivados de tiocarbonato para dar ácido 4-(8-mercapto-9-adenil)-2,3-dihidroxi-butírico seguido por una reacción de desulfuración convencional, y si se requiere, convertir el producto ulteriormente en sus sales.

5

3º.- Un procedimiento para preparar ácido 4-(9-adenil)-2,3-dihidroxi-butírico y sus sales farmacéuticamente aceptables, que comprende hacer reaccionar 4-halo-5-nitro-6-amino-pirimidina con ácido 4-amino-2,3-dihidroxi-butírico para producir ácido 4-[(6-amino-5-nitro-4-pirimidil)-amino]-2,3-dihidroxi-butírico, reducir el compuesto a ácido 4-[(5,6-diamino-4-pirimidil)-amino]-2,3-dihidroxi-butírico, y someter dicho ácido a la reacción con ácido fórmico o sus derivados, y si se requiere convertir el producto ulteriormente en sus sales.

10

15

4º.- Un procedimiento para preparar ácido 4-(9-adenil)-2,3-dihidroxi-butírico.

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

20

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

Madrid,

26 JUL. 1972

P.A.

Alberto de Eizaburu  
Por Poder

19.7.72 IFG