

403142



Int. Cl. C07D

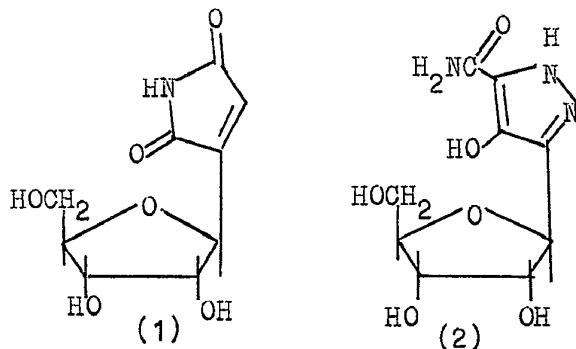
memoria descriptiva

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE _____
SUBCLASE _____

CLASE DE REGISTRO	Una Patente de Invención, por veinte años en España.
NOMBRE Y NACIONALIDAD DEL SOLICITANTE	INTERNATIONAL CHEMICAL & NUCLEAR CORPORATION. - sociedad de EE.UU. -
RESIDENCIA Y DOMICILIO	PASADENA, CALIFORNIA 91101 (EE.UU) 171 South Lake Avenue.
<input type="checkbox"/> OBJETO	" Procedimiento para la preparación de 1,2,4-triazol nucleosidos. "
INVENTORES	Joseph Theodore WITKOWSKI y Roland Kenith ROBINS, - de nacionalidad estadounidense -
PRIORIDADES	Solicitud patente EE.UU. No. 149.017 del 1 de Junio de 1971 Solicitud patente EE.UU. No. 240.252 del 31 de Marzo de 1972.



Al presente los únicos dos agentes antibióticos nucleosídicos conocidos teniendo anillos heterocíclicos de 5 miembros son: showdomicina y pirazomicina que, según se informa, tienen respectivamente las estructuras 1 y 2:



Entre los agentes antivirales nucleosídicos sintéticos conocidos al presente, los más importantes son: 5-yodo-2'-deoxyuridina (5-IDU), 9-β-D-arabinofuranosilo adenina (Ara-A) y 1-β-D-Arabinofuranosilo citosina (Ara-C) de estos agentes sólo 5-IDU (en solución de 0,1% de peso) está comercialmente disponible, específicamente como agente antiviral, y este compuesto adolece del inconveniente de baja solubilidad y alta toxicidad, de lo que por ello resulta la indeseablemente gran dilución, en que se emplea ahora.

Alonso y otros en J. Heterocyclic Chem. 7, 1269-72 (1.970) informan sobre la preparación de 1-(β-D-ribofuranosil) -4-carbozamido-1,2,3-triazol, pero no hacen ninguna mención de actividad biológica. Witkowski y Robins en "The Chemical Synthesis of the 1,2,4-triazole Nucleosides related to Uridina, 2'-Deoxyuridine, Thymidine and Cytidine", J. Org. Chem. 35, 2635-41 (1.970) sugieren varios análogos de 1,2,4-triazol nucleósidos como candidatos para comprobación

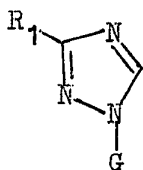


403142

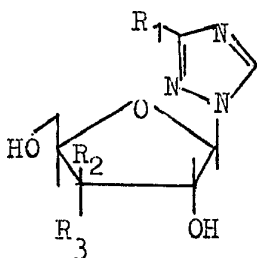
- 2.-

1 biológica, pero no se anota ninguna eficacia particular y la
propia comprobación posterior ha demostrado que, de los aná-
logos aquí informados, solamente 5-bromo-3-nitro-1-(2,3,5-
5 tri-O-acetil- β -D-ribofuranosil) -1,2,4-triazol exhibe aún li-
gera actividad antiviral e incluso esta actividad se cree que
es atribuible meramente a la citotoxicidad del compuesto.

De acuerdo con este invento, se preparan compues-
tos de la fórmula



15 en que "G" es una mitad de pento-furanosilo, preferentemente
caracterizado por trans de 2'oxígeno al aglicon de triazol,
siendo R₁ ciano-, carboxamido-, tiocarboxamido-, -metilcarbo-
xilato, carboxamidoxima, -carboxamidina, o una sal de adición
de ácido, fisiológicamente aceptable del último grupo. El
invento también comprende los análogos O-acilados de los com-
20 puestos precedentes y los 5'-fosfatos y 3', 5'-fosfatos cí-
clicos de los mismos, así como las sales de amonio y de metal
de álcali de los fosfatos. Las ejecuciones preferidas inclu-
yen compuestos de la estructura



30

403142



22 MAY 1972

- 3.-

1 en que R_1 es como se define anteriormente y una de las R_2 ó
2 R_3 es hidrógeno, siendo la otra hidroxilo, así como 5'-fos-
3 fatos y fosfatos 3',5'-cíclicos de los mismos. Los compues-
4 tos de acuerdo con este invento muestran actividad antiviral
5 y, en ejecuciones no aciladas o "desbloqueadas" muestran sus-
6 tancialmente mayor solubilidad acuosa que los agentes antivir-
7 ales nucleosídicos anteriormente informados. El nucleósido
8 preferido del invento de 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-
9 -3-carboxamida, ha presentado un amplio espectro de activi-
10 dad antiviral, así como actividad contra tumores.

11 Metil 1,2,4-triazol-3-carboxilatos y 3-ciano-1,2,4-
12 triazol son precursores y caminos sintéticos alternativos a
13 los 1,2,4-triazol nucleósidos del invento. El anterior com-
14 puesto puede ser preparado convencionalmente por oxidación
15 de 3-metil-1,2,4-triazol seguido de esterificación del ácido
16 resultante, de acuerdo con el procedimiento de Cipens y Grin-
17 steins' Latvijas PSR Zinatnu Akad. Vestis., Kim. Ser. (1.965)
18 (2) 204-08 (véase C.A. 63, 13.243, 1.965). 3-ciano-1,2,4-
19 triazol se prepara por una síntesis de grados múltiples in-
20 formada por Cipens y otros, según lo arriba indicado, o más
21 convenientemente por la reacción de adición de cianógeno e
22 hidracina para formar hidracida de ácido 1-cianoformimídico,
23 seguido de cierre de anillo, catalizado con ácido en trietil
24 ortoformato para obtener el compuesto 3-ciano. Por un cami-
25 no, se forma el derivado de trimetilsililo del metil 1,2,4-
26 triazol-3-carboxilato, en rendimiento cuantitativo por reac-
27 ción con hexametildisilizano con reflujo y se hizo reaccio-
28 nar con un apropiado halo azúcar GX O-acilado para formar
29

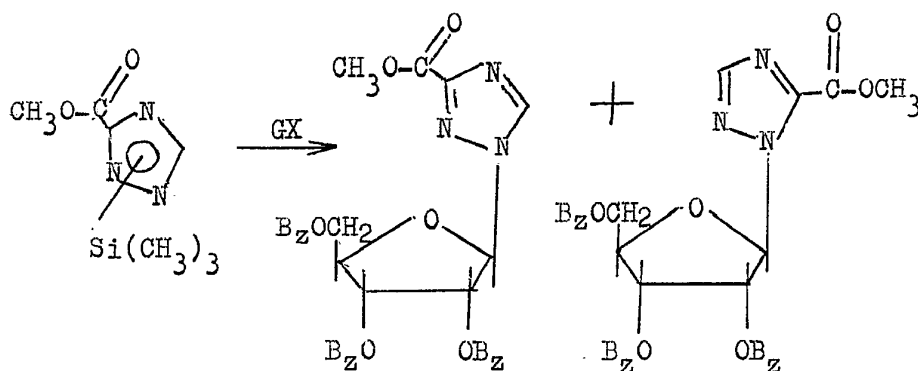
30

403142



- 4.-

1 por ejemplo, una mezcla de metil éster O-benzoilato de áci-
do 1-(β -ribofuranosil) 1,2,4-triazol-3-carboxílico y metil
éster de ácido 5-carboxílico,, es decir:

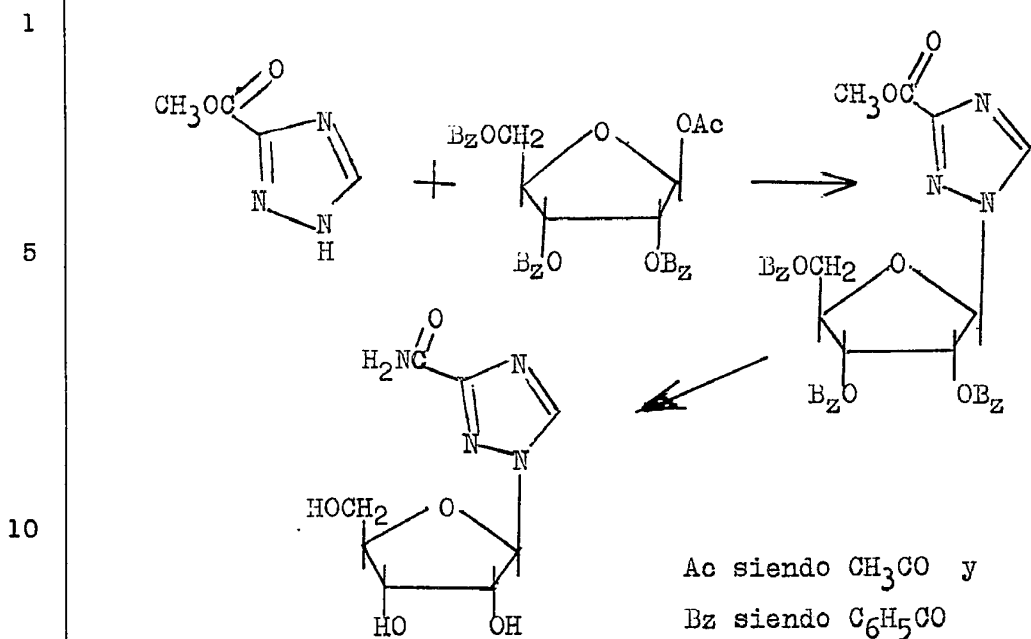


15 en que Bz es benzoilo. El metil éster de ácido 3-carboxílico
co se separa por cristalización fraccionada o, preferentemen
te, por cromatografía de columna sobre gel de silicio. La
debenzoilación y aminólisis da la 1-(β -D-ribofuranosil)-1,
2,4-triazol-3-carboxamida.

20 El procedimiento preferido de síntesis es por la
fusión catalizada con ácido de un triazol apropiadamente
sustituido con azúcar bloqueado de O-acilo (en este caso
1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofunarosa) seguido
por desbloqueo y aminólisis, es decir:

25

30



15 Alternativamente puede obtenerse fusión con 3-ciano-1,2,4-triazol con posterior conversión del 3-ciano-1-(2,3,5-tri-O-acetil- β -D-ribofuranosil) 1,2,4-triazol al 3-carboxamido nucleosido activo por reacción con peróxido de hidrógeno en presencia de amoníaco acuoso, teniendo rendimientos menores que cuando la fusión ocurre con metil 1,2,4-triazol-3-carboxilato.

20 El 3-ciano-1-(2,3,5-tri-O-acetil- β -D-ribofuranosil) -1,2,4-triazol, bien sea obtenido por la siliación o por el procedimiento de fusión, es un intermediario útil para la formación de los nucleosidos activos de 1-(β -D-ribofuranosil) -1,2,4-triazol-3-tiocarboxamida del invento como por

25 reacción del mismo con sulfuro de hidrógeno en presencia de trietilamina seguido de deacilación, donde el nucleosido es empleado como el intermediario.

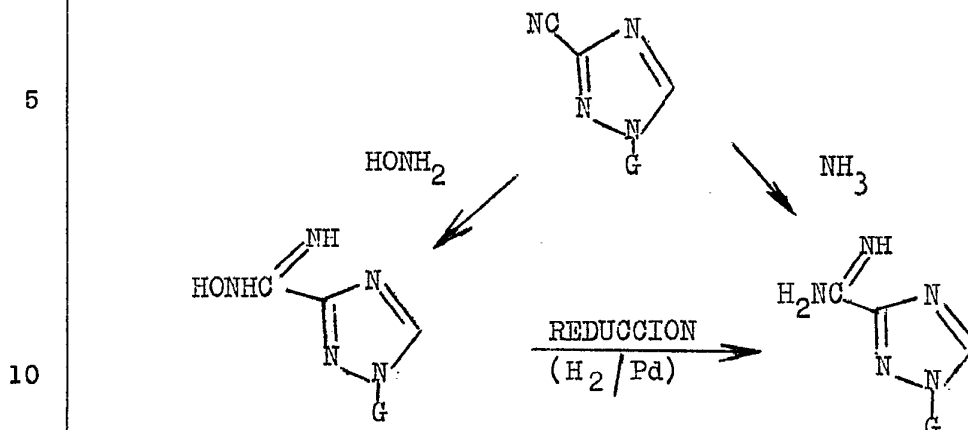
30 Similarmente las 1,2,4-triazol-3-carboxamidinas nucleosídicas pueden hacerse de 3-ciano-1,2,4-triazol nu -

403142



- 6.-

1 cleosida, bien sea con o sin formación de intermediarios del
análogo de 3-carboxamidoxima, es decir



donde G es una mitad de glicosilo, como se define arriba.

15 La carboxamidina se obtiene en forma libre de la síntesis
que comprende el intermediario de carboxamidoxima. Por el
contrario, la preparación preferida directamente del compues
20 to de 3-ciano en presencia de cloruro de amonio, produce la
carboxamidina en la forma de su sal clorhídrica, y otras sa-
les de adición de ácido fisiológicamente aceptables (por
ejemplo, sales de adición de ácido bromhídrico, yodhídrico,
25 cítrico, acético, sulfúrico, fosfórico) pueden obtenerse de
ello por intercambio de iones o alternativamente por neutra-
lización de la sal de cloruro de hidrógeno con bicarbonato
de sodio seguido de reacción de la resultante carboxamidina
libre con un ácido apropiado.

25 Los nucleosidos 3-carboxamido, 3-tiocarboxamido y
3-carboxamidina del invento pueden convertirse en la corres-
pondiente sal de 5'-fosfato o amonio o de metal de álcali
del fosfato y pueden administrarse como tales. Similarmente,
30 los 5'-fosfatos de los 3-metil carboxilatos, 3-ciano y 3-

403 142



24 MAY 1971

- 7.-

1 carboxamidoxima intermediarios compuestos del invento pueden
formarse antes de las operaciones en la posición 3 del agli-
con de triazol, que conduce a la formación de los nucleotidos
activos. Los expertos en la materia conocen el modo y manera
de fosforilarizar los nucleosidos. En una ejecución preferi-
5 da del invento, el 5'-fosfato de 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-
triazol-3-carboxamida se forma por reacción de metil éster de
ácido 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxílico con
POCl₃ en trimetil fosfato, seguido de hidrólisis en agua de
10 hielo para producir el 5'-fosfato libre. La formación de la
sal de amonio y aminolisis del metil éster ocurren simultá-
neamente con el tratamiento con amoniaco acuoso. Sales de me-
tal de álcali o el 5'-fosfato libre del nucleotido de 1-(β -
D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida entonces puede
15 obtenerse de la sal amónica del fosfato por intercambio de
iones.

Para transporte celular mejorado, los 3', 5'-cíclic-
cos fosfatos de los compuestos activos carboxamido, tiocarbo-
xamido y carboxamidina del invento pueden asegurarse por ci-
20 clización de dicitclohexilcarbodiimida (DCC) de correspondien-
tes 5'-fosfatos. Alternativamente, 5'-fosfato del ciano-metil-
carboxilato y de intermediarios de carboxamidoxima pueden ci-
clizarse antes de las operaciones en la posición 3 del agli-
con, que conduce a dichos nucleotidos cíclicos activos. En
25 cualquier caso pueden emplearse los fosfato cíclicos en forma
libre o en la forma de sales de amonio o de metal de álcali,
como en el caso de los 5'-fosfatos.

Aunque el invento ha sido descrito con particular re-
ferencia a acetilo o benzoilo bloqueando los 2', 3' y 5' hi-
30 droxilos de la mitad de glicosilo, se entenderá que puede

403142

24 MAY 1972

- 8.-

1 emplearse cualquier grupo acilo para preservar aquellos hi-
droxilos contra reacciones laterales, tales como deshidrata-
ción durante la síntesis de los agentes activos del invento.
Sutherland y otros en Biochim. et Biophys Acta 148, 106
5 (1.967) han informado que la acilación de nucleotidos cícli-
cos mejora el transporte celular. Similarmente, hidroxilos
de glicosilo, de otro modo libres de los nucleotidos y nu-
cleosidos del invento, pueden ser acilados para solubilidad
10 mejorada de lípido o, por ejemplo, provistos de grupos de
alquilo o alcarilo sulfonilo, tales como por ejemplo, tosilo,
mesilo, brosilo, nisilo, etc. al mismo fin.

Mientras que el "grupo restante" -1' de los reac-
tivos de azúcar, arriba discutidos, ha estado caracterizado
15 como acetilo o, en el procedimiento de sililación, como halo-,
se entenderá que puede emplearse cualquier mitad desplazable
sometida a amenabilidad por separación de productos secunda-
rios.

Mientras que, a título de ejemplo, arriba se ha
20 hecho referencia a mitades de β -D-ribofuranosilo y xilofura-
nosilo, se apreciará que el invento incluye el empleo de
otras mitades de glicosilo, también, es decir, 2'-deoxi- β -
D-ribofuranosilo, 2'-deoxi- α -D-ribofuranosilo y β -D-arabino-
furanosilo. En el caso de los azúcares precursores de 2'
25 -deoxi triazol nucleosidos empleados, puede incluirse 2-deoxi
-1,3,5-tri-O-acetil-D-ribofuranosa ó 1-O-acetil-2-deoxi-3,5-
di-O-(para -toluol) -D-ribofuranosa, procediendo esta últi-
ma del tratamiento de cloruro de 2-deoxi-3,5-di-O-(para to-
luoil) -D-ribofuranosilo con acetato mercúrico con tetrahidro
30 furano.



1 triazol
Los nucleosidos de arabinosilo/son preparados por
el procedimiento de sililación empleando cloruro de 2,3,5-
tri-O-benzil-D-arabino-furanosilo.

5 Estando dada la actividad bilógica de los ribofu-
ranosil triazoles del invento parecería que debería seguir
la actividad en los correspondientemente sustituidos arabi-
nofuranosil triazoles, especialmente en vista de la conocida
actividad antiviral de "Ara-A" y "Ara-C" discutidas arriba.

10 Similarmente se sugiere la actividad biológica de los corres-
pondientes 2'-deoxi- β -D-ribofuranosil triazoles por la cono-
cida actividad antiviral de 5-yodo-2'-deoxi uridina, estando
dada una vez la eficacia de los ribofuranosil triazoles, del
invento, especialmente contra los virus esencialmente DNA,

15 semejantes a los tipos de Herpes 1 y 2. Sin embargo, cuando
estos compuestos fueron probados contra virus del ejemplo 16,
infra, esencialmente no fué vista ninguna actividad antivi-
ral, aparentemente debido a la incapacidad de las encimas
presentes en el cultivo del tejido para fosforilazar nucleo-

20 sidos: libres, cuyas mitades de glicosilo carecen de átomos
trans 2'-oxígeno. Por lo tanto, estos nucleosidos deberían
fosforilizarse sintéticamente a la forma activa de 5'-fosfa-
to supuesta, antes de la administración. Alternativamente,
el 5'-fosfato puede ser ciclizado antes de la administración,

25 en división en vivo produciendo el metabolito activo de 5'-
fosfato. El procedimiento de fosforilación es esencialmente
semejante al descrito arriba para la preparación de los ri-
botidos.

30

e

El invento se ilustrará y describirá ulteriormente

403142



24 MAY 1972

- 10.-

1 en los siguientes ejemplos, en que todas las partes y tantos
por ciento son de peso y todas las temperaturas se dan en
grados centígrado a no ser que se indique de otro modo.
5 Todos los procedimientos evaporativos fueron realizados en
un evaporador rotativo a presión disminuida a 35° C.

EJEMPLO 1.

Metil éster de ácido 1-(2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)
-1,2,4-triazol-3-carboxílico y metil éster de ácido 1-(2,3,
10 5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-5-carboxíli
co. (Procedimiento de sililación).

(A). Preparación de metil N-(trimetilsilil) -1,2,
4-triazol-3-carboxilato.

Una suspensión de metil 1,2,4-triazol-3-carboxila
15 to (14,0 g. 110 mmol) y hexametildisilizano (100 ml) se hicie
ron refluir con agitación hasta que cesó la evolución de amo
niaco (aproximadamente 2 horas) el exceso de hexametil-disi
lazano se separó a presión disminuida para procurar 20,6 g.
(100%) del derivado de N-trimetilsilil de metil 1,2,4-tria
20 zol -3-carboxilato.

(B). Ribosilación con azúcar halo.

Una solución conteniendo metil N-(trimetilsilil)
-1,2,4-triazol -3,-carboxilato (20,6 g., 110 mmol) y bromuro
de 2,3,5-tri-O-benzoil-D-ribofuranosilo (52,5 g., 100 mmol)
25 en acetonitrilo anhidro (30 ml.) se mantuvo a 25° durante 3
días. El disolvente fué separado y el residuo fué recrista-
lizado desde etanol. La recristalización del material desde
etil acetato-etanol y cromatografía de columna de los filtra
dos sobre gel de sílice con cloroformo procuraron metil éster

30

403142



21 MAY 1972

. - 11.-

1 de ácido 1-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxílico puro (25,1 g. 44,0%) con punto de fusión 137 - 139°.

Análisis.

5 Calculado para $C_{30}H_{25}N_3O$: C, 63,04; H, 4,41; N, 7,35
Hallado: C, 62,91; H, 4,17; N, 7,10

El componente de migración más rápida de la columna de gel de silicio fué cristalizado desde etanol para procurar metil éster de ácido 1-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-5-carboxílico (13,2 g., 23,1%) con punto de fusión 122 - 124°.

Análisis. Hallado: C, 63,20; H, 4,35; N, 7,12.

EJEMPLO 2

15 Metil éster de ácido 1-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxílico. (Procedimiento de fusión).

Una mezcla de metil 1,2,4-triazol-3-carboxilato (12,7 g, 100 mmol) y 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosa (55,4 g., 110 mmol) se calentó en un baño de aceite mantenido a 160 - 165°. Después de haberse fundido el azúcar se añadió agitando (p-nitrofenil) fosfato (4 mg.) y la mezcla fué calentada bajo presión disminuida a 160 - 165° durante 15 - 20 minutos. La cristalización del residuo desde etil acetato-etanol procuró 42,5 g. (74,5%) del producto con punto de fusión de 137 - 139°.

EJEMPLO 3

30 Metil éster de ácido 1-(2,3,5-tri-O-acetil- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxílico.

403142



- 12.-

1 Una mezcla de metil 1,2,4-triazol-3-carboxilato
(12,7g., 0,10 mol) y 1,2,3,5-tetra-O-acetil- β -D-ribofurano-
sa (31,8 g., 0,10 mol) se calentó en un baño de aceite man-
tenido a 160 - 165° hasta que se fundió el azúcar. Se añadió
5 bis (p-nitrofenil) fosfato (250 mg.) y se continuó el
calentamiento a 160 - 165° con agitación a presión disminu-
da durante 15 - 20 minutos. El residuo fué disuelto en ben-
ceno caliente, la solución fué filtrada y se añadió ciclohe-
xano al filtrado para dar el producto cristalino (30,0 g.,
10 77,8%) con punto de fusión de 107 - 109°.

Análisis.

Calculado para $C_{15}H_{19}N_3O_9$: C, 46,75; H, 4,97; N, 10,91

Hallado: C, 46,88; H, 5,03; N, 10,64

EJEMPLO 4

15 Metil éster de ácido 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-
carboxílico.

Una solución de metil éster de ácido 1-(2,3,5-tri-
O-benzoil- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxílico
20 (25,0 g. 43,8 mmol) y metóxido de sodio (400 mg.) en metanol
(200 ml.) se hizo refluir durante 45 minutos. La solución
fué neutralizada con Bio-Rad AG50-X2(H) se filtró y el fil-
trado fué concentrado en un jarabe. La cristalización del
jarabe desde metanol-etil acetato procuró 8,0 g. (70,5%) de
25 producto con punto de fusión de 117 - 119 grados.

Análisis.

Calculado para $C_9H_{13}N_3O_6$: C, 41,70; H, 5,06; N, 16,21

Hallado: C, 41,57; H, 5,13; N, 16,16

EJEMPLO 5

30



1 (A). 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida.

Método 1.

Una solución de metil éster de ácido 1-(2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxílico (16,0 g., 28,0 mmol) en metanol (300 ml., presaturado con amoniaco anhidro a 0°) se mantuvo en un matraz de presión cerrado a 25° durante 3 días. El disolvente fué separado y el producto fue cristalizado desde etanol para dar 6,7 g. (98%) de material con punto de fusión de 174 - 176°. La
5
10
15
20
25
30
recristalización del producto desde etanol acuoso procuró una segunda forma cristalina del nucleosido con punto de fusión de 166 - 168°.

Análisis:

Calculado para $C_8H_{12}N_4O_5$: C, 39,34; H, 4,95; N, 22,94

Hallado: C, 39,08; H, 5,10; N, 22,67

(B). 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida.

Método 2.

Una solución de metil éster de ácido 1-(2,3,5-tri-O-acetil- β -ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxílico (10,0 g., 26,0 mmol) en metanol (70 ml.) saturado a 0° con amoniaco anhidro, se mantuvo en un matraz de presión cerrado, a 25° durante 18 horas. El producto fué cristalizado desde etanol para dar 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida (5,70 g., 90,0%).

(C). 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida.

Método 3.

Una mezcla de 3-ciano-1-(2,3,5-tri-O-acetil- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol- (705 mg., 2,0 mmol), 28% de

403 142



- 14.-

1 amoniaco acuoso (20, ml.) y 30% de peróxido de hidrógeno
(3,0 ml.), se agitó a 25° durante 6 horas. Una porción ad-
cional de 3,0 ml. de 30% de peróxido de hidrógeno después
se añadió y continuó la agitación a 25° durante 12 horas.
5 El exceso de peróxido de hidrógeno fué destruido por adición
de negro de platino, la solución fué filtrada y el filtrado
fué evaporado a sequedad. El residuo fué disuelto en meta-
nol y se añadió a la solución gel de sílice (5,0 g). El di-
solvente fué separado y la mezcla de gel de sílice fué apli-
cada a una columna de gel de sílice. La elución con etil
10 acetato-metanol (1 : 1) procuró 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-
triazol-3-carboamida (250 mg., 51,2%.)

EJEMPLO 6

15 Sal amónica de fosfato cíclico de 1-(β -D-ribofuranosil)1,2,
4-triazol-3-carboxamida 3', 5'.

A sal amónica de 5' de fosfato de 1-(β -D-ribofura-
nosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida (5,7 g., 15,9 mmol) en
piridina, se añadió 4-morfolina+N,N'-diciclohexilcarboxami-
dina (4,65 g., 15,9 mmol) y la solución resultante fué eva-
porada al vacío durante varias veces con piridina para for-
20 mar un jarabe anhidro. El jarabe fué disuelto en un litro
de piridina y se añadió a gotas (a través de un periodo de
1 hora), por un condensador de reflujo, dentro de una solu-
ción anhidra de reflujo de diciclohexilcarbodiimida (16,4 g.,
25 79,6 mmol) en 3 litros de piridina. La solución fué reflui-
da durante otras 2 horas y se añadieron lentamente 200 ml.
de agua. Después de aproximadamente 12 horas, la solución
fué evaporada al vacío y se añadieron al residuo 200 ml. de

30



1 agua y 50 ml. de éter. La suspensión fué agitada vigorosa-
 mente y después filtrada. La capa acuosa fué separada y ex-
 traída con 2 x 100 ml. de éter. La capa acuosa fué pasada a
 través de Dowex 50 (forma NH_4^+ , 100 - 200 mallas) y el eluen
 5 te fué evaporado para obtener un jarabe. Aproximadamente
 100 ml. de etanol se añadieron al jarabe y la mezcla resul-
 tante se dejó reposar a temperatura ambiente durante cerca
 de 12 horas. El precipitado crudo fué filtrado y el filtra-
 do se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 semanas.
 10 El precipitado resultante (1,2 g.) se disolvió en 5 ml. de
 agua caliente y después se añadieron 10 ml. de etanol. Los
 cristales resultantes fueron filtrados y secados durante 12
 horas a 78°C . sobre P_2O_5 , al vacío para dar 1,5 g. de sal
 amónica de fosfato 3', 5'-cíclico de 1-(β -D-ribofuranosil)-
 15 1,2,4-triazol-3-carboxamida: $\alpha_D^{25} = 67^\circ$ ($\text{C} = 1, \text{H}_2\text{O}$); IR
 (KBr) 1688 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); punto de fusión 245d .

Análisis

Calculado para $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_7\text{P.NH}_3$; C, 29,73; H, 4,36; N, 21,66

Hallado: C, 29,86; H, 4,67; N, 21,47

EJEMPLO 7

Sal amónica de 5'-fosfato de 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-
 triazol-3-carboxamida.

Una solución de metil éster de ácido 1-(β -D-ribo-
 25 furanosil)-1,2,4-triazol-3-carboxílico (259 mg., 1,00 mmol)
 trimetil fosfato (3,0 ml.) y cloruro de fosforilo (0,20 ml)
 se agitaron a 0° durante 1,5 horas. Se añadió agua de hie-
 lo y la solución fué neutralizada con carbonato de sodio hi-
 drógeno acuoso. La solución fué extraída con cloroformo y

403142

24



- 16.-

1 la fase acuosa fué enfriada a 0° y saturada con amoniaco.
La solución fué mantenida a 25° durante 16 horas, después se
filtró y el filtrado fué concentrado a un pequeño volumen.
La adición de etanol dió un precipitado, que fué disuelto en
5 agua y pasado a través de una columna de Bio-Rad AG5OX-X2
(NH₄) (20 ml.). La concentración de las fracciones conte-
niendo el nucleotido procuraron la sal amónica de 5'-fosfato
de 1-(β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida (190
mg., 53,0%).

10 Análisis:

Calculado para C₈H₁₆N₅O₈P.H₂O; C, 26,74; H, 5,05; N, 19,50

Hallado: C, 26,78; H, 5,23; N, 19,68.

EJEMPLO 8

1-(β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-tiocarboxamida.

15 Una mezcla de 3-ciano-1-(2,3,5-tri-O-acetil-β-D-
ribofuranosil)-1,2,4-triazol (8,0 g., 22,7 mmol) trietilami-
na (14,0 ml.) y etanol (200 ml.) se agitó a 25° mientras se
hizo pasar gas de sulfuro de hidrógeno dentro de la solución
durante 2 horas. El disolvente fué separado y el residuo
20 fué tratado con una solución de metóxido de sodio (600 mg.)
en metanol (150 ml) durante 3 horas a 25°. Después de neu-
tralizarse la solución con Bio-Rad AG 50W-X2(H), se filtró
y el disolvente fué separado. La cristalización del produc-
to desde etanol acuoso procuró 4,5 g. (76,1%) de la tiocar-
25 boxamida con punto de fusión de 173 - 175°.

Análisis: Calculado para C₈H₁₂N₄O₃S:

C, 36,92; H, 4,65; N, 21,53; S, 12,32

Hallado: C, 37,12; H, 4,90; N, 21,26; S, 12,02.

30



24 MAY 1972

- 17.-

1

EJEMPLO 9

3-ciano-1-(2,3,5-tri-O-acetil- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol.

Una mezcla de 3-ciano-1,2,4-triazol (9,41 g., 0,10 mol) y 1,2,3,5-tetra-O-acetil- β -D-ribofuranosa (31,8 g., 0,10 mol) se calentó en un baño de aceite mantenido a 150°. Se añadió agitando bis (p-nitrofenil) fosfato (100 mg.) y se calentó a 150° a presión disminuida, que se continuó durante 15 minutos. El residuo se disolvió en cloroformo, la solución fue filtrada y el disolvente fue separado. La cristalización del residuo desde éter procuró 28,2 g. (80%) del producto con punto de fusión de 96-97°.

10

Análisis:

Calculado para $C_{14}H_{16}N_4O_7$: C, 47,73; H, 4,58; N, 15,90

15

Hallado

C, 47,79; H, 4,63; N, 15,95

Ejemplo 10

Hidrocloruro de 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida.

20

Una mezcla de 3-ciano-1-(2,3,5-tri-O-acetil- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol (7,04 g., 20,0 mmol) cloruro de amonio (1,07 g., 20,0 mmol) y amoníaco anhidro (150 ml) se calentó en una bomba a 85° durante 18 horas. Después de separar el amoníaco en exceso, el residuo fue cristalizado desde acetonitrilo-etanol para procurar 5,30 g. (95%) del producto con punto de fusión 177° - 179° dec.

25

Análisis:

Calculado para $C_8H_{14}ClN_5O_4$:

C, 34,35; H, 5,05; Cl, 12,68; N, 25,04

Hallado: C, 34,39; H, 5,06; Cl, 12,73; N, 24,99

30

403142



- 18.-

1

EJEMPLO 11

1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamidoxina.

5

Una solución de 3-ciano-1-(2,3,5-tri-O-acetil- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol (3,0 g., 8,52 mmol) y exceso de hidroxilamina en etanol (100 ml) se hizo refluir con agitación durante 2 horas. El disolvente fue separado y el producto fue cristalizado desde etanol acuoso para procurar 2,4 g. (90,7%) de la carboxamidoxina con punto de fusión de 212-214° dec.

10

Análisis:

Calculado para $C_8H_{13}N_5O_5$:

C, 37,07; H, 5,06; N, 27,02

Hallado: C, 36,89; H, 4,92; N, 27,23

EJEMPLO 12

15

1-(β -D-xilofuranosilo)-1,2,4-triazol-3-carboxamida

20

Una mezcla de tetra-O-acetil-D-xilofuranosa (12,7 g., 40,0 mmol) metil 1,2,4-triazol-3-carboxilato (5,08 g., 40,0 mmol) y bis-(p-nitrofenil) fosfato (50 mg) se calentó a presión reducida durante 20 minutos en un baño de aceite mantenido a 160-165°. El residuo fue enfriado y disuelto en cloroformo. El producto crudo fue purificado por cromatografía sobre gel de sílice con cloroformo-acetona (20 : 1). Una porción (20,0 g.) del metil éster de ácido 1-(2,3,5-tri-O-acetil- β -D-xilofuranosilo)-1,2,4-triazol-3-carboxílico purificado, fue tratado durante 16 horas a 25° con metanol saturado con amoníaco. El disolvente fue separado y el residuo fue cristalizado desde etanol acuoso para procurar 0,70 g del producto con punto de fusión de 194°-196,5°.

30

403142



- 20.-

EJEMPLO 14

1- $(\beta$ -D-arabinofuranosilo)-1,2,4-triazol-3-carboxamida.

Una solución conteniendo metil N-(trimetrilsilil)-1,2,4-triazol-3-carboxilato (4,12 g, 22,0 mmol) y 2,3,5-tri-O-bencil-D-arabinofuranosil cloruro (8,78 g, 20,0 mmol) en cloruro de metileno anhidro (100 ml) se mantuvo a 25° durante 48 horas. La solución fue evaporada a sequedad, el residuo fue disuelto en cloruro de metileno y la solución fue lavada con carbonato de hidrogeno de sodio acuoso y agua. La solución de cloruro de metileno fue desecada sobre sulfato de magnesio, filtrada y concentrada a un jarabe, que fue aplicado a una columna de gel de sílicio, empaquetado en benceno. La elución de la columna con benceno-éter (7:3) produjo 1,9 g del producto de jarabe, que fue tratado con metanol (50 ml) saturado a 0° con amoniaco anhidro en un matraz de presión a 25° durante 48 horas. El disolvente fue separado y ^{el} producto fue cristalizado desde cloruro de metileno-ciclohexano para procurar 1,3 g. (12,6%) de 1-(2,3,5-tri-O-bencil- β -D-arabinofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida con punto de fusión de 100 - 102°.

Análisis: Calculado para $C_{29}H_{30}N_4O_5$:

C, 67,69; H, 5,88; N, 10,89

Hallado: C, 67,82; H, 5,70; N, 10,94

Una suspensión de negro de paladio y metanol (20 ml) se preparó por reducción de cloruro de paladio (300 mg) con hidrogeno y a esto se añadió una solución de 1-(2,3,5-tri-O-bencil- β -D-arabinofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida (600 mg) en metanol (25 ml). La mezcla fue sacudida en un aparato de hidrogenación a 25 libras por pulgada cuadra-

403142



- 21.-

1 da durante 2 horas a 20°. El catalizador fué separado por
filtración y se hizo pasar la solución a través de una co-
luna de Amberlite IR45 (OH) (15 ml). El disolvente fué
separado y el residuo fué cristalizado desde etanol para dar
5 250 mg (88,5%) del producto con el punto de fusión de 189 -
191°.

Análisis. Calculado para $C_8H_{12}N_4O_5$:
C, 39,34; H, 4,95; N, 22,94
Hallado: C, 39,25; H, 4,86; N, 23,09

10

EJEMPLO 15

(A) 1-O-acetil-2-deoxi-3,5-di-O-p-toluoil-D-ribofuranosa.

Una mezcla de 2-deoxi-3,5-di-O-p-toluoil-D-ribofu-
ranosil cloruro (15,6 g. 40,0 mmol), acetato mercurico (12,7
15 g. 40,0 mmol) y tetrahidrofurano (220 ml) se agitó a 25° duran-
te diez horas. El disolvente fué separado y se añadió cloro-
formo al residuo. La mezcla fué extraída con yoduro potási-
co acuoso al 30% (cuatro porciones de 60 ml) y agua. La fase
orgánica fué desecada sobre sulfato de magnesio, filtrada y
concentrada en un jarabe (16,0 g. 97,0%).

15

20

La cristalización de una porción del producto des-
de ciclohexano-benceno, produjo material puro con punto
de fusión de 88 - 91°.

Análisis. Calculado para $C_{23}H_{24}O_7$: C, 66,98; H, 5,87

Hallado: C, 67,23; H, 5,97.

25

(B) Metiléster de ácido 1-(2-deoxi-3,5-di-O-p-toluoil- α -D-
ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxílico y metilester de
ácido 1-(2-deoxi-3,5-di-O-p-toluoil- β -D-ribofuranosil)-1,2
4-triazol-3-carboxílico.

30

403142



- 22.-

1 Una mezcla de 1-O-acetil-2-deoxil-3,5-di-O-p-toluodil-D-ribofuranosa (4,54 g., 11,0 mmol), metil 1,2,4-triazol-3-carboxilato (1,27g, 10,0 mmol) y bis (p-nitrofenil) fosfato (10 mg.) se calentó con agitación a presión disminuida durante 5 te 10 - 15 minutos en un baño de aceite mantenido a 150°. El residuo fué disuelto en cloruro de metileno y la solución fué filtrada, después lavada con carbonato de hidrógeno sódico acuoso y agua. La fase orgánica fué desecada sobre sulfato de magnesio, filtrada y evaporada a un jarabe.

10 Cromatografía de columna de esta mezcla anomérica sobre gel de silicio con cloroformo produjo el anómero- α que fué cristalizado desde ciclohexano-cloruro de metileno para dar 780 mg. de producto puro con punto de fusión de 94 - 95°.

15 Análisis. Calculado para $C_{25}H_{25}N_3O_7$:

C, 62,62; H, 5,26; N, 8,76:

Hallado: C, 62,44; H, 5,16; N, 8,64.

20 Fracciones subsiguientes de la columna de gel de sílice contenían una mezcla de los anómeros α y β . Estas fracciones fueron combinadas y la mezcla fué además purificada por cromatografía de columna sobre gel de sílice con cloroformo para producir el anómero β como un jarabe.

(C) 1-(2-deoxi- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida.

25 Una solución de metil éster de ácido 1-(2-deoxi-3,5-di-O-p-toluodil- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxílico (650 mg., 1,35 mmol) en metanol (20, ml) saturado a 0° con amoníaco anhidro se mantuvo a 25° durante 3 días en un matraz de presión cerrado, El disolvente fué separado y el residuo fué aplicado a una columna de gel de sílice. La

30

403142



- 23.-

1 elución con etil acetato-metanol (9 : 1) produjo 1-(2-deoxi-
β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida (250 mg., --
80,8%) como un sólido amorfo.

Análisis Calculado para $C_8H_{12}N_4O_4$;

5 C, 42,10; H, 5,30; N, 24,55

hallado: C, 41,86; H, 5,12; N, 24,49

D). 1-(2-deoxi-α-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxa-
mida.

10 Una solución de metil éster de ácido 1-(2-deoxi-3,
5-di-O-p-toluoil-α-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carbo-
xílico (780 mg., 1,63 mmol) en metanol (25 ml.) saturado a
0° con amoniaco anhidro, se mantuvo en un matraz de presión
cerrado, a 25° durante 3 días. El disolvente fué separado
15 y el producto crudo fué aplicado a una columna de gel de sili-
cio. La elución con etil acetato-metanol (9 : 1) produjo
1-(2-deoxi-α-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida
(350 mg., 94,4%) como un sólido amorfo.

Análisis. Calculado para $C_8H_{12}N_4O_4$: C,42,10; H,5,30; N,24,55.

20 Hallado C,41,88; H,5,48; N,24,29.

Por el mismo procedimiento empleado para convertir
los anómeros separados de metil éster a sus respectivas car-
boxamidas puede hacerse reaccionar la mezcla anomérica de
los metil ésteres, formados en la parte (B) arriba citada,
25 con amoniaco para producir una mezcla de los anómeros α y β
de la carboxamida.

EJEMPLO 16

Los agentes antivirales del invento se comprobaron
respecto a la actividad, tanto contra virus pequeños, como

30

403 142

24



- 24.-

1 grandes de ambos tipos DNA y RNA por el método de recuento
de virus (VR) de Sidwell y otros, Appl. Microbiol. 22, 797
(1971). V.R. > 1.0 es indicativo de actividad antiviral de-
5 finida, V.R. de 0,5 - 0,9 es indicativa de moderada activi-
dad antiviral y V.R. < 0,5 sugiere ligera o no aparente ac-
tividad antiviral. Los resultados abajo citados, que por
razón de comparación incluyen datos, tomados de varios agen-
tes antivirales conocidos, fueron obtenidos probando sobre
paneles plásticos Microtest II (Falcón Plastics) con una mo-
10 nocapa de celdas KB ó RK13.

De los virus empleados en la prueba, el tipo 1 de
herpes está implicado en los labios (herpes labial por frio),
herpes keratitis y herpes encephalitis. El tipo 2 de herpes
causa herpes genitalis, una forma común y comunicable de en-
15 fermedad venérea. Mixoma causa la muerte de los conejos do-
mésticos y del campo, precedida de enfermedad respiratoria
y de hinchazón grave. Pseudorabies causa parálisis bulbar
infecciosa, también conocida como enfermedad de picor de lo-
cura en el ganado vacuno, ovino, cerdos, perros y visones.
20 El virus de parainfluenza causa una leve enfermedad respira-
toria en los seres humanos, especialmente en niños pequeños
y está implicado en la conjuntivitis del ganado vacuno.
Vaccinia es una forma avirulenta del virus de varicela em-
pleado para vacunación contra varicela y su uso da por resul-
25 tado ocasionalmente efectos secundarios indeseados. El tipo
13 de Rhino es uno de los muchos virus comprendido en el res-
friado común.

30

403142



T a b l a I

No.	Compuesto	Tipo 1 Herpes VR		Tipo 2 Herpes VR		Mixoma VR		Pseudo-rabies VR		Vaccinia VR		Adeno VR		Para influenza VR		Tipo 13 Rhino VR	
		VR		VR		VR		VR		VR		VR		VR		VR	
1	1-(β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida	1.2, 1.0,	1.5, 1.0,	1.3		1.7	0.0, 0.0	1.0, 0.9		0.5, 0.5		1.0, 1.0		0.5			
2	Sal amónica del 5' fosfato de 1-(β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida.	0.7, 0.8		0.9				0.5		0.0		0.5		0.3			
3	1-(β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-tiocarboxamida	1.0, 0.5				0.2	0.1	0.3		0.0		0.0, 0.0		0.1, 0.2			
4	1-(β-D-xilofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida	0.7, 1.2				0.95	0.8	0.7		0.7		0.7, 0.8		0.4, 0.5			
5	1-(β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida-hidrocloreuro	0.8, 1.0				1.1	0.6			0.1		0.7, 0.8		0.6			
6	1-(β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida 3',5'-cíclico fosfato sal amónica	0.65, 0.8				0.7	0.5			0		0		0.6, 0.5			
7	5 - IDU	1.4, 1.0		1.8		0.8	0.6	1.3		0.2		0.0		0.0			
8	Ara - C	1.6		0.8		0.6	0.4	0.8		0.2		0.1		0.1			
9	Ara - A	1.2, 1.1		0.6		0.8, 0.8	0.6, 1.1	0.7, 0.9		0.0, 0.0		0.1		0.1			



1 El compuesto 1 arriba citado ha sido probado en
conejos y hamsters y con dosis no tóxicas muestra una signifi-
ficativa actividad anti-HSV queratitis. El compuesto signifi-
cativamente inhibe el desarrollo de las lesiones inducidas
5 por HSV en las colas de los ratones cuando se administra lo-
calmente sobre la infección. También se ha probado en rato-
nes contra influenza A2, influenza B y parainfluenza 1, con
actividad antiviral altamente significada. observada en es-
10 tos experimentos. Este compuesto, según debe observarse en
la Tabla 1 de arriba, expone un espectro de actividad antiviral
sustancialmente más amplio que el exhibido por IDU, _ _
Ara-A ó Ara-C. Además de la actividad antiviral arriba do-
cumentada, se ha encontrado que 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,
15 4-triazol-3-carboxamida inhibe el crecimiento de las bacte-
rias de Pseudomonas aeruginosas y de los hongos Candida al-
bicans y Cryptococcus diffluentis,

Todos los compuestos (1-6) arriba citados muestra-
ron baja citotoxicidad y fueron solubles en medios acuosos.

20 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida
también posee interesante actividad antitumoral. Tres gru-
pos de ratones C 57 Blk/6 (6 animales por grupo) recibieron
implantaciones subcutáneas de adenocarcinoma-755. Dos gru-
pos recibieron el compuesto (100 mg/kg x 7 días y 200 mg/kg
25 x y días) intraperitonealmente, mientras que el tercer gru-
po de control recibió solamente solución salina. Al 16^a día
los animales tratados mostraron 18% y 63% de inhibición del
tumor, respectivamente en comparación con los controles.

30

403142



- 27.-

1

5

10

15

20

25

30

En un experimento similar, ratones DBA/2, inoculados con leucemia L-1210 (1×10^5 células por animal) mostraron un incremento de 31% en tiempo medio de supervivencia sobre los controles cuando fueron tratados con el compuesto (250 mg/kg. x 7 días). Cuando se dió a una dosificación de 250 mg/kg x 14 días, el compuesto produjo 80% de supervivientes de ratones suizos llevando implantaciones intraperitoneales de Ehrlich ascites carcinoma. También se observó actividad marginal en vivo contra Novikoff hepatoma.

También se ha descubierto, según el invento, que 1,2,4-triazol-3-carboxamida misma muestra significativa actividad antiviral. Cuando se probó por el procedimiento precedente, se obtuvieron los siguientes datos VR: Tipo 1 de herpes -- 0,6, 1,0; Vaccinia -- 0,8; y Parainfluenza 0.6, 0.6. Los resultados VR, cuando este compuesto fué probado contra Adeno y Rhino Tipo 13 de virus, fueron respectivamente 0,0 y 0,3.

N O T A . -

=====

La presente patente de invención, comprende las siguientes reivindicaciones:

1.- Procedimiento para la preparación de 1, 2, 4-

403142



24 MAY 1912

- 28.-

1

triazol nucleosidos, caracterizado por fundir un 1,2,4-triazol-3- sustituido con azúcar bloqueado de O-acilo en presencia de un catalizador ácido para formar el nucleosido bloqueado de triazol y subsiguientemente desbloquear tal nucleosido bloqueado de triazol y formar el nucleosido sustituido por 3-carboxamida, tiocarboxamida o carboxamidina.

5

10

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el nucleosido bloqueado de triazol es desbloqueado y amidatado en presencia de amoniaco metanólico, para formar el nucleosido sustituido con 3-carboxamida.

15

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el 1,2,4-triazol-3-sustituido es 3-ciano 1,2,4-triazol y el nucleosido de triazol bloqueado es tratado con sulfuro de hidrógeno en presencia de una amina y es desbloqueado para formar el nucleosido sustituido con 3-tiocarboxamida.

20

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el 1,2,4-triazol-3-sustituido es 3-ciano 1,2,4-triazol y el nucleosido bloqueado es tratado con una amina y desbloqueado para formar el nucleosido sustituido de 3-carboxamidina.

25

5.- Procedimiento según las reivindicaciones precedentes, caracterizado por comprender el tratamiento del derivado de trimetilsililo de 1,2,4-triazol-3-carboxilato con un haluro de glicosilo para procurar el triazol nucleosido

30

403142

24



- 29.-

1

sido-3-carboxilato bloqueado y después de ello desbloquear tal nucleosido bloqueado y formar el nucleosido sustituido con 3-carboxamida, tiocarboxamida o carboxamidina.

5

6.- "Procedimiento para la preparación de 1,2,4-triazol nucleosidos.

10

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

Madrid, a

24 MAY 1972

CARLOS ROEB
P. P.

15

Fé: Francisco del Pozo

20

25

30