

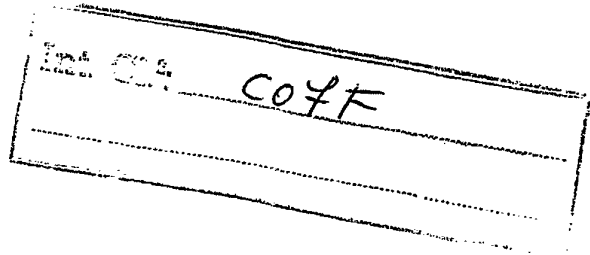
S/Ref.:

N/Ref.: O.G. 24.772



PATENTE DE INTRODUCCION

414727



MEMORIA DESCRIPTIVA

Sobre:

"PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE DERIVADOS NUCLEOSIDOS"

Solicitante: La Compañía norteamericana: NELSON RESEARCH
AND DEVELOPMENT COMPANY, con domicilio en:
19722 Jamboree Boulevard - IRVINE, CALIFORNIA
(U.S.A.).-



Extracto de la descripción

Se describen los derivados del ácido adenosino-3',5'-monofosfórico y el derivado de 2'-O-butirilo del ácido iso-adenosino-3',5'-monofosfórico, y sus métodos de producción. Los compuestos tienen utilidad en relación con la acción hormonal. También se describen compuestos relacionados.

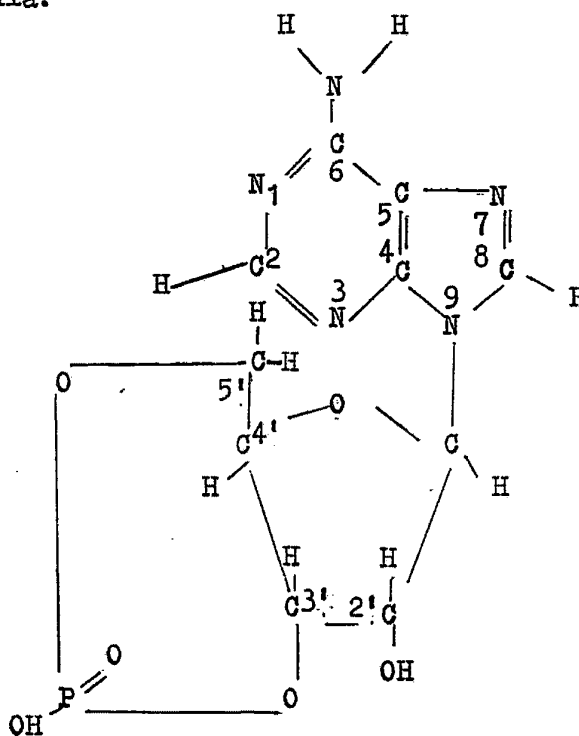
5.

La presente invención se relaciona con nucleótidos y más particularmente con derivados del ácido ciclo-adenosino-3',5'-fosfórico y uno de sus isómeros.

10.

El ácido ciclo-adenosino-3',5'-fosfórico tiene la fórmula:

15.



20.

25.

empleándose la cualificación "ciclo" para indicar que los átomos del grupo fosfórico forman un anillo con el grupo ribósico.

Este compuesto se forma en las células de organismos animales sometiendo el ácido adenosino-5'-trifosfórico a la acción de la enzima adenil-ciclasa.

30.

Se supone que un gran número de hormonas utilizan el

414727



- 3 -

- ácido adenosino-3',5'-fosfórico (denominado "ciclo-AMP") como mensajero químico para una auto-activación y especialmente como segundo mensajero de acuerdo con la terminología de Sutherland y otros. La actividad biológica del ciclo-AMP puede observarse
5. convenientemente mediante varios ensayos in vitro, especialmente el de la dilatación de melanóforos en la piel del lagarto *Anolis Carolinensis*; el de la dispersión de los melanóforos en la piel de una rana (*Rana Pipiens*); y el del incremento en la cantidad de hormona tirotrópica excretada por la hipófisis
10. de la rata. El ciclo-AMP incrementa la producción de corticoesteroides (Haynes, Koritz, Peron, J. Biol. Chem. 234, 1421 (1959)). Los derivados dibutirilos del ciclo-AMP ejercen el mismo efecto que el ACTH, al que pueden sustituir, y en todo el animal pueden aumentar el nivel plasmático de los corticoesteroides (Imura y colaboradores, *Endocrinology*, 76, 933, 1965).
- 15.

Un compuesto dotado de propiedades similares es el isómero en el que el núcleo de ribosa, en lugar de estar fijado por su átomo de carbono 1 en la posición 9 del anillo de purina, se fija mediante dicho átomo al átomo de nitrógeno en la

20. posición 3, desplazándose en consecuencia los enlaces dobles en el núcleo de purina. Es conveniente designar este compuesto por "iso-ciclo-AMP".

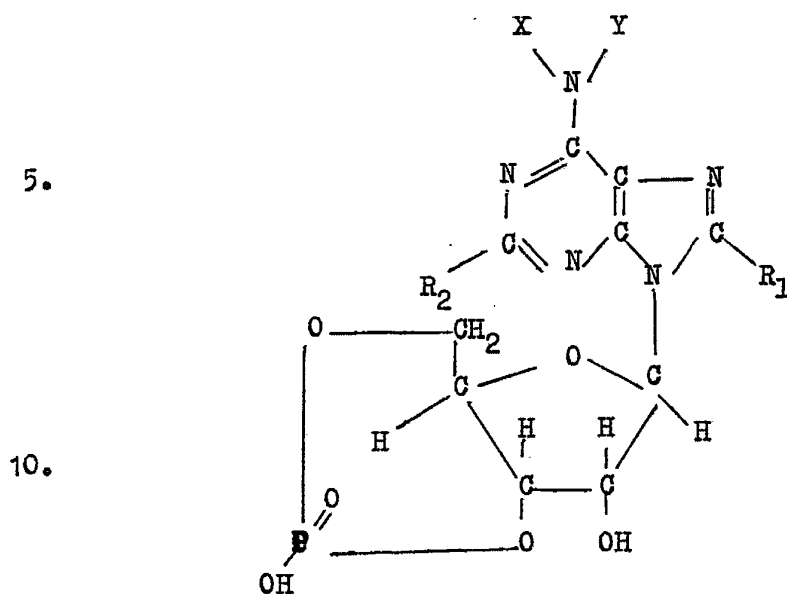
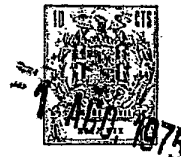
El objeto de la presente invención es proporcionar nuevos derivados del ciclo-AMP y del iso-ciclo-AMP que muestren similares actividades biológicas, pero más intensamente

25. y/o más selectivamente.

Los nuevos compuestos son:

A. Derivados del ácido adenosino-3',5'-monofosfórico, de fórmula:

30.



15. en la que uno de los símbolos X e Y representa un átomo de hidrógeno o grupo alquilo y el otro representa un grupo alquilo, siendo cada uno de los símbolos R_1 y R_2 hidrógeno o bien X e Y son cada uno de ellos hidrógeno, R_1 es hidrógeno o bromo o un grupo sulfhidrilo, hidroxilo, tiometilo o amino y R_2 es hidrógeno o un grupo amino.
- 20.

B. El compuesto ácido 2-O-butiril-iso-adenosino-3',5'-monofosfórico.

C. Las sales formadas por salificación del grupo hidroxilo enlazado al átomo de fósforo.

25. La invención se relaciona especialmente con dichos derivados que, en la posición 6, llevan un radical $-\text{NHCH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{NH}-n.\text{C}_4\text{H}_9$ ó $-\text{NH}-t.\text{C}_4\text{H}_9$, así como aquéllos en los que $R_2 = \text{H}$ y $R_1 = \text{Br}$, SH , SCH_3 , OH ó NH_2 y aquél en el que $R_2 = \text{NH}_2$ y $R_1 = \text{X}$, siendo X e Y igual a H.

30. Los nuevos derivados del ciclo-AMP alquilados en posi-

414727



ción 6 pueden producirse a partir del ácido adenosino-5'-monofosfórico monoalquilado o dialquilado en el nitrógeno de la posición 6 mediante reacción con p-nitrofenol en presencia de dicitclohexil-carbo-di-imida ($C_6H_{11}-N=C=N-C_6H_{11}$) y tratando los ésteres obtenidos, preferiblemente en forma de sus sales trimetilamónicas, con tercio-butóxido potásico.

10. Los derivados monoalquilos y dialquilos del ácido adenosino-5'-monofosfórico, que son nuevos y forman parte de esta invención, pueden obtenerse reaccionando una 6-halo, particularmente 6-cloro, 9-(ribo-beta-furanosil-2',3'-isopropilideno)-purina, con la adecuada mono- ó di-alquilamina y sometiendo el derivado adenosino obtenido a una fosforilación, preferiblemente mediante la acción de oxiclорuro de fósforo en fosfato metílico.

15. La invención comprende además un nuevo procedimiento para la producción de nucleótidos cíclicos a partir de 5'-nucleótidos, que se relaciona con el de Smith, Drummond y Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 83 698 (1961); este procedimiento consiste en calentar hasta su ebullición, bajo reflujo, una sal de un 20. 5'-nucleótido con dicitclohexil-carbo-di-imida (DCHC) ó di-(ciclohexilimino)-metano, en presencia de piridina anhidra.

Una característica de la invención es la de añadirse formamida dimetílica, que tiene un doble efecto: por una parte, los 5'-nucleótidos se disuelven más fácilmente en la mezcla, y 25. por otra parte la formamida dimetílica parece favorecer la reacción. La formamida dimetílica se añade en cantidad suficiente para disolver el 5'-nucleótido por completo. Por ejemplo, puede usarse una mezcla de volúmenes iguales de piridina y formamida dimetílica.

30. El procedimiento es más sencillo que el método de ci-



- clización de los ésteres p-nitrofenólicos primeramente mencionado. Proporciona menores producciones en el caso en que el AMP lleve un grupo amino en posición 2, debido a la formación de un subproducto inestable en medio ácido o alcalino y que parece ser
5. un ácido adenosino-N², 5'-fosfórico que contiene un enlace fosfámico, que explica la inestabilidad. Tras su tratamiento con sosa cáustica, este compuesto regenera el nucleótido inicial, que puede aislarse y reciclarse, lo que incrementa la producción total.
10. Es por consiguiente posible preparar directamente, a partir del ácido guanosino-5'-fosfórico (GMP), el GMP cíclico, respecto al cual recientes trabajos han mostrado su presencia en la naturaleza y su acción biológica, cualitativamente análoga a la del ciclo-AMP; en algunos ensayos biológicos, este ciclo
15. GMP ejerce una acción incluso cuantitativamente superior a la del ciclo-AMP.
- El derivado 2'-O-butililo del ciclo-iso-AMP puede prepararse, de acuerdo con la invención, mediante acilación directa del ácido, preferiblemente en forma de su sal trietil-amónica.
20. La reacción puede llevarse a cabo, en particular, con un exceso de anhídrido butírico en presencia de piridina, a temperatura ambiente.
- Los nuevos derivados del ciclo-AMP pueden usarse en la industria con la misma finalidad que el ciclo-AMP, especialmente para investigaciones bioquímicas y farmacéuticas.
25. Los siguientes ejemplos no limitativos, en los que las temperaturas se indican en grados centígrados, ilustran la preparación de los nuevos derivados.
- Ejemplos 1-4
30. a) Ácidos N⁶-alquil-adenosino-5'-fosfóricos (N⁶-n-butil-AMP).

414727 - 1



- 7 -

- El material inicial es 9-(ribo-beta-furanosil-2',3'-isopropilideno)-6-cloro-purina; este material se prepara por el método de Hampton y Maguire, J. Amer. Chem. Soc. 83, 1961, página 150, y de la patente checoslovaca nº 110.944, de Zemlicka y Sorm, 1964. Se calienta durante 15 horas a 80°C una solución de 50 mg de este producto en 1 ml de n-butilamina anhidra. Se evapora el producto hasta su secamiento al vacío, se recoge en cloroformo, vuelve a evaporarse hasta su secamiento en vacío y se repite esta operación varias veces. Luego se seca el residuo durante 1 hora con un elevado vacío y se disuelve en 1 ml de metanol absoluto; se introduce 0,5 g de gel de sílice "Merck" (0,05 a 0,20 mm) y se evapora hasta su secamiento. El sólido se introduce por la parte superior de una columna de gel de sílice de 155 mm de longitud y 8 mm de diámetro. Se efectúa una elución usando una mezcla de cloroformo y metanol (90:10 en volumen), recogiendo fracciones de 1 ml. La 9-(ribo-beta-furanosil-2',3'-isopropilideno)-6-n-butil-amino-purina se halla contenida en las fracciones 7 a 13. Después de una evaporación hasta el secamiento, se obtienen 37 mg de sustancia amorfa y cromatográficamente homogénea (Rf 0,75 en una capa delgada de sílice en n-butanol saturada con agua).
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

- El anterior producto, 467 mg, secado con un elevado vacío durante 2 horas a temperatura ordinaria, se disuelve en 3,3 ml de fosfato metílico. La temperatura se mantiene a 0°C, se introduce 0,47 ml de oxiclорuro de fósforo y se deja reposar la mezcla durante 5 a 6 horas. Se destruye el exceso de reactivo mediante la adición de 20 g de hielo triturado. Después de media hora de agitación, se ajusta el pH a 1,5 por medio de amoníaco concentrado. Luego se calienta la mezcla durante 50-60 minutos a 80-90°C, lo que permite la separación, mediante hidrólisis, del grupo isopropilideno. Se lleva el pH a 7,0 por medio de amoníaco
- 25.
- 30.



- concentrado, se agita durante 10 minutos en presencia de 10 g de negro animal activo (obtenido de acuerdo con Hurst y Becking, Can. J. Biochem. Physiol. 41, 1963, página 469) y se trata mediante lavado con ácido. El negro animal recuperado por filtración y lavado por medio de 100 ml de agua se trata con 400 ml de una mezcla de amoníaco concentrado, agua y metanol (15:35:50 en volumen), lo que permite la elución del nucleótido absorbido. Se evapora el producto hasta su secamiento, se recoge en agua y se acidifica a un pH de 2,0 por medio de ácido 0,5 M sulfúrico. Luego se concentra a 2 ml aproximadamente. Después de la adición de alcohol y ulteriormente de acetona y tras reposar a 0°, se obtienen 310 mg de N⁶-n-butyl-AMP cristalino. El producto analíticamente puro funde a 155-158° y se muestra homogéneo cromatográficamente.
5. 10. 15. b) Se han preparado análogamente otros derivados de AMP N⁶-alquilado. La siguiente tabla muestra algunas de las características de los diversos productos.

Tabla 1

Derivados N⁶-alquilos de AMP

Sustitutivos sobre N ⁶	p.f.	λ máx (m)	ε máx	R _f en varios disolventes*		
				A	B	C
monoetilo	184-185°	268	16900	0.21	0.30	0.33
dimetilo	225-230°	274	18400	0.30	0.37	0.61
n-butilo	155-158°	266	14000	0.50	-	0.75
t-butilo	-	270	15200	0.51	0.66	0.75

* Disolventes: A. alcohol: acetato amónico 0,5M
(5:2 en volumen)

B. isopropanol: amoníaco concentrado:
agua (6:3:1 en volumen)

C. isopropanol: sulfato amónico 1%
(2:1 en volumen)

414727



- 9 -

- 1 AGO 1972

Ejemplos 5-8

a) Acido N⁶,N⁶-dimetil-adenosino-3',5'-fosfórico (N⁶-dimetil-ciclo-AMP) y sus sales.

5. Se disuelve ácido N⁶-dimetil-adenosino-5'-fosfórico (N⁶-dimetil-AMP) (150 mg) en una mezcla de 2,5 ml de formamida dimetífica y 2,5 ml de piridina anhidra. Se añade 0,112 ml de tri-n-butilamina, 556 mg de p-nitrofenol y 825 mg de dicitclohexil-carbo-di-imida (DCHC). El nucleótido entra completamente en solución después de 5 a 10 minutos de agitación. Se deja reposar
10. durante 24 horas a temperatura ordinaria. Mediante cromatografía sobre papel (sistema A de la Tabla 1) se obtienen, en cantidades aproximadamente iguales, el éster p-nitrofenilo del derivado AMP y del correspondiente pirofosfato simétrico. Se evapora la mezcla hasta su secamiento al vacío y se recoge el residuo en 10 ml de
15. agua. Después de su filtración, se extracta cinco veces, cada una de ellas con 10 ml de éter, para recuperar el p-nitrofenol y el exceso de DCHC. Se vierte la solución acuosa en una columna (40 cm de longitud y 2,8 cm de diámetro) de DEAE-celulosa en forma de su bicarbonato. Después de lavar la columna con 500 ml de
20. agua destilada dos veces, se efectúa una elución a diferentes niveles de concentración mediante la adición del agua de bicarbonato trietilamónico (0,1 M) (pH 7,5). Se emplea un total de 3 litros de la mezcla.
25. Se recuperan fracciones de 20 ml. El éster p-nitrofenólico de N⁶-dimetil-AMP (producción del 45%) se encuentra en las fracciones 56-78; $\lambda_{\text{máx.}} = 274 \text{ m}$; $\epsilon_{\text{máx.}} = 22000$. Mediante evaporación hasta el secamiento, se obtiene la sal trietilamónica^m, que se seca durante varias horas a muy baja presión y a temperatura ordinaria.
30. Se disuelve la sal trimetilamónica (107 mg) en 4 ml de sulfóxido dimetílico anhidro. Se añade 1 mg de una solución



- 1M de terc.-butóxido potásico en alcohol butílico terciario anhidro, que causa la formación de nucleótido cíclico con liberación de p-nitrofenato. Al cabo de 3 horas a temperatura ordinaria, se agitan 2 g de Dowex 50 (forma NH_4^+) y se filtra el producto tras la adición de 10 ml de agua. Luego se lava la resina con amoníaco 0,2 N hasta completarse la elución del nucleótido cíclico. Se evapora la solución amoniacal bajo vacío y se fracciona el producto como se indica anteriormente sobre una columna de celulosa DEAE. Las fracciones Nos. 58 a 82 contienen el nucleótido cíclico. Estas fracciones son combinadas y evaporadas hasta su secamiento. Se recoge el producto en metanol y se evapora de nuevo hasta su secamiento. Luego se disuelve en 0,5 ml de metanol anhidro, se añaden 2 ml de una solución 0,5 M de perclorato sódico en acetona anhidra y se completa luego la precipitación de la sal sódica del nucleótido mediante adición de 5 ml de acetona anhidra. Se obtienen 39 mg del producto mediante centrifugación, que se lavan en acetona.

- A partir de una solución acuosa concentrada de la sal sódica, puede precipitarse el nucleótido cíclico en forma de sus sales con metales pesados, por ejemplo como la sal de plata, mediante adición de nitrato de plata en un ligero exceso. Mediante descomposición de esta sal en suspensión acuosa por medio de sulfuro de hidrógeno, se obtiene el ácido libre. Mediante neutralización con bases minerales u orgánicas, pueden obtenerse las correspondientes sales del nucleótido cíclico.

b) De manera similar se han preparado los derivados N^6 -monometilos, N^6 -n-butilos y N^6 -terc. butilos del ciclo-AMP.

La Tabla II indica algunas de las características de estos diversos derivados.



TABLA II

Derivados N⁶-sustituidos del ciclo-AMP

Sustitutivos N ⁶	λ máx	ϵ máx	R _F en varios disolventes		
			A	B	C
Monometilo	270	17000	0.58	0.49	0.75
Dimetilo	274	20000	0.88	0.78	0.76
n-butilo	269	18200	0.75	0.83	0.82
t-butilo	272	18200	0.70	0.80	0.83

Los sistemas disolventes usados son los mismos que en la Tabla I.

Las mediciones de λ máx. y ϵ máx. se efectúan a un pH de 7,0.

Ejemplo 9

Acido 2'-O-butiril-iso-adenosino-3',5'-fosfórico

15. (2'-O-butiril-ciclo-iso-AMP).

La conocida preparación del ácido iso-adenosino-3',5'-fosfórico (ciclo-iso-AMP) incluye una fracción en la columna de DEAE-celulosa, que proporciona el nucleótido cíclico en forma de su sal trietilamónica. Esta sal, cuidadosamente secada

20. (25 mg), se disuelve en 0,75 ml de piridina anhidra. Se añade 0,375 g de anhídrido butírico y se deja reposar la mezcla durante 6 horas a temperatura ordinaria. La mayor parte de la piridina se separa mediante evaporación al vacío; luego se descompone el exceso de anhídrido butírico mediante adición de

25. 0,35 ml de agua a 0°. Luego se evapora hasta el secamiento con un elevado vacío. El residuo se mantiene durante otras 12 horas a un elevado vacío a temperatura ordinaria. Se recoge en 10 ml de agua y se vierte sobre una columna de DEAE-celulosa de 15,5 cm de longitud y 0,8 cm de diámetro. Se lava primeramente con

30. 300 ml de agua y se efectúa su elución a diferentes niveles de



- concentración mediante la gradual adición al agua de bicarbonato 0,1M trietil-amónico. Se recuperan fracciones de 20 ml. El derivado monobutirilado se halla contenido en las fracciones Nos. 56 a 78, que son combinadas y liofilizadas. Se recoge el
5. residuo en 0,2 ml de metanol anhidro; se añade 1 ml de una solución 0,5 M de perclorato sódico en acetona anhidra y se completa la precipitación de la sal sódica de 2'-O-butilil-cíclico-iso-AMP mediante adición de 5 ml de acetona anhidra, se recupera dicha sal por centrifugación y se lava con acetona anhidra. Se
10. obtienen 13 mg; $\lambda_{\text{máx.}} = 278 \text{ m}$; $\epsilon_{\text{máx.}} = 12800$; $R_f, 0,80$ en el sistema etanol/acetato amónico 0,5 M (5:2 en volumen) sobre papel Whatman nº 1. El máximo observado en el espectro UV es prácticamente idéntico al del espectro del ciclo-iso-AMP inicial, que no incluye en N⁶ el residuo butirilo. Este último puede estar
15. entonces sólo en la posición 2'. Se obtiene el mismo producto si la duración de la reacción del iso-AMP con el anhídrido butírico en presencia de piridina se prolonga a 8 días, lo que muestra la baja reactividad del grupo amino N⁶.

Ejemplo 10

20. Acido ciclo-N⁶-n-butil-adenosino-3',5'-fosfórico (N⁶-n-butil-ciclo-AMP).

- Se transforman 175 mg de ácido N⁶-n-butil-adenosino-5'-fosfórico (N⁶-n-butil-AMP), preparado de acuerdo con el Ejemplo 3, en la sal trietilamónica, que es cuidadosamente secada.
25. Se disuelve en 10 ml de dimetilformamida anhidra. Se introduce la solución, gota a gota y durante 2 horas, en 10 ml de una mezcla de volúmenes iguales, al punto de ebullición, de formamida dimetílica y piridina anhidra, conteniendo tal mezcla 180 mg de DGHG. Se calienta durante 1 hora bajo reflujo y se agita continuamente a todo lo largo de la operación.
- 30.

414721



5. Después de evaporarse hasta su secamiento bajo vacío, se recoge en 50 ml de agua. Se filtra para separar la urea diciclohexílica precipitada y se extracta la solución dos veces con 20 ml de éter para eliminar el DCHC. Luego se vierte la solución acuosa sobre una columna (de 40 cm de altura y 2,8 cm de diámetro) de DEAE-celulosa en su forma bicarbonatada. Después de lavar la columna con 500 ml de agua dos veces destilada, se efectúa la elución a diferentes niveles de concentración mediante la gradual adición al agua de bicarbonato 0,1M trietilamónico. Se emplea un total de 2 litros de mezcla. Se recuperan fracciones de 20 ml.

15. El nucleótido cíclico se halla contenido en los tubos números 60 a 81. Se evapora su contenido hasta su secamiento bajo vacío, se añaden dos lotes de metanol anhidro al residuo y se separan bajo vacío. Se absorbe el residuo en 1,5 ml de metanol absoluto. Se precipita la sal sódica del nucleótido cíclico mediante la adición de 20 ml de una solución 0,125 M de perclorato sódico en acetona anhidra. Se recupera el sólido (100 mg) por centrifugación y lavado repetido con acetona anhidra.

20. La sal corresponde a la fórmula empírica $C_{14}H_{19}N_5O_6PNa$ y el correspondiente ácido (preparado como se describe más adelante) posee todas las características indicadas anteriormente a propósito del N⁶-n-butyl-ciclo-AMP.

Ejemplo 11

25. Acido guanosino-3',5'-fosfórico (ciclo-GMP).

30. Se disuelven 150 g de GMP en forma del ácido libre en 25 ml de formamida dimetílica. En el espacio de 2 horas se introduce la solución, gota a gota, en una mezcla hirviente de 50 ml de piridina, 50 ml de formamida dimetílica anhidra y 170 mg de DCHC. Se calienta durante 2 horas bajo reflujo. Se agita continuamente a todo lo largo de la operación.



Después de evaporar hasta el secamiento bajo vacío, se absorbe en 25 ml de agua, se filtra y se extracta 3 veces con 15 ml de éter. Se evapora la solución acuosa hasta su secamiento bajo vacío.

5. Aparte del ciclo-GMP, el residuo contiene una sustancia que es de hecho ácido guanosino- $N^2,5'$ -fosfórico. Para hidrolizar el enlace fosfamidico, se absorbe en 10 ml de sosa cáustica 0,2N y se calienta a 60° durante 45 minutos.

10. Después de su neutralización con ácido acético, se vierte sobre una columna (de 40 cm de altura y 2,8 cm de diámetro) de DEAE-celulosa. Se lava la columna con 300 ml de agua y se efectúa una elución a diferentes niveles de concentración por medio de agua a la que se añade gradualmente carbonato trietil-amónico 0,1 M. Se emplea un total de 3 litros de la mezcla. Se recuperan fracciones de 20 ml.

15. Las fracciones Nos. 40-64, que contienen el ciclo-GMP, se evaporan hasta su secamiento bajo vacío. Se absorben en metanol anhidro y se evaporan hasta su secamiento tres veces. Luego se absorben en 1 ml de metanol anhidro y se precipita el ciclo-GMP en forma de su sal sódica (38 mg) mediante adición de 12,5 ml de una solución 0,1M de perclorato sódico en acetona anhidra. Se recupera el producto por centrifugación y se lava con acetona anhidra. Tiene la fórmula empírica $C_{10}H_{11}N_5O_7PNa \cdot H_2O$. Por sus diversas características (espectros UV e IR y R_f en varios disolventes), resulta ser idéntico al auténtico ciclo-GMP.

20. El GMP inalterado o regenerado se recupera lavando la columna con bicarbonato 0,15 M trietilamónico. Su sal trietilamónica puede someterse luego a la serie de operaciones indicadas para la transformación en ciclo-GMP, lo que permite in-
- 25.
- 30.

414727

- 15 -



crementar la producción total.

Los ejemplos que siguen se refieren a la preparación de nuevos derivados del ciclo-AMP.

5. Para los que llevan un sustitutivo en posición 8, la síntesis puede efectuarse partiendo del AMP no cíclico o del ciclo-AMP. En ambos casos, el producto intermedio es el derivado 8-bromado. El halógeno de este derivado es suficientemente móvil si se trata por sustitutivos nucleofílicos. Puede sustituirse también por consiguiente por un grupo amino, sulfhidrilo, tiometilo o hidroxilo.

10. Los principios de la síntesis anteriormente indicados se ilustran mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 12

15. Acido 8-bromo-adenosino-3',5'-fosfórico (8-bromo-ciclo-AMP).

a) A partir del ciclo-AMP

20. Se disuelven 500 mg de ciclo-AMP en 0,75 ml de sosa cáustica N. Después de la adición de 15 ml de agua de bromo saturada, se deja durante 6 horas a temperatura ordinaria. Luego se agita con 10 g de carbono activo, específicamente norita, se lava primeramente con una mezcla de amoníaco:etanol:agua (15:60:25 en volumen) y luego con ácido clorhídrico y agua, se filtra y se lava el carbono con agua hasta quedar libre de iones Br⁻. Luego se efectúa su elución mediante agitación con una mezcla de amoníaco, etanol y agua (15:60:25). Se evapora la solución hasta su secamiento bajo vacío y se absorbe el residuo en agua.

25. Se vierte esta solución sobre una columna (40 cm de altura y 2,8 cm de diámetro) de DEAE-celulosa en su forma bicarbonatada. Se lava la columna primeramente con 500 ml de agua.
30. Luego se realiza su elución a diferentes niveles de concentración por medio de la adición gradual al agua de bicarbonato



trietilamónico 0,1M. Se emplea un total de 3 litros de mezcla. Se recuperan fracciones de 20 ml.

5. Las fracciones Nos. 35 a 60 se combinan y evaporan hasta su secamiento bajo vacío. El residuo es absorbido en metanol y evaporado tres veces. Para terminar, se recoge en 5 ml de agua y se acidifica a un pH 2,5, que induce la cristalización del producto. Se añaden dos volúmenes de alcohol y se deja reposar la mezcla a 0° durante 24 horas. Luego se recupera el sólido por centrifugación y se lava dos veces con 5 ml de alcohol absoluto, secándose seguidamente. Se obtienen así 410 mg (67% de producción). La sal sódica tiene la fórmula empírica
10. $C_{10}H_{10}N_5O_6PBrNa$.

b) A partir de 8-bromo-AMP

15. El 8-bromo-AMP se prepara de acuerdo con el método de Ikehara, Uesugi y Kaneko, Chem. Commun. 1, 17 (1967). La ciclización se efectúa de acuerdo con el método de Smith, Drummond y Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 83, 698 (1961).

20. Se disuelven 170,4 mg de 8-bromo-AMP (0,4 m.mol) en 10 ml de piridina que contienen 2 ml de agua. Se añaden 117,6 mg de 4-morfolino-N-N'-díciclohexil-carboxamida (0,8 m.mol). Se evapora la solución hasta su secamiento bajo vacío. Se recoge el residuo en 20 ml de piridina anhidra y se evapora de nuevo hasta su secamiento. Se repite dos veces esta operación para eliminar por completo el agua. El producto es finalmente disuelto en 20 ml de piridina anhidra e introducido gota a gota durante una hora y media en una solución de 165 mg de díciclohexil-carbodiimida en 40 ml de piridina calentada hasta su ebullición.
25. Se mantiene durante dos horas más en reflujo hirviente. Luego se evapora la solución hasta su secamiento bajo vacío. El residuo
30. es absorbido en 20 ml de agua; después de su filtración, se extracta tres veces con 20 ml de éter. Se efectúa un fracciona-

414727



miento como en el ejemplo anterior después de haber vertido la solución sobre una columna (de 20 cm de altura y 1,2 cm de diámetro) de DEAE-celulosa. El 8-bromo-ciclo-AMP obtenido (121 mg) posee las mismas propiedades que el producto preparado bajo a).

5. La producción puede mejorarse si la ciclización se efectúa en presencia de formamida dimetílica (véase Ejemplo 10).

Ejemplo 13

Acido 8-tio-adenosino-5'-fosfórico (8-tio-AMP) y ácido 8-tio-adenosino-3',5'-fosfórico (8-tio-ciclo-AMP).

10. En este ejemplo, como en los tres siguientes, el 8-bromo-AMP y el 8-bromo-ciclo-AMP se tratan mediante reactivos nucleofílicos con eliminación del halógeno y sustitución de otros grupos.

a) 8-tio-AMP

15. Se suspenden 500 mg de 8-bromo-AMP, bien pulverizados, en 50 ml de alcohol etílico al 90%; se introducen 200 mg de tiourea y se calienta la mezcla durante 6 horas hasta su ebullición con reflujo, con agitación continua. El material inicial ha desaparecido entonces por completo. Se neutraliza el producto con trietilamina y se fracciona sobre una columna de DEAE-celulosa bajo las condiciones anteriormente descritas. La elución del 8-tio-AMP se efectúa sólo si la concentración del bicarbonato trietilamónico se eleva desde 0,1M a 0,2M. Los tubos 120 a 150 contienen el producto deseado. Se sigue el procedimiento anteriormente descrito. El producto es cristalizado mediante disolución en 1 ml de agua, ajuste del pH a 2,5 y adición de 2 ml de alcohol etílico absoluto. Se obtienen 250 mg (producción del 52%). Tiene la fórmula empírica $C_{10}H_{14}N_5O_7PS$.

20.

25

b) 8-tio-ciclo-AMP

30. El método de sustitución empleado en el caso del 8-bromo-AMP resulta ser inaplicable al 8-bromo-ciclo-AMP. Finalmen-



te, se ha empleado el método usado en otros casos por Holme y Robins (J. Amer. Chem. Soc. 86, 1243 (1964)).

5. Se mezcla sulfuro de hidrógeno a baja temperatura en 20 ml de una solución alcohólica 1M de etilato sódico para obtener sulfhidrato sódico. Luego se separa el exceso de sulfuro de hidrógeno mediante calentamiento hasta la ebullición. Luego se introducen 100 mg de 8-bromo-ciclo-AMP y se calienta la mezcla con ebullición bajo reflujo durante 5 horas. Después de su neutralización con ácido acético, se evapora hasta su secamiento bajo vacío, se recoge en 10 ml de agua y se fracciona bajo las condiciones habituales sobre una columna (30 cm de altura y 1,2 cm de diámetro) de DEAE-celulosa. Se efectúa la elución del producto solamente mediante bicarbonato trietilamónico 0,1M; se encuentra en las fracciones Nos. 80 a 110. Después del tratamiento inhabitual, se obtiene en condición cristalina disminuyendo el pH a 2,5; se recrystaliza a partir de alcohol etílico. Se obtienen así 52 mg (producción del 58%). La sustancia tiene la fórmula empírica $C_{10}H_{12}N_5O_6PS$.
- 10.
- 15.

Ejemplo 14

20. Acido 8-tiometil-adenosino-3',5'-fosfórico (8-tiometil-ciclo-AMP).

- Se suspenden 100 mg de 8-bromo-AMP en una solución 1M de metil-mercapto sódico en alcohol absoluto y se calienta con ebullición bajo reflujo durante 6 horas. Luego se neutraliza con ácido acético y se evapora hasta su secamiento bajo vacío. El residuo se recoge en 50 ml de agua; se ajusta el pH a 3 y se absorbe el nucleótido, con agitación, sobre 3 g de carbono activo. Se lava con agua y se efectúa su elución mediante tratamiento con una mezcla de etanol, amoníaco concentrado y agua (60:15:25 en volumen). Se evapora la solución hasta su secamiento bajo vacío y se recoge el residuo en 10 ml de agua. Luego se fracciona bajo
- 25.
- 30.

414727

21 AGO



5. Las condiciones habituales sobre una columna (50 cm de altura y 1,2 cm de diámetro) de DEAE-celulosa. El producto deseado se encuentra en las fracciones Nos. 45 a 60 (es necesario observar el espectro UV tubo a tubo para efectuar una separación de otros dos productos no identificados). La sal trietilamónica contenida en estas fracciones es transformada en sal sódica de la manera anteriormente descrita. Se obtienen 36 mg (producción del 40%).

La sustancia tiene la fórmula empírica $C_{11}H_{12}N_5O_6P Na$.

Ejemplo 15

10. Acido 8-hidroxi-adenosino-3',5'-fosfórico (8-hidroxi-ciclo-AMP).

Se disuelven 225 mg de acetato sódico anhidro recién fundido en 7,5 ml de ácido acético glacial; se añaden 150 mg de 8-bromo-ciclo-AMP en forma del ácido anhidro libre. Se sumerge en un baño calentado a 135° y se calienta durante 2 horas con ebullición y reflujo (al cabo de 15 minutos el nucleótido se ha disuelto por completo). Luego se evapora la solución hasta su secamiento y el residuo se recoge en 10 ml de agua.

15. Se efectúa el fraccionamiento sobre una columna de DEAE-celulosa bajo las condiciones habituales. El producto deseado se encuentra en las fracciones Nos. 50 a 70; éstas se combinan y evaporan hasta su secamiento bajo vacío. La sal trietilamónica presente se transforma en una sal sódica bajo las condiciones ya descritas; se obtienen 85 mg (producción del 66%). El producto
20. corresponde a la fórmula empírica $C_{10}H_{10}N_5O_7PNa$.
25.

Ejemplo 16

Acido 8-amino-adenosino-5'-fosfórico (8-amino-AMP) y ácido 8-amino-adenosino-3',5'-fosfórico (8-amino-ciclo-AMP).

30. Se disuelven 426 mg de 8-bromo-AMP en 2,5 ml de formamida y se añaden 10 ml de metanol saturado con amoníaco. Se ca-



lienta la mezcla en un tubo sellado a 87-92° durante 48 horas. Se evapora el metanol, se añaden 10 ml de agua y se fracciona el producto bajo las condiciones habituales en una columna de DEAE-celulosa. El producto deseado se obtiene en las fracciones 5. 50 a 70. Se combinan éstas y evaporan hasta su secamiento bajo vacío. El 8-amino-AMP va acompañado en la mezcla cruda por dos compuestos que presentan máximos menores y uno de los cuales es difícil de separar del producto principal. Este último es no obstante utilizable para el siguiente procedimiento, aunque no da 10. las cifras y análisis correctos. La producción obtenida es del 70%, basado en la cantidad de fósforo recuperada.

Se disuelven 176 mg de la sal amónica trietilica bien secada del 8-amino-AMP en una mezcla de 25 ml de piridina y 5 ml de agua. Se añaden 146 mg de 4-morfolino-N,N'-d ciclohexil-carboxamidinio al objeto de transformar el nucleótido en una sal soluble. Se evapora el producto hasta su secamiento bajo vacío, se recoge en 25 ml de piridina y se evapora de nuevo hasta su secamiento; esta operación se repite dos veces. Finalmente se disuelve el residuo en 50 ml de piridina. Como se describe en el 15. Ejemplo 3 (b), se efectúa una ciclización en presencia de 202 mg de d ciclohexil-carbodiimida disueltos en 50 ml de piridina. Se fracciona el producto de reacción en una columna de DEAE-celulosa bajo las condiciones habituales. El producto deseado se encuentra en las fracciones Nos. 50 a 65, que son combinadas y evaporadas 20. hasta su secamiento bajo vacío. El producto se transforma en una sal sódica bajo las condiciones ya descritas. 25.

Se obtienen 56 mg (producción del 32%). Esta producción puede incrementarse usando formamida dimetilica en la ciclización (Ejemplo 1). El producto tiene la fórmula empírica $C_{10}H_{12}N_6O_6P Na$. 30.

414727



- 21 -

Ejemplo 17

Acido 2-amino-adenosino-3',5'-fosfórico (2-amino-ciclo-AMP).

El principio de la síntesis es como sigue.

5. El material inicial es 2-amino-6-cloro-9(2',3',5'-triacetil-beta-D-ribofuranosilo)purina, que se prepara a partir de guanosina. Los grupos acetilos se separan por amonólisis. Se trata la 2-amino-6-cloro-9(beta-D-ribofuranosil)purina bajo condiciones más enérgicas con amoníaco, produciéndose 2-amino-adenosina. El producto se transforma en un derivado 2',3'-isopropilideno que, mediante fosforilación con oxicloriguro de fósforo en presencia de piridina y ácido fórmico (véase Asahi Chemical Industry Co. Ltd., patente francesa nº 1.531.156), produce 2-amino-AMP. Este último, mediante ciclización en presencia de DCHC y formamida dimetílica (véase Ejemplo 2), produce finalmente 2-amino-ciclo-AMP. Estos tres últimos productos son nuevos y forman parte de la invención.
- 10.
- 15.

- La 2-amino-6-cloro-9(2',3',5'-triacetil-beta-D-ribofuranosil)purina se prepara, partiendo de guanosina, tal como describen Gerster, Lewis y Robbins en "Methods in Nucleic Acids Chemistry" ("Métodos en la Química de los Acidos Nucleicos"), 1, 242. Se trata el producto durante 14 horas a temperatura ordinaria con una solución saturada de amoníaco en metanol para desacetilarlo. Se evapora bajo vacío y se recristaliza a partir de metanol.
- 20.
- 25.

- La sustitución de cloro por un grupo amino necesita condiciones muy enérgicas. Se calientan 200 mg del producto anterior durante 48 horas en un autoclave a 120° con 50 ml de amoníaco concentrado y se depositan cristales de 2,6-diamino-nucleótido que, después de enfriarse (producción del 55 al 65%), son recuperados, lavados con alcohol y agua y secados.
- 30.



Este producto ha sido previamente preparado por un método diferente, pero el procedimiento de la invención es más práctico.

5. Se suspenden 1,3 g del anterior producto en 220 ml de acetona, se añaden 52 ml de propano dimetoxílico y 9,2 g de ácido p-tolueno-sulfónico monohidrato y se agita a temperatura ordinaria. Después de la disolución del nucleótido, precipita el sulfonato p-toluénico del derivado isopropilideno. Al cabo de una hora se recupera la sal mediante centrifugación y se lava
10. con acetona. Se descompone calentándola con 40 cm³ de bicarbonato sódico al 10%. Después de una completa disolución y evaporación hasta su secamiento bajo vacío, se seca el residuo mediante adición de 50 cm³ de benceno, seguido de evaporación, tres veces. Se extracta con 150 ml, en total, de cloroformo y se evapora hasta su secamiento. Se seca de nuevo mediante adición de 150 ml de benceno seguido de evaporación, dos veces. Se disuelve el residuo en una cantidad mínima de cloroformo y se precipita mediante adición de un exceso de benceno. Se obtienen 1,2 g del producto, amorfo y cromatográficamente homogéneo.
15. Para la fosforilación, se introduce la anterior sustancia (1,1 g) en una mezcla de 3,5 ml de acetonitrilo, 1,74 ml de oxiclорuro de fósforo, 0,46 ml de ácido fórmico anhidro y 1,5 ml de piridina anhidra. Se agita la mezcla hasta su disolución en un ambiente frío y se deja reposar a 3-4° durante 2 horas. Luego
20. se introducen lentamente, a 0°, 35 ml de agua, se agita la mezcla durante 2 horas a 0° y se ajusta el pH en 1,5 por medio de hidróxido sódico. Luego se calentó a 70° durante una hora para eliminar los grupos isopropilidenos y seguidamente se agitó con
25. 16 g de carbono activo. Este último se lava con agua. Se efectúa la elución del nucleótido absorbido por medio de una mezcla de
30. etanol, amoníaco concentrado y agua (60:15:25 en volumen). Luego

414727

4

AGO



5. se fracciona en una columna de DEAE-celulosa a diferentes niveles de concentración por medio de bicarbonato amónico 0,35 M gradualmente añadido al agua. El 2-amino-AMP se halla contenido en las fracciones Nos. 100 a 140. Su sal trietilamónica aislada bajo las condiciones habituales, se usa directamente para el siguiente procedimiento (correspondiendo la cantidad de fósforo presente a 640 mg de la sal).

10. La ciclización se efectúa usando 400 mg de sal trietilamónica de 2-amino-AMP disueltos en 5 ml de agua. Después de la adición de 360 mg de 4-morfolino-N,N'-diciclohexil-carboxamida, el procedimiento es como se describe en los Ejemplos 1 y 2, usando 510 mg de DCHC y 50 ml de formamida dimetílica. Mediante cromatografía en papel se revela, además del producto deseado, otro compuesto que emigra más rápidamente, que puede ser tal vez (véase Ejemplo 11) ácido 2-amino-adenosino-N²,5'-fosfórico. Después de evaporarse hasta su secamiento bajo vacío, se trata la mezcla cruda durante una hora a 60° con 50 partes de hidróxido 0,1N sódico. Se neutraliza el producto con ácido acético y se fracciona bajo las condiciones habituales en una columna de DEAE-celulosa.

15. El producto es finalmente convertido en una sal sódica de la manera indicada. Se obtienen 106 mg. El producto tiene la fórmula empírica C₁₀H₁₂N₆O₆P Na.

20. Como se indica anteriormente, las sales de plata pueden precipitarse a partir de soluciones acuosas concentradas de las sales sódicas de los nucleótidos de la invención y los ácidos

25. libres pueden obtenerse mediante descomposición de las sales de plata por sulfuro de hidrógeno y luego, mediante neutralización por bases minerales u orgánicas, las correspondientes sales. Además, todos los compuestos son susceptibles de acilación en las po-

30. siciones N⁶ ó 2'-O y también en las posiciones N⁸, 8-O, 8-S y N².



En particular, el tratamiento con anhídrido butírico en presencia de piridina produce derivados butirilados en N⁶ y 2'-O e igualmente en las posiciones 8-O, 8-S, N⁸ y N². Estos compuestos son de interés porque el N⁶-dibutiril-2'-O-ciclo-AMP muestra

5. en muchos ensayos in vivo una acción superior a la de la base del nucleótido.

Ejemplo 18

N⁶,2'-O-dibutiril-8-tio-ciclo-AMP.

- Se suspenden 75 mg de 8-tio-ciclo-AMP en una mezcla
10. de 2,5 ml de piridina anhidra y 1,25 ml de anhídrido butírico. Se agita durante 3 horas para completar la solución y se deja reposar a temperatura ambiente durante 20 horas. Se enfría una solución a -10° y se añaden cuidadosamente 1,5 ml de agua helada. Después de 3 horas de reposo a temperatura ambiente, se evapora
15. hasta su secamiento con un elevado vacío y se mantiene bajo este vacío durante 24 horas. Se recoge en 5 ml de agua y se fracciona en una columna de DEAE-celulosa bajo las condiciones anteriormente indicadas. La fracción que contiene al derivado butirilado se evapora hasta su secamiento; se coevapora varias veces con metanol anhidro y se recoge en 2 ml de etanol. Se añade la cantidad
20. teórica de yoduro de bario en 1 ml de alcohol (basado en el contenido en fósforo de la solución, para un átomo de P es necesario 1/2 de BaI₂). La sal de bario precipita al cabo de algún tiempo y se recupera por centrifugación, lavándose con un poco
25. de alcohol; se obtienen 29 mg del producto; una considerable cantidad del producto que permanece en los licores madres puede recuperarse en forma menos pura mediante adición de 2 a 3 volúmenes de éter anhidro. El producto tiene la fórmula empírica C₁₈H₂₃N₅O₈PS.Ba/2
30. Por su composición y espectro IR, el producto contiene sólo 2 grupos butirilos que están indudablemente en las posicio-

414721



- 25 -

nes N⁶ y 2'-O. El grupo sulfhidrilo de C⁸ no ha reaccionado, lo cual se explica por el hecho de que está completamente en la forma tautómera de la tio-cetona.

En la siguiente tabla se indican algunas características de estos derivados del ciclo-AMP que llevan sustitutivos en las posiciones 2 u 8.

Sustancia	\wedge Máx	ξ Máx	Rf en dos medios disolventes	
			A	B
8-bromo-AMP (c)	266	15200	0.43	0.63
8-tio-AMP (c)	297 ⁽¹⁾	24000 ⁽¹⁾	0.25	0.40
8-tiometil-AMP (c)	280	18400	0.48	0.66
8-hidroxi-AMP (c)	270	11500	0.38	0.48
8-amino-AMP (c)	273	16000	0.23	0.32
2-amino-AMP (c)	258	10200	-	-
	282	10200	-	-
8-amino-AMP	274	16100	0.05	0.23
8-tio-AMP	236 ⁽¹⁾	25200	0.06	0.25
	297 ⁽¹⁾	24100	-	-
Dibutiril-8-tio-AMP	246	19800	0.85	0.82
	326	25500	-	-

A = etanol:acetato amónico 0,5M (5:2 en volumen)

B = isopropanol:sulfato amónico 1% (2:1 en volumen)

25.

\wedge máx y ξ máx. medidos a un pH 7, salvo indicación en contrario.

C = ciclo

(1) = medido a un pH 11,0.

30.



Ensayos biológicos

5. Se ha examinado primeramente el comportamiento de los derivados del ciclo-AMP que llevan sustitutivos alquilos en N⁶ y del 2'-O-butil-ciclo-iso-AMP respecto a la hipófisis de ratas incubadas de acuerdo con una técnica conocida (M. Saffran en A.V. Schally, J. Biochem. of Physiol., Canadá, 33, 408, 1955).

10. Después de una incubación de 1 hora a 38° en un medio Krebs-Ringer que contiene bicarbonato sódico y glucosa, la hipófisis de ratas que han estado en presencia de los nuevos derivados ha producido más hormona tireotrópica que la hipófisis del control, determinándose el contenido de hormona tireotrópica en los productos de incubación, después de su dilución, por el método de McKenzie (J.M. McKenzie, Endocrinology, 63, 372, 1958).

15. Los resultados se exponen en la siguiente tabla, en la que las abreviaturas situadas en los encabezamientos de las columnas significan, respectivamente:

20.	Respuesta según McKenzie	- Porcentaje de incremento de la radioactividad de la sangre en unidades, medido por minuto y por ml de sangre, después de 2 horas.
	Respuesta covariación	-- Respuesta calculada por covariación después de una conversión a logaritmos decimales.
25.	Dunnet	-
	Signif. Estad.	- Significación estadística: n.s.: insignificante; + importante (p = 0,05); ++ muy importante (p = 0,01).
30.	mU HT	- Mili-unidades de hormona tireotrópica.
	mg hip.	- Por mg de hipófisis.



T A B L A

Tratamiento	Dosis en milimoles	Respuesta según McKenzie	Respuesta covarianción	Dunnet	Signif. estad.	TSHmU total	TSHmU mg/hip.
Control	-	140%	2.31	-	-	30.0	2.94
AMP (c)	5	316%	2.59	4.53	x x	76.5	5.71
di-metil-AMP (c)	3	298%	2.62	4.94	x x	70.5	5.73
mono-metil-AMP (c)	3	250%	2.54	3.66	x x	54.0	4.20
Control	-	137%	2.25	-	-	20.0	1.90
AMP (c)	3	347%	2.66	5.36	x x	60.0	4.65
t-butiril-AMP (c)	1	186%	2.39	1.81	n.s.	26.0	2.05
n-butiril-AMP (c)	1	302%	2.60	4.57	x x	46.0	3.98
mono-metil-AMP (c)	1	270%	2.51	3.41	x	40.0	2.95
O-butiril-iso-AMP (c)	1	275%	2.56	4.13	x x	42.0	2.94
Control	-	135%	2.00	-	-	20.0	1.69
n-butiril-AMP(c)	1	223%	2.23	3.77	x x	31.0	2.77
t-butiril-AMP(c)	1	164%	2.08	1.28	n.s.	23.0	1.92
AMP (c)	3	243%	2.26	4.24	x x	37.0	3.44
O-butiril-iso-AMP (c)	1.5	170%	2.13	2.10	n.s.	24.0	2.00

Se demuestra por esta tabla que los nuevos derivados del ciclo-AMP, salvo el derivado N⁶-terc.butílico, han dado lugar a notables incrementos en la liberación de hormona tireotrópica incluso a una dosis de una milimolécula, en tanto que el propio ciclo-AMP no tiene efecto alguno a esta dosis. La inferior actividad del derivado terc.butílico, en este ensayo, en comparación con el derivado n-butílico, parece atribuible al impedi-



mento estérico, estando extendido el radical n-butílico, mientras que el radical t-butílico es compacto.

5. Por el contrario, en el ensayo de la acción sobre los melanóforos del lagarto Anolis, el derivado terc. butílico y el derivado butílico normal se comportan más análogamente. Las concentraciones mínimas que han dado respuestas positivas en este ensayo han sido las siguientes:

	AMP (c)	1 milimol
	Derivado monometílico	0,43 "
10.	" dimetílico	0,56 "
	" n-butílico	0,26 "
	" t-butílico	0,28 "

15. Los derivados del ácido adenosino-3',5'-ciclo-monofosfórico que llevan sustitutivos en las posiciones 2 y/u 8 han sido estudiados con referencia a la liberación in vitro de la hormona del desarrollo hipofisario en la rata. La dosificación de la hormona del desarrollo hipofisario (GH) y de la prolactina (PR) ha sido medida por electroforesis sobre gel.

20. La siguiente Tabla indica los resultados obtenidos. Las concentraciones de nucleótidos se expresan en mM y las cantidades de hormona de desarrollo hipofisario liberadas en los medios de incubación se expresan en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de hipófisis y un porcentaje comparativo con el control.

25.

414727



- 29 -

TABLA II

Experimento	Dosis (mM)	GH μg (2 ml)	GH μg/ mg hip.	% con referencia al con- trol
<u>A</u>				
Control	-	32	1.07	-
8-amino-AMP (c)	2	74	2.72	254
8-bromo-AMP (c)	2	156	4.88	456
<u>B</u>				
Control	-	16	0.75	-
AMP (c)	5	32	1.40	186
8-tio-AMP (c)	2	92	4.53	604
8-hidroxi-AMP (c)	2	56	2.68	357
8-amino-AMP (c)	2	32	1.55	206
<u>C</u>				
Control	-	36	1.29	-
AMP (c)	4	66	2.65	205
8-tiometil-AMP(c)	2	84	3.31	256
8-tio-AMP (c)	2	82	3.37	261
8-amino-AMP(c)	2	54	2.21	171
8-bromo-AMP (c)	2	188	5.68	440
8-hidroxi-AMP (c)	2	72	2.98	231
<u>D</u>				
Control	-	23	0.81	-
AMP (c)	9	52	1.90	235
AMP (c)	3	30	0.99	122
2-amino-AMP(c)	2	41	1.47	181
8-tio-AMP (c)	2	97	3.56	439
8-bromo-AMP(c)	1	53	1.75	216



sigue TABLA II

Experimento	Dosis (mM)	CH μ g (2 ml)	GH μ g mg hip	% con referencia al control
<u>E</u>				
Control	-	21	0.69	-
8-tio-AMP (c)	1.5	62	2.19	317
8-hidroxi-AMP (c)	4	66	2.34	339
<u>F</u>				
Control	-	20	0.82	-
8-amino-AMP(c)	4	44	2.01	245
8-hidroxi-AMP(c)	4	60	2.34	285
2-amino-AMP (c)	4	37	1.58	193
DBC*	2	75	3.06	373
DBC*	1.5	56	2.53	309
<u>G</u>				
Control	-	28	1.16	-
2-amino-AMP (c)	3	52	2.88	248
<u>H</u>				
Control	-	16	0.72	-
AMP (c)	4	20	0.995	138
8-bromo-AMP (c)	2	72	3.54	490
N ⁶ ,2'-O-dibutiril-8-tio-AMP (c)	2	84	4.50	625

*DBC = N⁶,2'-O-dibutiril-ciclo-AMP.

414727



- 31 -

5. Los nuevos derivados del ciclo-AMP descritos en la presente solicitud han demostrado una actividad superior a la del propio ciclo-AMP en el estudio biológico de la liberación de hormona. El 8-tio-ciclo-AMP, el 8-bromo-ciclo-AMP y sobre todo el N⁶,2'-O-dibutiril-8-tio-ciclo-AMP, tienen una actividad superior a la del N⁶,2'-O-dibutiril-ciclo-AMP (DBC).

Los nuevos derivados del ciclo-AMP pueden emplearse en la industria para los mismos fines que el ciclo-AMP, especialmente en investigaciones bioquímicas, biológicas y farmacéuticas.

10. Los nuevos derivados son utilizables en investigaciones sobre el mecanismo de la acción hormonal. Teniendo en cuenta que desempeñan un papel de segundo mensajero para la acción hormonal, pueden sustituir la acción de las propias hormonas en el organismo.

15.

N O T A

La Patente de Introducción, que se solicita por diez años para España, de acuerdo con la vigente Legislación, deberá recaer sobre: "PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE DERIVADOS NUCLEOSIDOS", citándose como Fuente de Procedencia Solicitud de Patente en Francia número 69 34747 de 10-10-1969 y de Adición número 70 35682, de 2-10-1970, según las características esenciales de las siguientes:

20.

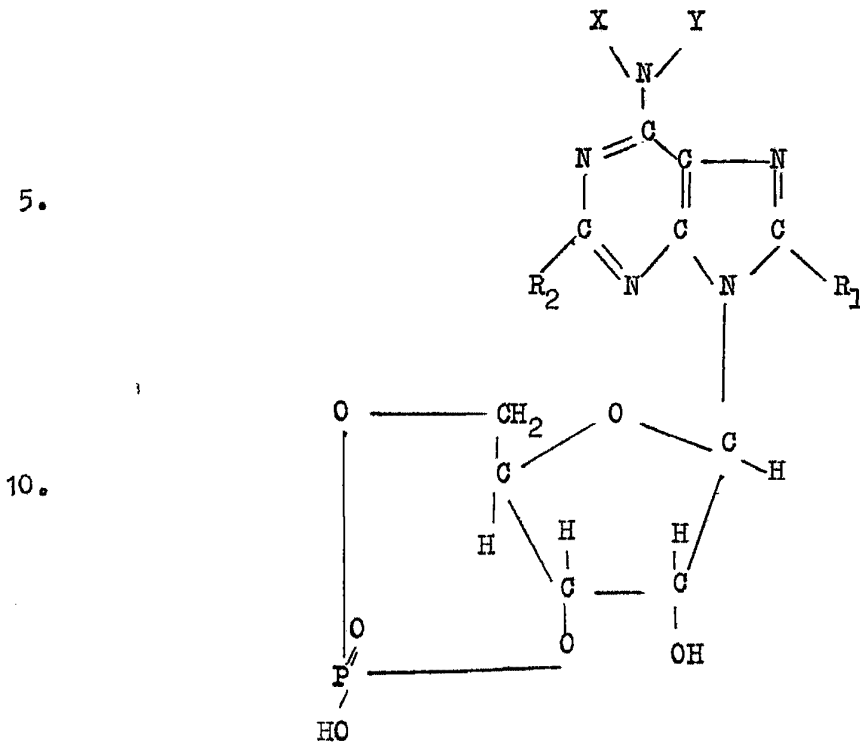
R E I V I N D I C A C I O N E S

25.

1ª.- Procedimiento de producción de derivados nucleósidos seleccionados entre la clase consistente en:

A. Derivados del ácido adenosino-3',5'-monofosfórico de fórmula:

ME



20.

en la que el valor de los símbolos X, Y, R₁ y R₂ puede seleccionarse del caso en que R₁ y R₂ y uno de los símbolos X e Y sean hidrógenos y el otro símbolo X ó Y sea hidrógeno o alquilo, y cuando X e Y son ambos hidrógenos, R₁ es seleccionado entre la clase consistente en hidrógeno, bromo, sulfhidrilo, hidroxilo, tiometilo y amino y R₂ es hidrógeno o amino;

B. El derivado 2'-O-butirilo del ácido iso-adenosino-3',5'-monofosfórico; y

25.

C. Las sales de A y B formadas por salificación del grupo hidroxilo ligado al átomo de fósforo, que comprende la reacción de un derivado N⁶-monoalquilo ó N⁶,N⁶-dialquilo del ácido adenosino-5'-monofosfórico con p-nitrofenol en presencia de dicitclohexil-carbo-diimida y la sujeción del éster obtenido a tratamiento con terc.butóxido potásico.

30.

2ª.- Procedimiento de producción de derivados nucleósidos, según la reivindicación 1ª, en el que el éster es tratado en la forma de su sal trietilamónica.

ME



3ª.- Procedimiento de producción de derivados nucleósidos, según reivindicaciones anteriores en el que la producción de ácido 8-bromo-adenosino-3',5'-monofosfórico comprende la sujeción del ácido 8-bromo-adenosino-5'-monofosfórico al proceso definido en la reivindicación 6ª para efectuar una ciclización.

5.

4ª.- Procedimiento de producción de derivados nucleósidos, según reivindicaciones anteriores en el que la producción de ácido 8-bromo-adenosino-3',5'-monofosfórico comprende la sujeción de ácido adenosino-3',5'-monofosfórico a tratamiento con agua de bromo.

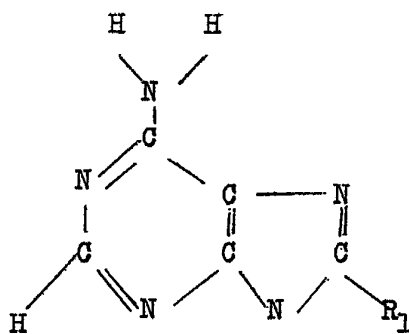
10.

5ª.- Procedimiento de producción de derivados nucleósidos, según reivindicaciones anteriores, en el que la producción de ácido 8-bromo-adenosino-3',5'-monofosfórico comprende la reacción de ácido 8-bromo-adenosino-5'-monofosfórico con dicitclohexil-carbo-diimida en piridina, en presencia de dimetil-formamida.

15.

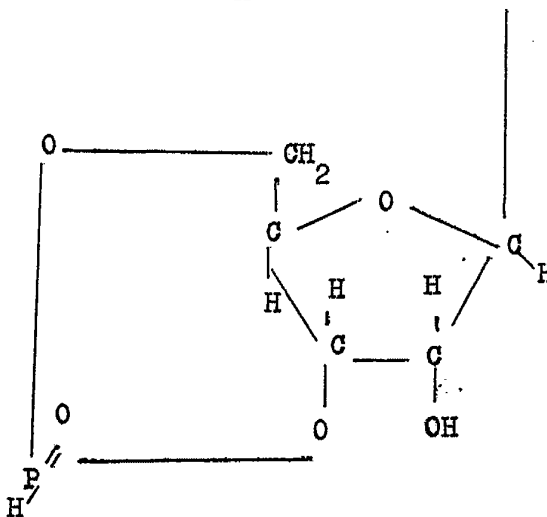
6ª.- Procedimiento de producción de derivados nucleósidos, según reivindicaciones anteriores, de la fórmula general

20.



25.

30.



ME

414727



- 34 -

5. en la que R_1 es seleccionado entre la clase consistente en OH, SH y SCH_3 , que comprende la reacción de ácido 8-bromo-adenosino-3',5'-monofosfórico con un reactivo seleccionado entre acetato sódico, sulfhidrato sódico y metil-mercaptato sódico, respectivamente.

10. 7^a.- Procedimiento de producción de derivados nucleósidos, según reivindicaciones anteriores en el que la producción de ácido 8-amino-adenosino-3',5'-monofosfórico comprende la sujeción de ácido 8-adenosino-5'-monofosfórico al proceso definido en la reivindicación 1^a para efectuar una ciclización.

15. 8^a.- Procedimiento de producción de derivados nucleósidos, según reivindicaciones anteriores en el que la producción de ácido 8-amino-adenosino-3',5'-monofosfórico comprende la reacción de ácido 8-amino-adenosino-5'-monofosfórico con dicitclohexil-carbodiimida en piridina, en presencia de dimetil-formamida.

20. 9^a.- Procedimiento de producción de derivados nucleósidos, según reivindicaciones anteriores en el que la producción de ácido 2'-O-butiril-iso-adenosino-3',5'-monofosfórico comprende la sujeción de un compuesto seleccionado entre la clase consistente en ácido iso-adenosino-3',5'-monofosfórico y su sal trietilamónica a la acción de un agente butirilador.

25. 10^a.- Procedimiento de producción de derivados nucleósidos, según la reivindicación 9^a, en el que el agente butirilador es anhídrido butírico usado en exceso y la reacción se efectúa en presencia de piridina a temperatura ambiente.

30. 11^a.- Procedimiento de producción de derivados nucleósidos, según reivindicaciones anteriores en el que la producción de derivados butirilos del ácido adenosino-3',5'-monofosfórico que lleva sustitutivos por lo menos en una de las posiciones 2 y 8, en el que los grupos butirilos están fijados en posiciones seleccionadas entre N^6 , 2'-O, N^8 , N^2 , 8-O y 8-S, comprende

ME

414727



- 35 -

el tratamiento de ácidos adenosino-3',5'-monofosfóricos que tienen sustitutivos por lo menos en una de las posiciones 2 y 8, con anhídrido butírico en presencia de piridina anhidra.

5. 12ª.- PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE DERIVADOS NUCLEOSIDOS.

Según queda sustancialmente descrito en la presente memoria, que consta de treinta y cinco hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 1 de agosto de 1975

10.

NELSON RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY

P. P.

FRANCISCO GARCIA CABRERIZO
P.P.

Firmado: Mr. Delores Torquera

ME