

O. G. 24.775.-MY.



PATENTE DE INTRODUCCION 414728

MEMORIA DESCRIPTIVA

Sobre:

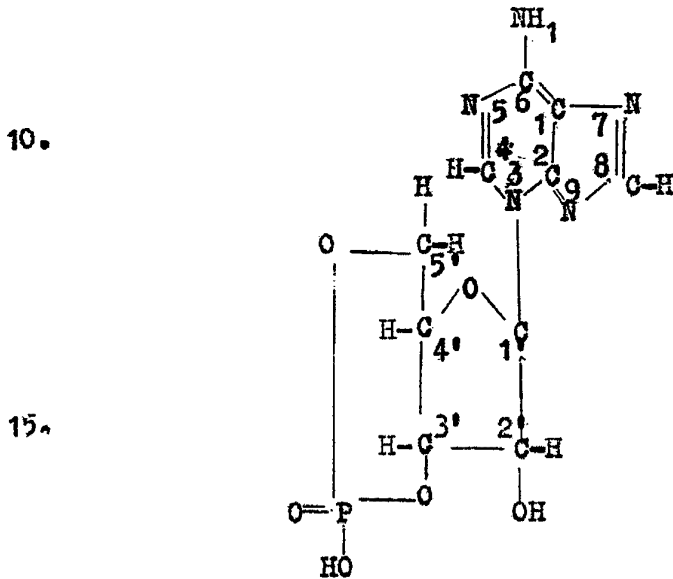
"METODO DE PRODUCCION DEL ACIDO ISO-ADENOSINO-3',5'-MONOFOSFORICO Y SUS SALES"

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



Esta invención se relaciona con nuevos compuestos químicos de utilidad terapéutica.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona ácido iso-adenosino-3',5'-monofosfórico (al que se hace referencia aquí por brevedad como "iso-AMP cíclico"), correspondiente a la fórmula



y sus sales.

20. Análogamente al ácido adenosino-3',5'-monofosfórico (AMP cíclico), que actúa como es sabido como segundo mensajero intracelular respecto a un gran número de hormonas, el iso-AMP cíclico genera la dispersión de melanóforos en la piel de la rana in vitro y la dilatación de melanóforos en la piel del lagarto in vitro e incrementa la liberación de la hormona tireotrope

25. (TSH) por la hipófisis en las ratas in vitro, pero en todos estos ensayos se muestra claramente superior al nucleótido básico (AMP cíclico), lo que es sorprendente.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, el compuesto iso-AMP cíclico se prepara mediante transformación de iso-AMP (no cíclico) en una forma de éster p-nitrofenólico, por ac-

30.



ción de p-nitrofenol en presencia de carbodiimida dicitclohexílica y ulterior tratamiento de este éster con (terc)-butóxido potásico.

5. El siguiente ejemplo ilustra la producción de iso-AMP cíclico.

Preparación del ácido iso-adenosino-3',5'-fosfórico (iso-AMP cíclico) y sus sales.

10. Se preparó el ácido iso-adenosino-5'-fosfórico (iso-AMP) de acuerdo con el método de Leonard y Laursen (Biochemistry 4, 354 (1965)).

15. Se disolvieron 50 mg de iso-AMP, en forma del ácido libre, cuidadosamente secado, en una mezcla de 2 ml de piridina y 2 ml de dimetilformamida. Se añadió 0,104 ml de tri-n-butilamina, 557 mg de p-nitrofenol y 824 mg de carbodiimida dicitclohexílica. Se agitó la mezcla en la oscuridad durante 48 horas. Entonces entró en solución el nucleótido. Mediante cromatografía en papel (etanol/acetato amónico, 0,5 M, 5:2 en volumen), se detectaron tres sustancias: el éster p-nitrofenólico de iso-AMP, el correspondiente pirofosfato simétrico y el exceso de p-nitrofenol.
20. Luego se evaporó la solución hasta su secamiento y se recogió el residuo en 10 ml de agua. Después de su filtración y extracción por 5 veces, se secó, cada vez con 10 ml de éter, para separar el p-nitrofenol y el exceso de carbodiimida dicitclohexílica. Se vertió la solución acuosa en una columna (40 cm de longitud y 2,8
25. de diámetro) de celulosa DEAE en forma de su bicarbonato. Se lavó la columna con 500 ml de agua doblemente destilada y se efectuó una elución mediante gradiente de concentración por medio de agua gradualmente dosificada con bicarbonato trietilamónico 0,1 M (pH 7,5) (empleándose hasta un total de 3 litros de mezcla). Se
30. recogieron fracciones de 20 ml. Mediante indicación por cromatografía en papel, el éster p-nitrofenólico del iso-AMP se halla



contenido en las fracciones 45-80. Estas fracciones, mezcladas de nuevo entre sí, fueron evaporadas hasta su secamiento y co-evaporadas varias veces con metanol para eliminar la trietilamina. Producción: 76-80% de la dosificación total de fósforo.

5.  $\lambda_{\text{máx.}}$ , 256m $\mu$ ;  $\epsilon_{\text{máx.}}$ , 19.600.

Se evapora la solución hasta su secamiento. El residuo, que es la sal trietilamónica del éster, se seca sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bajo un elevado vacío. Se obtienen 186 mg, que se disuelven en 20 ml de sulfóxido dimetílico anhidro, añadiéndose 2 ml de una

10. solución de t-butóxido potásico en t-butanol anhidro, lo que produce la formación de iso-AMP cíclico con la liberación de P-nitrofenato. Al cabo de 3 horas a temperatura normal, se añadieron 10 veces la cantidad teórica de DOWEX 50 (forma NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), secado bajo

15. vacío a 65°. La mezcla fue agitada y filtrada. Se lavó la resina con amoníaco 0,2 M hasta la completa elución del nucleótido cíclico. Se separó el amoníaco mediante evaporación con vacío y se produjo un fraccionamiento, como se indica anteriormente, en

una columna de celulosa DEAE. Los tubos 70-100 contenían el nucleótido cíclico; su contenido fue evaporado hasta su secamiento bajo vacío. El residuo se recogió en 0,5 ml de metanol y se añadieron 2,5 ml de una solución 0,5 M de perclorato sódico en acetona; se completó la precipitación mediante adición de 5 ml de acetona anhidra. Se recuperó la sal sódica por centrifugación y se lavó con acetona anhidra. Producción en la dosificación de

25. fósforo y en absorción UV: 56%

$\lambda_{\text{máx.}}$ , 278 m $\mu$ ;  $\epsilon_{\text{máx.}}$ , 14.800 (en solución acuosa a un pH 70).

Se purifica de nuevo el producto por precipitación de una solución acuosa concentrada por medio de nitrato de plata en un ligero exceso. El precipitado se lava con etanol al 50%. El análisis elemental de la sal de plata dio los resultados correc-

30.



tos. Mediante descomposición en solución acuosa por medio de sulfuro de hidrógeno, se obtiene una solución de iso-AMP cíclico en forma de ácido libre. Este último es amorfo. Mediante neutralización con una base mineral u orgánica, se obtienen las correspondientes sales.

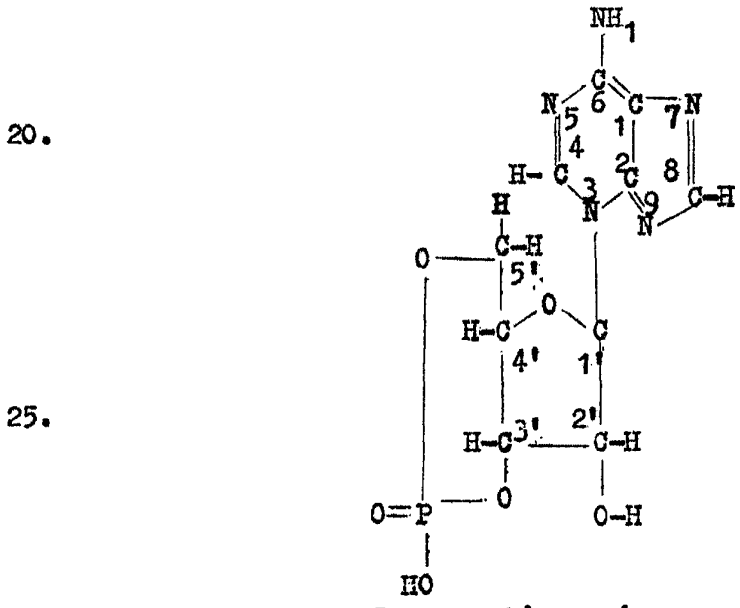
El ácido iso-adenosino-3',5'-monofosfórico y sus sales son útiles en investigaciones bioquímicas y farmacéuticas.

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: "METODO DE PRODUCCION DEL ACIDO ISO-ADENOSINO-3',5'-MONOFOSFORICO Y SUS SALES", citándose como Fuente de Procedencia: Patente en U.S.A. nº 3.627.753, según las características esenciales de las siguientes:

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

1ª.- Método de producción del ácido iso-adenosino-3',5'-monofosfórico y sus sales, de fórmula



que comprende la reacción de ácido adenosino-3',5'-monofosfórico con p-nitrofenol en presencia de carbodiimida dicitclohexílica y la reacción del producto con terc-butóxido potásico.



1975

2ª.- METODO DE PRODUCCION DEL ACIDO ISO-ADENOSINO-3',5'  
-MONOFOSFORICO Y SUS SALES.

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

Madrid, 1 de agosto de 1975

NELSON RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY

P. P.

FRANCISCO GARCIA CABRERIZO  
P. P.

Firmado: Mr. Carlos Cordero