

424457

## memoria descriptiva

Int. CIA. 607D//A61K

CLASE DE  
REGISTRO

Una Patente de Invención, por veinte años en España.

NOMBRE Y  
NACIONA-  
LIDAD DEL  
SOLICITANTE

ICN PHARMACEUTICALS, INC.  
-Sociedad de EE.UU.-

RESIDENCIA  
Y DOMICILIO

Irvine (California) (EE.UU.)  
2727 Campus Drive.

OBJETO

"Procedimiento para la preparación de derivados de  
9- $\beta$ -D-arabino furanosil nucleótidos".

Inventores

Richard L. TOLMAN, Robert William SIDWELL, (Ambos de EE.UU.)  
Canapathi Ramakrishan REVANKAR. (Súbdito indio).

Prioridad

Solicitud Patente USA Nº 342.617 del 19 de Marzo de 1973  
Solicitud Patente USA Nº 451.639 del 15 de Marzo de 1974.

POOR  
QUALITY

1 Durante el pasado decenio se ha encontrado que mu-  
chos análogos de nucleósidos exhibían buenas actividades an-  
titumorales y antivirales. Entre los agentes antivirales nu-  
cleosídicos, sin-téticos, conocidos al presente, generalmen-  
5 te se considera que son los más importantes 5'-yodo-2'deoxi  
ridina (IDU); 9- $\beta$ -D-arabinofuranosiladenina (Ara-A); y 1- $\beta$ -D-  
arabinofuranosilcitosina (Ara-C). De estos compuestos sólo -  
IDU está comercialmente disponible específicamente como un -  
agente antiviral y este compuesto tiene solubilidad extrema-  
10 damente baja, es decir, una solubilidad máxima de alrededor  
de 0,1 por ciento de peso y también es altamente tóxico. Ara  
-A, al presente, se está sometiendo a ensayos clínicos como  
un agente antiviral y mientras que la evidencia in'ormada su  
giere que Ara-A es un agente eficaz contra un espectro de in  
15 fecciones de virus, su utilidad está severamente limitada -  
por su baja solubilidad y por síntomas tóxicos para los se-  
res humanos, que incluyen náusea ligera, leucopenia transito  
ria y afecciones del sistema nervioso central, que causan -  
ilusiones y alucinaciones.

20 Cuando se usaron análogos nucleosídicos, para inhi-  
bir el crecimiento viral o tumoral, los nucleósidos usualmen  
te se metabolizan en vivo a sus correspondientes monofosfa-  
tos o polifosfatos, que son los inhibidores efectivos de tal  
25 crecimiento. Un obstáculo principal en el uso de análogos de  
nucleósido en la quimioterapia ha sido la emergencia de re-  
sistencia celular, por la que tales compuestos son degrada-  
dos a una forma, en que pueden ser inhibidores menos efica-  
ces. Por lo tanto, es deseable tener análogos nucleosídicos,

30

1 que sean capaces de inhibir eficazmente el desarrollo de in-  
fecciones de virus y que también posean superior solubilidad  
y menor toxicidad que los agentes antivirales conocidos al -  
presente. La producción de tal compuesto, sin embargo, es -  
5 bastante difícil, ya que se conocen relativamente pocos com-  
puestos nucleosídicos, que hayan demostrado actividad antivi-  
ral, aún en laboratorio. Además, para procurar tal compuesto,  
que tenga actividad aceptable y que sea también capaz de po-  
nerse en contacto con la infección de virus en concentracio-  
10 nes efectivas, hace excesivamente difícil esta tarea.

En la solicitud de patente alemana nº 2.047.368 se  
sugiere 9-D-arabinofuranosiladenina-5'-fosfato como un com-  
puesto útil como agente antiviral. Este compuesto, sin embar-  
15 go, como un análogo de AMP y un precursor para un análogo -  
de ATP se degrada rápidamente en el sistema metabólico (even-  
tualmente a ácido úrico). Puesto que los niveles de ATP en -  
el sistema metabólico se mantienen cuidadosamente por el sis-  
tema metabólico a bajos niveles, la eficacia de tales com- -  
20 puestos como agentes antivirales se disminuye correspondien-  
temente.

En vista de la que precede, se ha tratado de prepa-  
rar análogos nucleosídicos adicionales con el fin de investi-  
gar las posibilidades de que algunos de tales compuestos pue-  
25 dan ser capaces de resistir a una rápida degradación metabó-  
lica y también de penetrar a través de la membrana celular  
y de ponerse en contacto con infecciones de virus en concen-  
traciones eficaces. Como resultará evidente de la siguiente  
descripción, se ha sintetizado 9-D-arabinofuranosilhipoxan-  
30 tina-5'-fosfato y se ha encontrado que tal compuesto demues-



1 alcalino térreo u otro metal que forme un compuesto fisiológicamente aceptable.

5 Cuando AP es fosforilado en la posición 3', R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son los mismos que se han descrito arriba para la posición 5'.

Quando AP es 3', 5' fosfato cíclico, la mitad de fosfato está enlazada a la base de azúcar en la posición 3' OH y R<sub>1</sub> es como se ha descrito arriba.

10 Los 9-β-D-arabinofuranosil purina nucleótidos de este invento pueden prepararse por los métodos descritos en los ejemplos I-XI que seguirán.

15 9-β-D-arabinofuranosiladenina nucleótidos pueden ser preparados primeramente haciendo reaccionar el apropiado furanosil-nucleosido con un adecuado compuesto de oxicluro de fósforo, como por ejemplo oxicluro de fósforo o su metil éster, fosforo dicloridato, en un adecuado disolvente de trialquilfosfato, preferentemente trimetilfosfato, para formar el correspondiente furanosil nucleótido. El nucleosido se añade al compuesto de oxicluro de fósforo en solución con agitación y se deja proseguir la reacción hasta completarse a temperaturas desde alrededor de 0° hasta alrededor de 15° en un tiempo que va desde alrededor de 3 horas hasta alrededor de 24 horas. El producto de nucleótido de la primera etapa, después se trata con un carbonato alcalino, como por ejemplo, bicarbonato sódico o bicarbonato potásico hasta que se consiga un pH estable desde alrededor de 5 hasta alrededor de 7. El nucleótido de adenina después se recupera, por ejemplo, por cromatografía y liofilización.

1 zación.

5 También gueden ser preparados 9- $\beta$ -D-arabinofurano  
silhipoxantina nucleótidos haciendo reaccionar el apropiado  
nucleotido de adenina en agua con ácido acético glacial y -  
10 nitrito sódico. El nitrito sódico se añade preferentemente  
a una solución del nucleótido y ácido acético glacial y se  
deja proseguir la reacción hasta completarse a temperaturas  
desde alrededor de 10° hasta alrededor de 30° y preferente-  
mente de 20° a 25°. El periodo de reacción puede ser desde  
alrededor de 15 horas hasta alrededor de 24 horas. El pro--  
ducto de nucleótido es recuperado y neutralizado con un car-  
bonato alcalino como por ejemplo bicarbonato potásico o bi-  
carbonato sódico y se recupera, por ejemplo, por cristaliza-  
15 ción.

20 En los siguientes ejemplos, los espectros ultra-  
violeta fueron registrados en un espectrofotómetro Cary-15  
y los espectros infra-rojos fueron determinados en un espec-  
trofotómetro Perkin-Elmer modelo 257. Todas las temperatu--  
ras son en grados centígrados y todas las partes son de pe-  
so, a no ser que se especifique de otra manera.

EJEMPLO I

9- $\beta$ -D-arabinofuranosilhipoxantina-5'-fosfato - Método 1

25 A una suspensión enfriada en hielo de 9- $\beta$ -D-arabi-  
nofuranosiladenina-5'-monofosfato (ara-AMP) (2,0 g) en agua  
(15 ml.) y ácido acético glacial (3,0 ml.) se añadió nitri-  
to sódico (2,5 g). El matraz fue tapenado de modo suelto y  
se agitó durante 2-3 horas en el baño de hielo. Se continuó  
la agitación durante la noche (15-16 horas) sin añadir hie-

30

1 lo al baño de hielo. Tlc (gel de sílice, disolvente L<sub>2</sub>: IPA/  
NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O, 55/10/35, v/v) indicaron el completamiento de la  
reacción. La solución clara, incolora fue evaporada al vacío  
5 hasta sequedad, el residuo fue disuelto en agua (20 ml.) y  
se neutralizó cuidadosamente con KHCO<sub>3</sub> sólido. La solución  
neutro fue aplicada a una columna conteniendo 75 ml de Dowex  
50(H<sup>+</sup>) de resina de intercambio de iones. La columna fue la-  
vada con agua y las fracciones conteniendo material absorben-  
te de rayos ultravioleta se reunieron y concentraron al va-  
10 cío hasta alrededor de 25 ml. Etanol, (50 ml). se añadió a -  
la solución concentrada y se enfrió durante la noche. El sólido  
que se separó fue recogido, lavado con agua fría y cristali-  
zando desde agua como agujas incoloras.

15 punto de fusión-198-199° (dec.); (a)<sub>D</sub><sup>25</sup> + 9.8 (c = 1, agua)  
rendimiento - 1.60 g (79.8%)

Anal. calc'd por C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>P (348.2): C, 34.48; H, 3.74; N,  
16.10

Hallado C, 34.45; H, 3.80; N, 15.89.

20 Uv: pH<sup>1</sup><sub>max</sub> 249 mu (€ 12,700)  
pH<sup>7</sup><sub>max</sub> 248 mu (€ 13,600)  
pH<sup>11</sup><sub>max</sub> 252 mu (€ 14,400)

#### EJEMPLO II

25 9-β-D-arabinofuranosilhipoxantina-5'-fosfato - Método 2.

Ara-I (9-β-D-arabinofuranosil-hipoxantina) se añá-  
dió con agitación a una mezcla previamente refrigerada (ba-  
ño de hielo 5°) de 100 ml. de trimetil fosfato y 12,3 g. de  
oxicloruro de fósforo. Después de todo, el sólido se había  
disuelto (5 minutos), se almacenó durante 4 horas a 0°. Tlc  
30

1 (gel de sílice, disolvente IPA/NH<sub>4</sub>OH/ H<sub>2</sub>O; 55/10/35) indicó  
que la reacción era completa, y se vertió lentamente en agua  
de hielo conteniendo 26,3 g. de NaHCO<sub>3</sub>. La solución de agua  
de hielo se dejó reposar durante 1 hora para estabilizar el  
5 pH a 6. La solución fue extraída con éter (3 x 75 ml) para  
eliminar el trimetilfosfato. El volumen de la fase acuosa -  
fue reducido al vacío hasta que comenzaron a formarse cris-  
tales (sal), se añadió agua para disolver los cristales, y  
la solución fue aplicada en la cima de una columna de car-  
10 bón vegetal de 750 g. de Barneby Cheney. El carbón vegetal  
fue lavado con agua para eliminar las sales y después el -  
producto fue eluido con 50% de MeOH conteniendo 10% de NH<sub>4</sub>OH  
El eluyente fue reducido a un pequeño volumen al vacío (de-  
sapareció el olor de amoniaco) y el pH fue ajustado a 2. Se  
15 añadió EtOH hasta que la solución se hizo turbia y la solu-  
ción fue almacenada a 5°. Se filtraron los cristales y se -  
secaron a 40° bajo el vacío de un aspirador. (primera cose-  
cha-5,5 g); nmr (DMSO-d<sub>6</sub>), 8,1, 8,19 (2H, s, H-2, H-8) 6,28  
(1H, m, H-1').

20 EJEMPLO III

9-β-D-arabinofuranosiladenina-5'-O-metilfosfato

Metil fósforo dicloridato (10,0 g., 0,067 moles)  
entrimetil fosfato recién destilado (100,0 ml, 0,71 moles)  
se enfriaron a 0-5° en un baño de hielo. El baño de hielo -  
25 fue separado como 9-β-D-arabinofuranosiladenina (10,0 g., -  
0,037 moles, secado a 80° durante 5 horas) fue añadido. No  
hubo aumento inicial de temperatura observable. La tempera-  
tura fue observada entre 5-20°. Después de 2 horas se obtu-  
30 vo una solución clara, que fue almacenada por la noche a 4°.

1 La solución entonces fue vertida sobre agua de hielo (400,0  
ml). conteniendo 6,0 g: de bicarbonato sódico. Se añadió pe-  
riódicamente bicarbonato sódico adicional hasta que el pH -  
fue estable a 5-6, durante alrededor de 1 hora. Se separó tri-  
5 metil fosfato por extracción con éter (4 x 150 ml). El éter  
disuelto y el exceso de agua se eliminaron por evaporación a  
presión reducida/hasta que las sales comenzaron a cristalizar. Se  
añadió bastante agua para conseguir la solución y se compro-  
bó el pH (6-7). La solución fue añadida cuidadosamente a la  
10 parte superior de una columna Dowex 1 x 2 (forma de formato  
malla 100-200, 300 ml) La columna fue lavada con agua hasta -  
que ya no se detectaron en el eluyente más especies absorben-  
tes en ultra-violeta. La elución gradual (agua a 0,1 M de áci-  
do fórmico) dió el producto en una banda gruesa. Las fraccio-  
15 nes apropiadas fueron evaporadas al vacío, manteniendo la -  
temperatura por debajo de 30°, hasta alrededor de 100 ml. La  
solución restante fue congelada y liofilizada para obtener un s

Punto de fusión

20 170-190° (dec.); (a)<sub>D</sub><sup>25</sup> + 48.7° (c 1.0, agua); uv.  $\text{PH}^1_{\text{max}} 257 \text{ nm}$

( $\epsilon$  14,200);  $\text{PH}^7_{\text{max}} 258 \text{ nm}$  ( $\epsilon$  13,000);  $\text{PH}^{11}_{\text{max}} 258 \text{ nm}$  ( $\epsilon$  13,000).

Anal. calcd. por  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}$  (361.25); C, 36,57; H, 4.47; -  
N, 19,39.

25 Hallado C, 36,42; H, 4.26; N, 19.19.

#### EJEMPLO IV

9- $\beta$ -D-arabinofuranosilhipoxantina-5'-O-metilfosfato

A una solución enfriada en hielo de 9- $\beta$ -D-arabino-  
furanosil-adenina-5'-O-metilfosfato (2,0 g., 0,0055 moles)

30

1 (preparado por el método del Ejemplo III) en agua (15,0 ml.)  
y ácido acético glacial (3,0 ml.) se añadió nitrito sódico -  
2 (2,25 g., 0,032 moles). El matraz fue taponado de modo suel-  
to y se agitó durante 2-3 horas en un baño de hielo. La agi-  
5 tación fue continuada por la noche (15-16 horas) sin añadir  
hielo al baño de hielo. Tlc (gel de sílice, disolvente IPA/-  
NH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O; 55/10/35; v/v) indicó que se había completado la -  
reacción. La solución clara incolora fue evaporada al vacío  
a sequedad. El residuo fue disuelto en agua (10 ml.) y se -  
10 neutralizó cuidadosamente con bicarbonato potásico sólido. -  
La solución neutra fue aplicada a una columna conteniendo 80  
ml. de Dowes 50 x 8 (H<sup>+</sup>) de resina de intercambio de iones.  
La columna fue lavada con agua y las fracciones conteniendo  
15 material absorbente de rayos ultravioleta se reunieron y con-  
centraron al vacío hasta alrededor de 20 ml. Se añadió eta-  
nol (50 ml.) a la solución acuosa concentrada y se refrigeró  
por la noche. Se recogió el sólido que se había separado, se  
lavó con un pequeño volumen de agua fría y se cristalizó des-  
de etanol acuoso para rendir 1,65 g.

20 (82.3%), m.p. 160-180° (dec.); (a)<sub>D</sub><sup>25</sup> + 55.7° (c 1.0, agua);

uv,

PH 1 max 248 nm (ε 10,300); (ε 10,300); PH 7 max 248 nm (ε 9,900); -

PH 11 max 251 nm (ε 12,000).

25 Anal. calcd por C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>P (362.23); C, 36.48; H, 4.17; -  
N, 15.46.

Hallado C, 36.22; H, 4.39; N, 15.49

#### EJEMPLO V

9-β-D-arabinofuranosil-N<sup>1</sup>-hidroxihipoxantina-5'-fosfato.

30

1 A una suspensión enfriada en hielo de 9-β-D-arabino  
furanosiladenina-N<sup>1</sup>-óxido-5'-fosfato (preparado como se ha -  
descrito comunmente en la solicitud pendiente de R. Sidwel y  
otros, 9-β-D-arabinofuranosiladenina-5'-fosfatos, serie n<sup>o</sup> -  
5 383.661 de EE.UU. cuya exposición está incorporada en la presen-  
te como referencia) (2.0 g., 0,0055 moles) en agua (15 ml.)  
conteniendo ácido acético glacial (3,0 ml.) se añadió nitri-  
to sódico (2,5 g., 0,036 moles). El matraz fue taponado de -  
modo suelto y se agitó durante 2-3 horas en un baño de hielo.  
10 Se dejó proseguir la reacción durante otras 15 horas. Después  
de evaporación de la mezcla de reacción clara y neutraliza-  
ción con bicarbonato potásico, se trató de la misma manera -  
que se describió en el ejemplo IV para producir:

15 1:35 g (67.3%) punto de fusión 150° (dec.); uv,

PH 1  
max 251 nm (ε 11,650); PH 7  
max 255 nm (ε 11,650); PH 11  
max 255 nm  
(ε 12,000).

Anal. calcd por C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>P (364.20): C, 32.98; H, 3.59; -

N, 15.38.

Hallado:

20 C, 32.82; H, 3.62; N, 15.19.

#### EJEMPLO VI

9-β-D-arabinofuranosil-N<sup>1</sup>-benciloxihipoxantina-5'-fosfato.

Una solución de 9-β-D-arabinofuranoxil-N<sup>1</sup>-hidroxi-  
hipoxantina-5'-fosfato (1,12 g, 0,0030 moles) en DMSO seco -  
25 (10 ml. se trató con 1,5-diazabicyclo (5,4,0) Undec-5-ene -  
(DBU, 0,5 g) y se agitó a temperatura ambiente. El precipita-  
do gelatinoso, que se había formado inicialmente, se disol-  
vió después de 30 minutos con agitación rápida. La mezcla -  
fue tratada con bencil bromuro (0,65 g., 0,0038 moles) y se

30

1 continuó la agitación a temperatura ambiente durante la noche. Tlc (gel de sílice, disolvente IPA/NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O; 55/10/35, (v/v) indicó que se había completado la reacción. La mezcla de reacción entonces fue vertida en una mezcla fría (0-5°) de  
5 etanol-éter (1:1, 500 ml.) La mezcla fue filtrada y el residuo blanco fue lavado cuidadosamente con éter anhidro (5 x 50 ml.). El sólido higroscópico fue disuelto en un volumen mínimo de agua y la cuidadosa adición de etanol hizo que el producto se precipitase como cristales blancos. La mezcla fue en  
10 friada durante la noche y el producto fue recogido, lavado con etanol y secado para producir 0,80 g.

(57.4%) punto de fusión 165°>(dec.); uv,  $\text{pH } 1$   $\text{max}$  250 nm

( $\epsilon$  13.600);

15  $\text{pH } 7$   $\text{max}$  255 nm ( $\epsilon$  14,500);  $\text{pH } 11$   $\text{max}$  255 nm ( $\epsilon$  14,500).

Anal. calcd. por C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>P (454.33); C, 44,91; H, 4.21; N, 12.33.

Hallado C, 45.18; H, 4.43; N, 12.61.

#### EJEMPLO VII

20 9- $\beta$ -D-arabinofuranosil-N<sup>1</sup>-metilhipoxantina-5'-fosfato.

9- $\beta$ -D-arabinofuranosilhipoxantina-5'-fosfato (3,0 g., 0,0086 moles) se disolvió en piridina seca (90 ml.) conteniendo trietilamina (2,25 g.) y anhídrido acético (5,7 g.) y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante 3  
25 horas. La solución amarilla pálida fue evaporada al vacío y el residuo oleoso fue mezclado con alrededor de 50 g. de hielo. De nuevo se evaporó a sequedad. Este procedimiento fue repetido tres veces con porciones de hielo de 25 g. El resi--

30

1       duo fue recogido en 100 ml. de agua y extraído con éter. La  
solución acuosa clara fue congelada y liofilizada para obte-  
ner 0,5 g. de sal trietil amónica a modo de jarabe de 9-(2,3  
-di-o-acetil- $\beta$ -D-arabinofuranosil) hipoxantina-5'-fosfato.

5               La sal de trietilamonio (2,5 g.) fue disuelta en DMSO  
anhidro (50 ml.) y se añadió a ello hidruro de sodio (350 mg  
dispersión en aceite al 57%). La mezcla fue agitada a tempera-  
tura ambiente, con exclusión de humedad, durante 2 horas. La  
mezcla clara fue tratada con yoduro de metilo (.50 ml.) y la  
10       agitación continuó durante 4 horas. La mezcla de color casta-  
ño entonces fue vertida en una mezcla fría de etano-éter -  
(600 ml. (1:3)) y se enfrió durante la noche. La mezcla fue  
filtrada, el residuo disuelto en un pequeño volumen de agua  
y se aplicó a una columna de Dowex 1 x 2 (forma de formato,  
15       malla 100-200, 75 ml.) El producto fue eluido con agua y las  
fracciones apropiadas fueron evaporadas al vacío para dar un  
jarabe incoloro (2,0 g.) El mismo fue desacetilado con amoniaco  
metanólico (50 ml., saturado a 0°), a temperatura ambiente -  
durante 15 horas. El sólido blanco fue recogido, disuelto en  
20       agua (10 ml.) y se hizo pasar a través de una columna de Do-  
wex 50 x 8 (H<sup>+</sup>) (25 ml.). El eluato fue concentrado al vacío  
hasta alrededor de 5 ml. y se añadió etanol. El precipitado,  
que se separó después de enfriar, fue recogido y cristaliza-  
do desde etanol acuoso para producir 0,30 g. punto de fusión.

25       125° (dec.); uv,  $\text{pH}_{\text{max}}^{1253 \text{ nm}} (\epsilon 7,900)$ ;  $\text{pH}_{\text{max}}^{7261 \text{ nm}} (\epsilon 7,200)$ ;

$\text{pH}_{\text{max}}^{11261 \text{ nm}} (\epsilon 7,200)$ .

Anal. calcd por  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_8\text{P}$  (362.23); C, 36.48; H, 4.17; -  
N, 15.47.

30       Hallado C, 36.28; H, 4.36; N, 15.32.

EJEMPLO VIII

9-β-D-arabinofuranosil-N<sup>1</sup>-metilhipoxantina-5'-O-metilfosfato

Una solución de 9-β-D-arabinofuranosilhipoxantina-5'-fosfato (1,0 g., 0,0028 moles) en DMSO seco (10 ml.) fue tratado con 1,5-diazabicyclo (5,4,0) undec-5-ene (0,5 g.) seguido de yoduro de metilo (2,0 ml). Se dejó proseguir la reacción durante 15 horas a temperatura ambiente y se trató de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo VI para producir

0.40 g (37.0%) punto de fusión 162-52 (dec.); uv,  $\text{PH}^1_{\text{max}}$  253 nm ( $\epsilon$  10,050);  $\text{PH}^7_{\text{max}}$  253 nm ( $\epsilon$  9,500);  $\text{PH}^{11}_{\text{max}}$  265 nm ( $\epsilon$  7,450).

Anal. calcd. por C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>P (376.26): C, 38.31, H, 4.55; N, 14.89

Hallado C, 38.14; H, 4.68; N, 14.65.

EJEMPLO IX

9-β-D-arabinofuranosilhipoxantina-3',5'-cíclico fosfato.

A una suspensión enfriada en hielo de 9-β-D-arabinofuranosiladenina-3',5'-cíclico fosfato (preparado de acuerdo con el método descrito en la solicitud de EE.UU. de T. Khwaja y otros, expediente 135/47, monofosfatos cíclicos de nucleósidos, serie número 169.095, presentada el 4 de agosto de 1.971) (2,0 g., 0,0060 moles) en agua (15 ml.) conteniendo ácido acético glacial (3,0 ml) se añadió nitrito sódico (2,5 g., 0,036 moles). El matraz fue taponado de modo suelto y agitado durante 2-3 horas en un baño de hielo. Se dejó proseguir la reacción durante 20 horas. Después de evaporación y neutralización con bicarbonato de potasio, se trató de la

1 misma manera que se ha descrito en el ejemplo IV para produ-  
cir

1.80 g (89.7%), punto de fusión 240° (dec.). (a)<sub>D</sub><sup>25</sup> - 49.5°

(c 1.0, agua)

5 uv,  $\text{pH}_{\text{max}}^1$  247 nm ( $\epsilon$  12,100);  $\text{pH}_{\text{max}}^7$  247 nm ( $\epsilon$  12,400);  $\text{pH}_{\text{max}}^{11}$  251nm  
( $\epsilon$  13,000).

Anal. calcd por  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{H}_4\text{O}_7\text{P}$  (330.19); C, 36.40; H, 3.35; N 16.97

Hallado C. 36.35; H. 3.39; N. 16.87.

10 EJEMPLO X

9- $\beta$ -D-arabinofuranosiladenina-3'-fosfato.

Una mezcla de oxicloloruor de fósforo (1,5 g) y tri-  
metil fosfato recién destilado (20,0 ml.) se enfrió a 0-5° -  
en un baño de hielo. Se quitó el baño de hielo y se añadió -  
15 como finamente pulverizado 5'-O-benzoil-9- $\beta$ -D-arabinofurano-  
siladenina (1,5 g, 0,0040 moles, secada a 80° por la noche)  
(preparado de acuerdo con el método de H. Renis y otros, J.  
Med. Chem. 16, 754, (1.973)). La temperatura fue observada -  
entre 5-15°. Después de 30 minutos se obtuvo una solución cla-  
20 ra, incolora, que fue almacenada durante la noche a 4°. La -  
mezcla de reacción entonces fue vertida sobre agua de hielo  
(100 ml.) conteniendo 2,0 g. de bicarbonato sódico. Se aña-  
dió periódicamente bicarbonato sódico adicional hasta que el  
25 pH fue estable a 5-6, (alrededor de 1 hora). El trimetilfos-  
fato fue separado por extracción con éter (4 x 75 ml.). El -  
éter disuelto y el exceso de agua se eliminaron por evapora-  
ción al vacío, hasta que comenzaron a separarse sales. Se -  
añadió suficiente agua para conseguir la solución y el pH -  
fue comprobado (6-7) antes de colocar la solución sobre la -

1 parte superior de una columna de Dowex 1 x 2 (forma de forma  
to, malla 100-200, 60 ml). La columna fue lavada con agua -  
hasta que ya no estuvo presente en el eluyente ningún mate--  
rrial absorbente de ultra-violeta. La elución gradual (agua -  
5 a 0,5 M de ácido fórmico) y liofilización de las fracciones  
apropiadas produjo 0,4 g. (24,7% de una mezcla de 2'-fosfa--  
tos y 3'-fosfatos.

La mezcla arriba citada de fosfatos (350 mg) fue -  
disuelta en recién preparado metóxido sódico en metanol 0,01M  
10 (25 ml) y la solución se dejó reposar a temperatura ambiente  
durante la noche. La mezcla de reacción fue cuidadosamente -  
neutralizada con Dowex 50 x 8 (H<sup>+</sup>). La resina fue eliminada  
y el filtrado concentrado hasta alrededor de 5 ml. El mismo  
fue aplicado a una columna Dowex 1 x 2 (forma de formato, -  
15 40 ml.). La columna fue lavada con agua hasta que no estuvo  
presenta en el eluyente ningún material absorbente de rayos  
ultravioletas, Después de gradual elución (agua a 0,5 M de -  
ácido fórmico) salió primero 9-β-D-arabinofuranosiladenina--  
20 -2'-fosfato seguido del isómero 3'-fosfato. Las fracciones de  
3'-fosfato fueron liofilizadas para producir

105 mg (41%) de 9-β-D-arabinofuranosiladenina-3'-fosfato; -  
punto de fusión 180-182° (dec.); uv, pH 1 257 nm (ε 6,600);  
max  
pH 7 258 nm (ε 6,900); pH 11 258 nm (ε 6,900).  
max

25 Anal. calcd por C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>P (347.22): C, 34.58; H, 4.06; -  
N, 20.17.

Hallado;

EJEMPLO XI

30 9-β-D-arabinofuranosilhipoxantina-3'-fosfato.

1 A una solución refrigerada en hielo de 9- $\beta$ -D-arabi  
nofuranosiladenina-3'-fosfato (100 mg.) en agua (1,0 ml.) y  
ácido acético glacial (0,15 ml.) se añadió nitrito sódico -  
(1,5 mg.) El matraz fue taponado de modo suelto y agitado du  
5 rante la noche a 5°. Después de evaporización y neutralización  
con bicarbonato potásico, fue tratado de la misma manera des  
crita en el ejemplo IV para producir

80 mg. (80%); uv, PH 1 248 nm; PH 7 249 nm; PH 11 252 nm.  
max max max

10 Las sales de D-arabinofuranosil purina nucleótidos  
indicados arriba pueden ser formadas de la manera convencio-  
nal por reacción del ácido libre con una base, tal como -  
NaHCO<sub>3</sub>, para formar, por ejemplo, la sal disódica, La reac--  
ción con otras bases apropiadas produjo análogamente las sa-  
les de calcio, bario, potasio y amonio o amonio sustituido,  
15 como se observará fácilmente por los expertos en la materia.

EJEMPLO XII

Varios compuestos de este invento fueron ensayados  
para conocer su actividad en tubo de ensayo por el método de  
20 régimen de virus (VR) de Sidwell y otros, descrito en Applied  
Microbiology, 22: 797-801, (1971). El compuesto se disolvió  
en un medio de cultivo celular consistente en vitaminas, ami  
no ácidos, suero, amortiguador, penicilina, estreptomycin y  
tinte indicador en agua. El virus suspendido en el medio de  
25 cultivo celular fue añadido y una mono-capa establecida de -  
células Vero, BHK 21, HeLa KB o RK 13 y un volumen igual del  
compuesto fue añadido entonces en el plazo de 5 minutos. Las  
células tratadas infectadas fueron incubadas durante tres -  
días y el grado de efecto citopatogénico viral (CPE) sobre -

1 las células, fue graduado según el examen microscópico, Los  
controles para cada experimento incluyeron controles de cé-  
lulas (célula y medio de cultivo celular solamente). contro  
les de virus (células y virus y medio de cultivo celular) y  
5 controles de toxicidad (células y química y medios de culti  
vo celular).

De los virus empleados en los experimentos anti  
virales, el tipo de herpes 1 está implicado en labiales, -  
herpes keratitis y herpes encephalitis. El virus de herpes  
10 también está implicado en mononucleosis infecciosa, linfoma  
de Burkitt y carcinoma cervical. La Vaccinia es una forma -  
no virulenta de virus de varicela empleado para vacuna de -  
varicela, que ocasionalmente da por resultado efectos secun  
darios indeseados. El mixoma causa la muerte de los conejos  
15 domésticos y silvestres, yendo precedido de enfermedad res-  
piratoria y grave hinchazón. El pseudo rabies causa paráli-  
sis bulbar infecciosa, que es una enfermedad llamada "pica-  
zón de locura" en el ganado vacuno, ovino, de cerda, de pe-  
rros y visones.

20 Los resultados de los experimentos en tubos de en  
sayo se ilustran en la tabla I que sigue. El sistema de ré-  
gimen de virus (VR) de Sidwell y otros, descrito en Applied  
Microbiologi, arriba mencionado, fue usado para evaluar el  
25 grado de significado de la inhibición de CPE. En VR mayor que  
0,5 es indicativo de definitiva actividad anti-viral, mien-  
tras que un VR de menos de 0,5 indica ligera actividad anti  
viral.

30

- T A B L A - 1 -

ACTIVIDAD ANTIVIRAL 9-β-D-ARABINOFURANOSIL PURINA  
NUCLEOTIDOS EN SISTEMAS DE CULTIVO CELULAR

5	<u>NOMBRE DEL COMPUESTO</u>	TIPO 1 <u>VIRUS DE HER PES SIMPLEX</u>	TIPO 2 <u>VIRUS DE HER PES SIMPLEX</u>	<u>VIRUS DE VACCINIA</u>
	9-β-D-arabinofuranosil- hipoxantina-5'-fosfato*	0,4 - 0,9	0,5 - 0,1	1,0 - 1,1
	9-β-D-arabinofuranosil- hipoxantina-3',5'-cicli- co fosfato	0,7 - 1,1		0,7
10	9-β-D-arabinofuranosil- hipoxantina-5'-O-metil fosfato	0,4 - 0,7	0,0	0,4
	9-β-D-arabinofuranosil- N <sup>1</sup> -hidroxihipoxantina-5' -fosfato	0,2 - 0,7	0,0 - 0,6	0,1 - 0,4
15	9-β-D-arabinofuranosil- hipoxantina-3'-fosfato	1,0		

Los resultados muestran claramente que los compues-  
 tos arriba señalados exhiben significativa actividad en tubo  
 de ensayo contra algunos o todos los virus enumerados.

EJEMPLO XIII

20

El siguiente experimento fue realizado usando 9-β-D-  
 arabinofuranosilhipoxantina-5'-fosfato contra virus de herpes  
 en animales. En este experimento, el compuesto fue disuelto -  
 en salina y se inoculó intraperitonealmente 4 horas después -  
 de la inoculación de virus, continuando dos veces al día des-  
 pués de ello durante 8 días. Los resultados en la tabla II de  
 25 muestran que ara-A fue menos eficaz y que el tratamiento de -  
 ara-IMP evitó que muriera hasta el 50% de los ratones.

\*. Este compuesto tuvo una actividad de 1,0 contra mixoma y -  
 0,2 contra pseudo rabies.

- T A B L A - II -

ACTIVIDAD ANTI-HERPES ENCEPHALITIS DE 9-β-D-ARABINOFU  
RANOSIL-HIPOXANTINA-5'-FOSFATO.

Huesped: 18-20 g. ratones suizos Ruta de droga: Intraperitoneal.  
 machos. Comienzo de tratamiento: 4  
 5 Virus: Herpes simplex, zepa 123 horas después del virus.  
 Dosis de virus y ruta: 3,2 LD<sub>50</sub> Frecuencia y duración del -  
 intracerebral. tratamiento: dos veces al -  
 día durante 8 días después  
 Periodo de observación: 21 días. del virus.

NOMBRE	DOSIS mg/kg/día	SUPERVI-- VIENTES - TOTAL (CON TROLES DE TOXICIDAD	AUMENTO DE	INCRE--
			TANTO POR CIENTO DEL NUMERO DE SUPERVI- - VIENTES	MENTO - DE SU-- PERVI-- VIENTES p x
9-β-D-arabinofura	500	5/5	50	0,01
nosil-hipoxantina	250	-	40	0,05
5'-fosfato	125	-	20	0,3
	62,5	-	10	0,3
9-β-D-arabinofura	250	5/5	40	0,05
nosiladenina	125	-	30	0,05
	62,5	-	0	0,03

x. Valor de probabilidad (análisis de chi cuadrado).

EJEMPLO XIV

20 Se ensayó el efecto de 9-β-D-arabinofuranosilhipo-  
 xantina-5'-fosfato (ara-IMP) y 9-β-D-arabinofuranosiladenina  
 (ara-A) sobre herpes encephalitis de ratones. En estos expe-  
 rimentos fueron inoculados intracerebralmente ratones suizos  
 25 adultos jóvenes con una dosis moderadamente letal (capaz de ma-  
 tar 90-95% de los animales) del tipo 1 de virus de herpes. -  
 6 horas más tarde los animales fueron inyectados intracere-  
 bralmente con una o varias concentraciones de cada droga en  
 solución salina o con salina solamente (controles de virus).

1 La dosis más elevada, usada de cada droga fue la dosis máxi-  
ma tolerada (MTD), es decir la dosis más alta, que no sea le-  
talmente tóxica, para los animales. Los animales entonces fue-  
ron observados durante 21 días y se registraron las muertes  
5 según fueron ocurriendo. En cada experimento el producto ara-  
-IMP fue más eficaz que ara-A, cuando el tanto por ciento de  
incremento en supervivientes (comparado con los supervivien-  
tes del control de virus) se inscribió contra la dosis rela-  
tiva MTD de cada droga. Se efectuaron hasta 5 experimentos -  
10 con las varias dosis relativas de droga y se determinó el -  
promedio de tanto por ciento de incremento de supervivientes  
Los datos se resumen en la fig. 1 ilustrando que ara-IMP tie-  
ne una ventaja terapéutica sobre ara-A. Esta figura muestra  
15 el efecto de tratamiento intracerebral, con 9-β-D-arabinofu-  
ranosilhipoxantina-5'-fosfato (ara-IMP) y 9-β-D-arabinofurano-  
siladenina (ara-A) en el tipo 1 de virus de herpes, que indu-  
ce mortandad por encefalitis en ratones (resumen de 3-5 expe-  
rimentos para cada punto ilustrado. En ella A significa el -  
20 incremento de superviviente y B la dosificación relativa de  
droga.

EJEMPLO XV

En este experimento el compuesto fue evaluado con-  
tra Herpes keratitis en conejos. Ambos ojos de conejos de -  
25 Nueva Zelanda, blancos, fueron anestesiados con 0,5% de propa-  
racaina HCl y el epitelio corneal entonces fue raspado uni-  
formemente. Una suspensión de virus de herpes simplex del ti-  
po 1, se agregó a cada ojo en suficiente cantidad para cau-  
sar que se desarrollase una keratitis uniforme en el plazo -  
30

1 de tres días. Cuatro animales fueron tratados tópicamente -  
(una gota por ojo) con ara-IMP o con ara-A (0,2 ó 0,02 M de  
o solamente PVA  
cada uno) en 1,4% de polivinil alcohol (PVA) en el caso de -  
controles de virus. El tratamiento fue horario desde las 8 -  
5 de la mañana a las 7 de la tarde, aplicándose cada droga en  
ungüento oftálmico Lacrilube a las 8 de la mañana diariamen-  
te durante 7 días, comenzando 24 horas después de la inocula-  
ción de virus. Los ojos fueron examinados en los días 2, 4, 6 y  
9 para observar opacidad corneal, tamaño de la lesión y tipo  
10 de la misma, enrojecimiento, hinchazón y descarga. Se dió pa-  
ra cada uno una puntuación de 0 (sin infectar) hasta 4 (máxi-  
ma infección). La persona que examinaba los ojos, no sabía,  
que ojos habían sido tratados con droga o eran el control. -  
15 La opacidad y lesión en sus puntuaciones se multiplicaron -  
por 10 y las otras puntuaciones de los parámetros se multi-  
plicaron por 2, después se sumaron para obtener "una puntua-  
ción de lesión promediada en peso" que se inscribió contra -  
el día de infección. Esta exposición gráfica del efecto de -  
20 cada droga se observa en la fig. 2. Ara-IMP en cualquier con-  
centración empleada fue más eficaz que ara-A para inhibir el  
desarrollo de la enfermedad. La figura 2 muestra el efecto -  
del tratamiento óptico con 9-β-D-arabinofuranosilhipoxantina  
-5'-fosfato (ara-IMP) y 9-β-D-arabinofuranosiladenina (ara-A)  
25 sobre keratitis inducida por virus de herpes del tipo 1 en -  
ojos de conejos. En dicha figura C significa los días de ino-  
culación post-virus y D la puntuación de lesión promediada en  
peso.

1

EJEMPLO XVI

Se ensayó el efecto de ara-IMP y ara-A en la mortan-  
dad de hepatitis inducida por virus del aborto equino en hams-  
ters. Hamsters adultos jóvenes fueron inoculados intraperito-  
nealmente con 95% de dosis letal de virus de aborto equino. -  
Cada droga, disuelta o suspendida en solución salina, o sola-  
mente solución salina para controles de virus, se administró  
intraperitonealmente a los animales dos veces al día durante  
4 días, comenzando una hora antes de la inoculación del virus  
Los animales fueron observados durante 21 días y las muertes  
se registraron según iban ocurriendo. En cada experimento, -  
ara-IMP demostró ser más eficaz y menos tóxico que ara-A, man-  
teniendo hasta 100% de los animales infectados vivos durante  
el estudio. Los resultados se resumen en la tabla III.

5

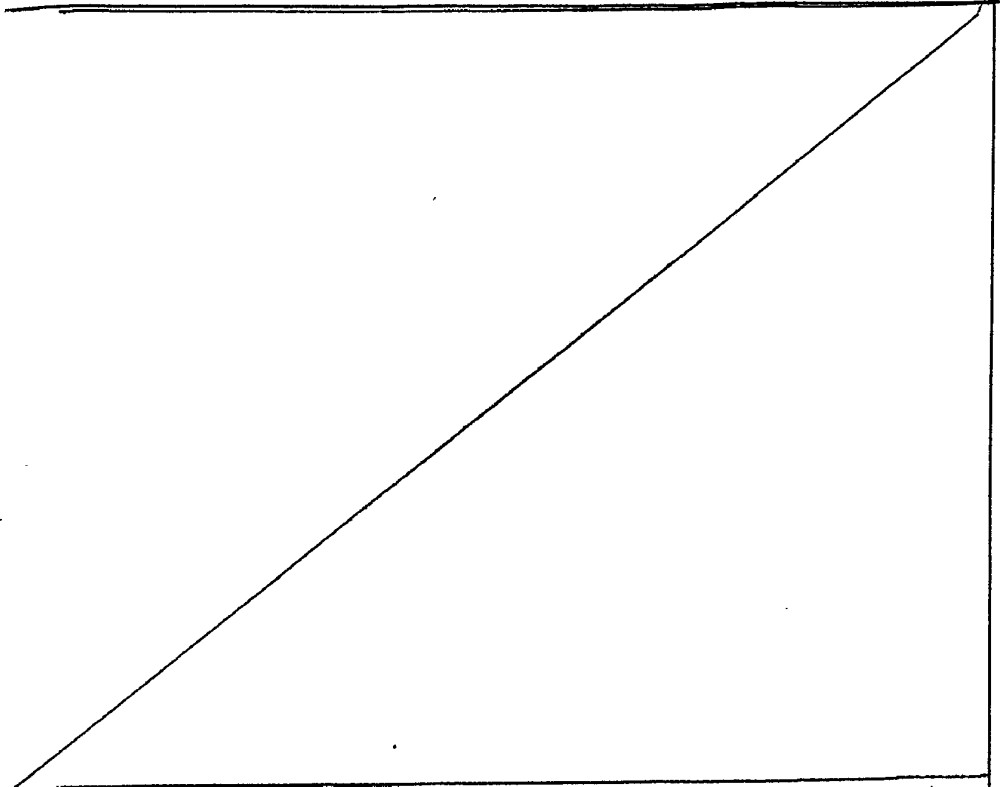
10

15

20

25

30



30 25 20 15 10 5 1

- T A B L A - III -

Efecto de 9-β-D-arabinofuranosilhipoxantina-5'-fosfato (ara-IMP) y 9-β-D-arabinofuranosiladenina ara-A) sobre morbilidad asociada con hepatitis en Hamsters infectados con virus de aborto equino.

Huesped: Hamsters dorados sirios hembras,  
 45-55 g.  
 Dosis de virus: 10 LD<sub>50</sub> (10<sup>6</sup>,8)  
 Ruta de inoculación de virus i.p.

Ruta de tratamiento: i.p.  
 Programa de tratamiento: dos veces al día durante 4 días, comenzando 1 hora antes de la inoculación con virus.

Periodo de observación: 21 días.

Exp. N°	TRATAMIENTO	CONTROL DE TOXICIDAD SUPERV./TOTAL	INFECTADOS TRATADO SUPERV./TOTAL	INCREMENTOS SUPERVIVIENTES, a P	INFECTADOS, TRATADOS PROMEDIO DE TIEMPO b SUPERVIVENCIA (días)	PROMEDIO DE INCREMENTO DE SUPERVIVENCIA, c P
1	Ara-IMP, 250 mg/kg/día	3/3	10/10	< 0.001	> 21	< 0.001
	Ara-IMP, 125 mg/kg/día	3/3	10/10	< 0.001	> 21	< 0.001
	Ara-A, 250 mg/kg/día	2/3	0/8	-	9.2	< 0.001
	Ara-A, 125 mg/kg/día	2/2	8/9	< 0.001	13	- <sup>d</sup>
	Virus control (tratamiento to salino)		2/20		4.1	
2	Ara-IMP, 250 mg/kg/día	3/3	10/10	< 0.001	> 21	< 0.001
	Ara-IMP, 62.5 mg/kg/día	-	9/10	< 0.001	8	- <sup>d</sup>
	Ara-A, 250 mg/kg/día	2/3	3/10	< 0.09	12	< 0.001

30 25 20 15 10 5 1

(continuación Tabla III)

Exp. N°	TRATAMIENTO	CONTROL DE TOXICIDAD - SUPERV./TOTAL	INFECTADOS TRATADO SUPERV./TOTAL	INCREMENTOS SUPERVIVIENTES a P	INFECTADOS TRATADOS - PROMEDIO DE TIEMPOb SUPERVIVENCIA (días)	PROMEDIO DE INCREMENTO DE SUPERVIVENCIA c P
	Are-A, 62.5 mg/kg/día	-	10/10	<0.001	>21	<0.001
	Virus control (tratamiento salino)	-	1/20		3.6	

ap = Probabilidad (ensayo exacto de Fisher)  
 b = Animales que murieron en o antes del 81 día  
 cp = Probabilidad (ensayo t)  
 d = Murieron insuficiente animales para análisis estadístico exacto.

N O T A

La presente Patente de Invención, comprende las siguientes reivindicaciones:

1.- Procedimiento para prepara derivados de 9- $\beta$ -D-arabino furanosil nucleótidos, caracterizado porque para la obtención de la adenina se siguen las etapas de hacer reaccionar un correspondiente 9- $\beta$ -D-furanosil nucleósido con un compuesto de osicloruro de fósforo en presencia de un disolvente de trialquilfosfato durante alrededor de tres horas hasta alrededor de 24 horas a temperaturas desde alrededor de 0 $^{\circ}$  C hasta alrededor de 15 $^{\circ}$  C para formar un correspondiente arabinofuranosiladenina nucleótido; y recuperar el producto.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de recuperación incluye las fases de tratar el nucleótido con un carbonato alcalino a un pH desde alrededor de 5 hasta alrededor de 7 y separar el producto por cromatografía y liofilización.

3.- Procedimiento según las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque para la obtención de la hipoxantina se siguen las etapas de: hacer reaccionar un correspondiente 9- $\beta$ -D-arabinofuranosiladenina nucleótido con un ácido acético glacial y nitrito sódico en presencia de agua desde alrededor de 15 horas hasta alrededor de 24 horas a temperaturas desde alrededor de 10 $^{\circ}$  C hasta alrededor de 30 $^{\circ}$  C para formar un correspondiente producto de arabinofuranosilhipoxantina nucleótido; y recuperar dicho producto de nucleótido.

4.- Procedimiento según la reivindicación 3, carac-

1 terizado porque dicha etapa de recuperación incluye las fases  
de tratar el producto de nucleótido con un carbonato alcalino  
y cristalizar el producto de nucleótido.

5 5.- Procedimiento según las reivindicaciones prece-  
dentes, caracterizado porque para la obtención del hipoxanti-  
na-5'-fosfato se siguen las etapas de: hacer reaccionar 9- $\beta$ -D-  
arabinofuranosiladenina-5'-fosfato con ácido acético glacial  
y nitrito de sodio, en presencia de agua desde alrededor de  
10 alrededor de 10°C hasta alrededor de 30°C para formar dicho 5'-  
fosfato de hipoxantina como un producto y recuperar dicho pro-  
ducto tratándole con un carbonato alcalino y después crista-  
lizándole.

15 6.- "Procedimiento para la preparación de deriva-  
dos de 9- $\beta$ -D-arabino furanosil nucleótidos".

Según se describe y reivindica en la presente memo-  
ria descriptiva la cual consta de veintiseis hojas foliadas y  
escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 20 MAR. 1974

20   
Fdo.: Pedro Matamorán

25

30

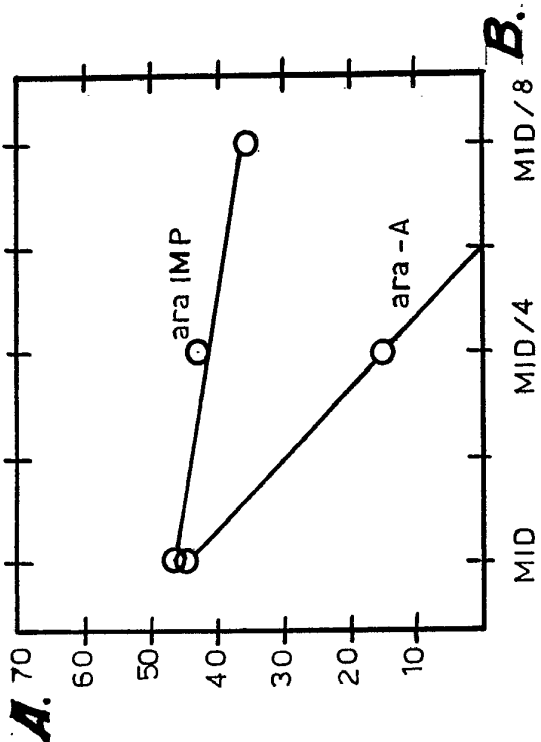


Fig. 1.

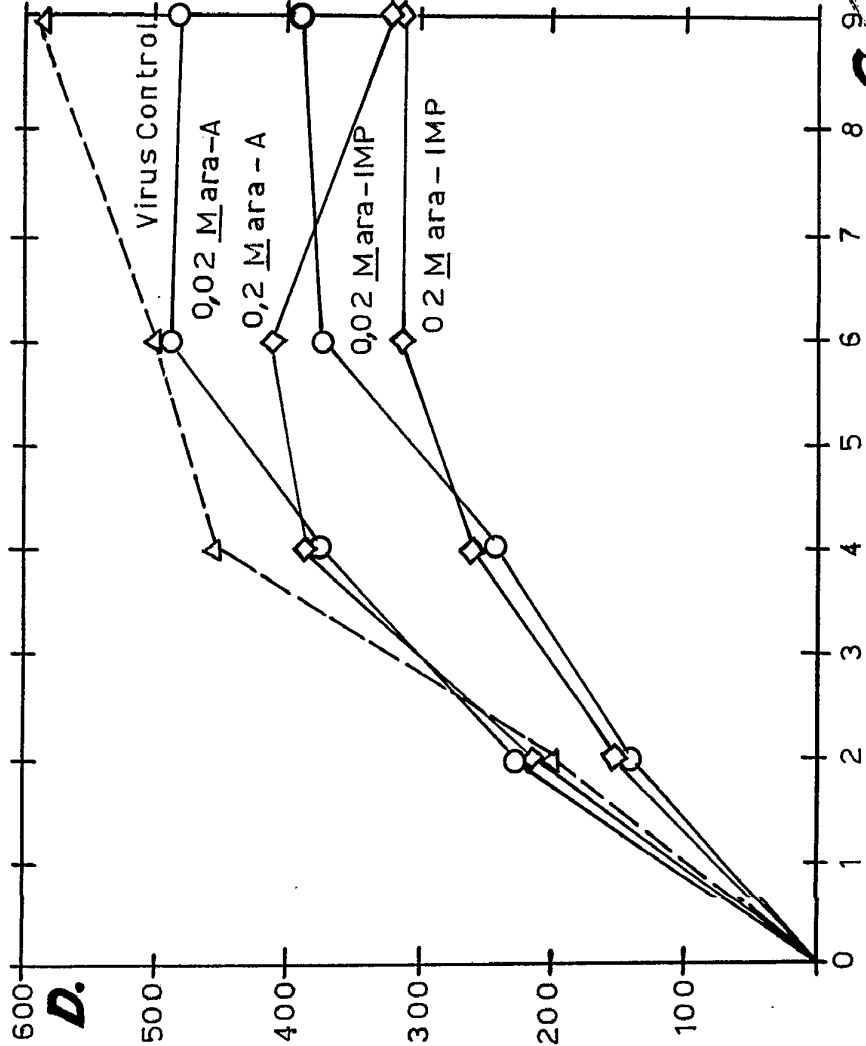
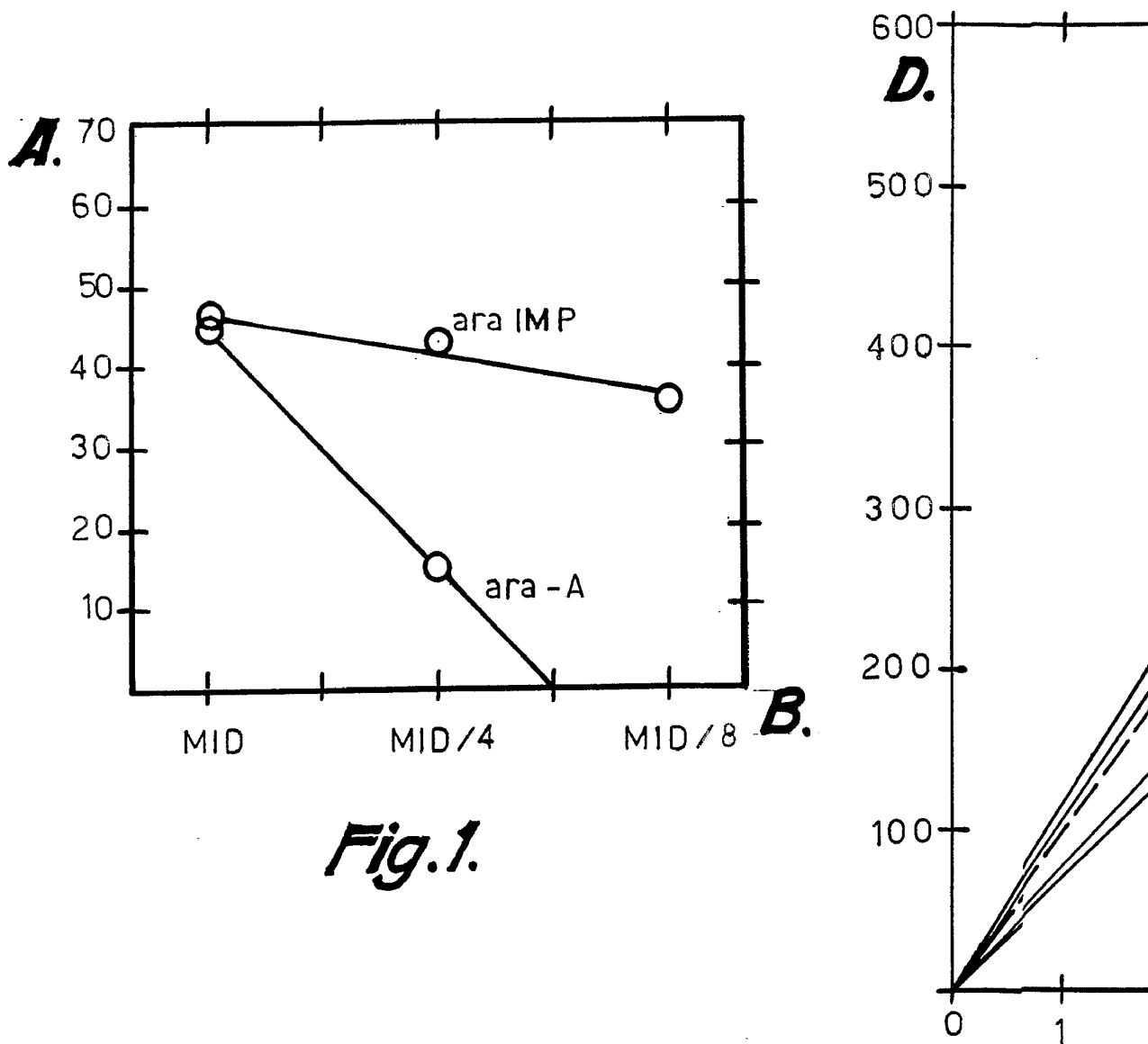


Fig. 2.

ESCOLA NACIONAL  
 CARLOS ROBB  
 P.F.



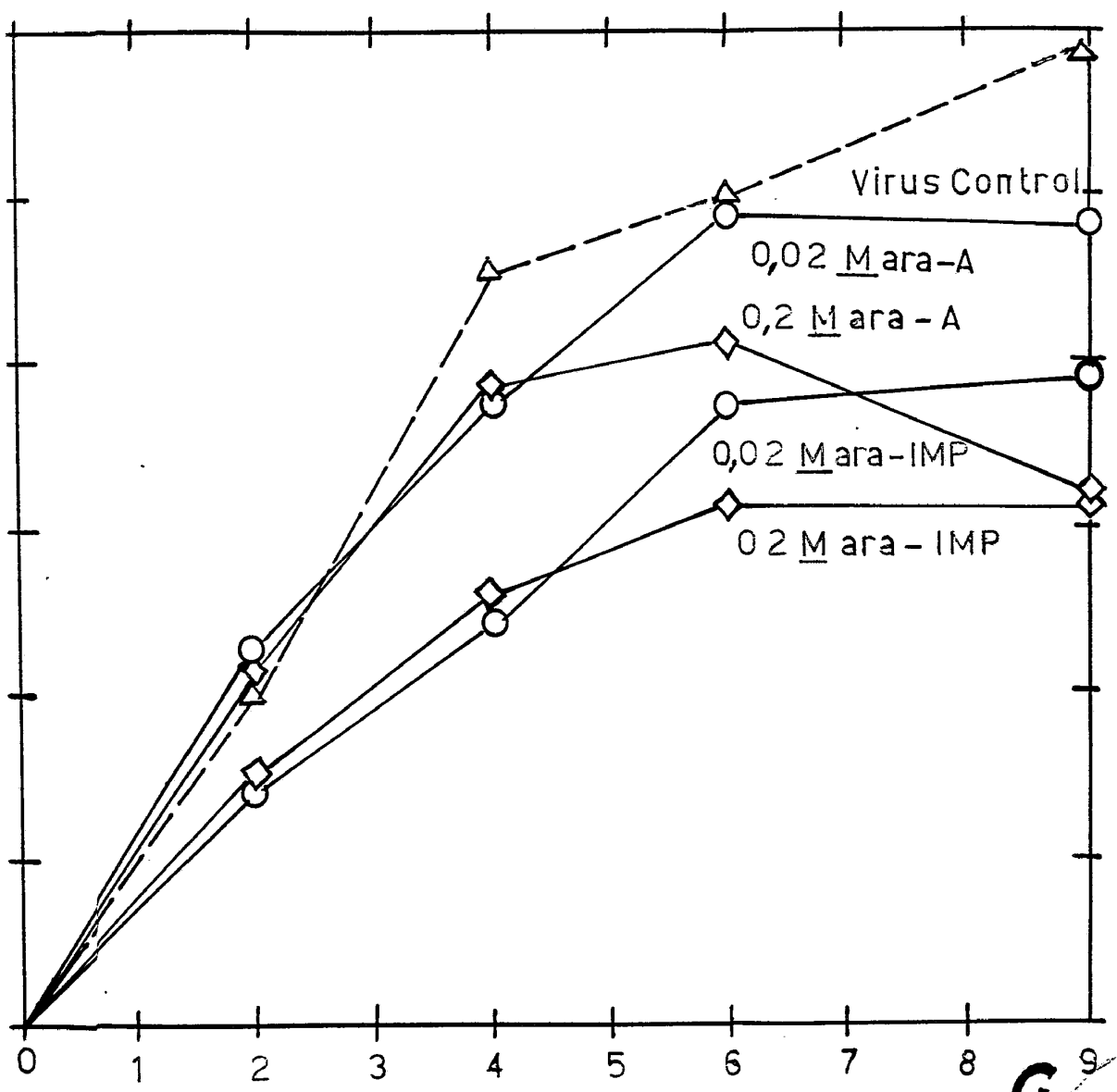


Fig. 2.

C.

ESTADO VENEZOLANO  
CARLOS ROEB  
P.R.