

4 5689
435689



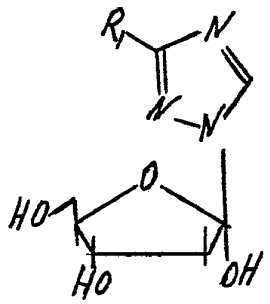
memoria descriptiva

COFD/AGIK

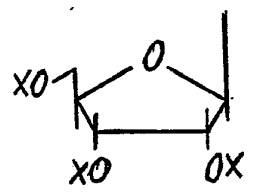
CLASE DE REGISTRO	Un Certificado de Adición.
NOMBRE Y NACIONALIDAD DEL SOLICITANTE	ICN PHARMACEUTICALS, INC. - sociedad de EE.UU. -
RESIDENCIA Y DOMICILIO	IRVINE, California (EE.UU.) 2727 Campus Drive.
<input type="checkbox"/> OBJETO	"Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal 403.142 por "Procedimiento para la preparación de 1,2,4-triazol nucleósidos".
INVENTORES	Joseph Theodore WITKOWSKI y Roland Kenith ROBINS, ambos de EE.UU.
PRIORIDAD	Solicitud patente EE.UU. Nº 452.065 del 18 de marzo de 1974.

1
5
10
15
20
25
30

En anteriores patente de EE.UU. de la misma titular se describen y reivindican procedimientos para la obtención de compuestos de la estructura



en que R₁ es carboxamido, tiocarboxamido o carboxamidino y sus sales de adición de ácido fisiológicamente aceptables, así como sus 5'-fosfatos y 3',5'-cíclicos fosfatos y compuestos, en que de otro modo hidroxilos libres de glicosilo llevan grupos acilo de C₁-C₁₈. Los compuestos se exponen en aquella patente poseyendo potente actividad antiviral. En una ejecución del presente invento, se procuran compuestos análogos, teniendo el mismo aglicon cuya mitad glicosídica es de la estructura



en que por lo menos una X es acilo de C₁-C₁₈ y por lo menos una X es hidrógeno. De acuerdo con otra ejecución de este invento se procuran nucleótidos análogos, por ejemplo, fosfatos 2',3'-cíclicos y 2'- y 3'- fosfatos mixtos de nucleósidos de la estructura (a). Compuestos preparados de acuerdo con este



1 invento exhiben significativa actividad antiviral en ensayos
en vivo sobre animales, y pueden administrarse generalmente
como en la solicitud pendiente de EE.UU. serie nº 340.332 -
presentada el 12 de marzo de 1.973 cuya exposición se incor-
5 pora aquí como referencia.

Los compuestos preferidos de 5'-Q-acilo se preparan
por una variedad de métodos elegidos de acuerdo con el grupo
acilo particular deseado. En general, (métodos 1-3, infra) -
síntesis de compuestos 5'-Q-acilo comprenden bloqueo de iso-
10 propileno de posiciones 2'- y 3'- acilación en la posición -
5'- y de isopropilidénación. Los métodos conocidos compren-
den reacción de acilación en medio disolvente (por ejemplo,
piridina) y se emplean para los grupos acilo de más alto pe-
so molecular. En el método 1 se emplean reactantes de anhí-
15 drido, mientras que el método 2 servirá donde sean obteni- -
bles más fácilmente haluros de acilo. Grupos acilo de peso -
molecular inferior cuyos anhídridos correspondientes están en
estado líquido a temperaturas normales, se unen al método 3,
empleando como catalizador 4-alquilaminopiridina. Un cuarto
20 método de elección, particularmente para la preparación de -
compuestos 5-Q-benzoilo comprende deacilación selectiva.

Los siguientes ejemplos 1-5 ilustran 5'-Q-acila- -
ción de la preferida 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-
25 carboxamida. Esencialmente pueden emplearse los mismos proce-
dimientos para formar los correspondientes 3-tiocarboxamida
y 3-carboxamidas, con los cambios correspondientes.

En cada uno de los siguientes ejemplos (1-3) de -
ejecuciones preferidas del invento, el material de partida -
30 1-(2,3-Q-isopropilideno- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-



1 carboxamida se preparó como sigue:

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

1- (β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida (30,0 g, -
5 123 moles) fue suspendida en una mezcla de acetona (400 ml.)
y 2,2-dimetoxi-propano (200 ml.). La mezcla fue enfriada en -
baño de hielo y se añadió 70% de ácido perclórico (6 ml.). La
mezcla fue mantenida a temperatura ambiente durante 3 horas -
y a 5° durante la noche. La solución naranja resultante fue -
10 neutralizada con hidróxido de potasio 2N, filtrada y evapora-
da a sequedad. El residuo sólido fue tratado con metanol y el
producto insoluble fue separado por filtración. La solución -
metanólica fue concentrada a un pequeño volumen y se recogio
15 el producto cristalino. La recrystalización de una mezcla de
etil-acetato y metanol, dió 1-(2,3-O-isopropilideno- β -D-ribo-
furanosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida (31,0 gramos, 90% con
punto de fusión 153-154°.

Analisis calculado para $C_{11}H_{16}N_4O_5$:

C, 46,47; H, 5,67; N, 19,71

20 Hallado C, 46,38; H, 5,73; N, 19,50

Dependiendo del derivado particular de 5-O-acilo en
preparación se empleo uno o varios de los siguientes métodos.

Método 1.

25 Una mezcla de 1-(2,3-O-isopropilideno- β -D-ribofura-
nosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida, piridina anhidra y el -
apropiado anhídrido de acilo se agitó a 60° hasta que la reac-
ción se hizo completa, como se demostró por cromatografía de
capa fina (24-72 horas). Se añadió agua a la mezcla después -
30



1 de estar completa la reacción, y el producto se recogió, por
filtración o evaporación y extracción. La 1-(5-O-acilo-2,3-O
-isopropilideno- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida
intermedia se convirtió en la 1-(5-O-acil- β -D-ribofurano-
5 sil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida por tratamiento con ácido acuoso. Una mezcla del producto intermedio de isopropilideno se calentó a 100° con una mezcla de 4:1 (volumen/volumen) de ácido acético y agua hasta que se completó la reacción, como se demostró por cromatografía de capa fina (2-5 horas). El disolvente se separó por evaporación y se obtuvo por cristalización el producto de 5-O-acilo.

Alternativamente el grupo de isopropilideno puede ser separado del derivado intermedio de 5'-O-acil-2',3'-O-isopropilideno por tratamiento con mezcla de 9:1 (volumen/volumen) de ácido trifluoroacético y agua a temperatura ambiente durante 5 minutos. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el producto de 5'-O-acilo se purificó por cristalización.

20 Método 2.

Una mezcla de 1-(3-O-isopropilideno- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida y piridina anhidra se enfrió en un baño de hielo y el apropiado haluro de acilo se añadió lentamente con agitación. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente hasta que se completó la reacción como se demostró por cromatografía de capa fina (2-24 horas). Se añadió agua a la mezcla y el producto se obtuvo por filtración o evaporación y extracción. El producto intermedio de 1-(5-O-acil-2,3-O-isopropilideno- β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida se convierte en la 1-(5-O-acil- β



1 D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida como en el método 1.

Método 3.

5 Una mezcla de 1-(2,3-O-isopropilideno -β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida y un exceso del apropiado anhídrido de ácido conteniendo una cantidad catalítica (aproximadamente 100 mg.) de 4-dimetilaminopiridina se agitó a temperatura ambiente hasta que la reacción se completó como se demostró por cromatografía de capa fina (16-24) horas).
10 La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el producto se aisló y convirtió en la 1-(5-O-acil-β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida como en el método 1. Alternativamente, el producto crudo de 5'-O-acil-2'-3'-O-isopropilideno, obtenido por evaporación puede convertirse directamente sin purificación en la 1-(5-O-acil-β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida por los procedimientos de isopropilidénación, dados en el método 1.

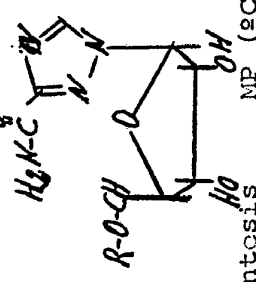
Método 4.

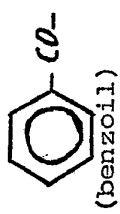
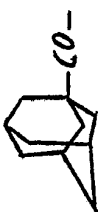
20 Una mezcla de 1-(2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-ácido carboxílico metil éster y metanol saturado a 0° con amoníaco anhidro se agitó a 0° durante 4 horas. La solución resultante fue evaporada a sequedad a presión reducida y el producto fue cristalizado desde etano acuoso para dar 1-(5-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida con punto de fusión de 182-184°.

25 Los métodos particulares empleados al preparar los compuestos del ejemplo 1-5 aparecen en la tabla I que informa sobre algunas de sus propiedades.

- T A B L A - 1 -

Propiedades de 1-(5-O-Acilo-β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida



Ejemplo	R	Sintesis	MP (°C)	Fórmula Empírica	Calcd	Analisis	Hallado
1	CH ₃ CO- (acetil)	3	129-190.5	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O ₆	C 41.96 H 4.93 N 19.58	42.13 4.97 19.63	
"2	CH ₃ (CH ₂) ₂ CO- (butiril)	3	155.5-157	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ O ₆	C 45.85 H 5.77 N 17.83	46.08 5.80 17.73	
3	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO- (Palmitoil)	1	159-163	C ₂₄ H ₄₂ N ₄ O ₆	C 59.73 H 8.77 N 11.61	59.81 8.80 11.63	
4	 (benzoiil)	2, 4	182-184	C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₆	C 51.72 H 4.63 N 16.09	51.91 4.57 16.19	
5	 (camfor)	2	amorfo	C ₁₉ H ₂₆ N ₄ O ₆	C 56.14 H 6.44 N 13.78	55.96 6.51 13.83	

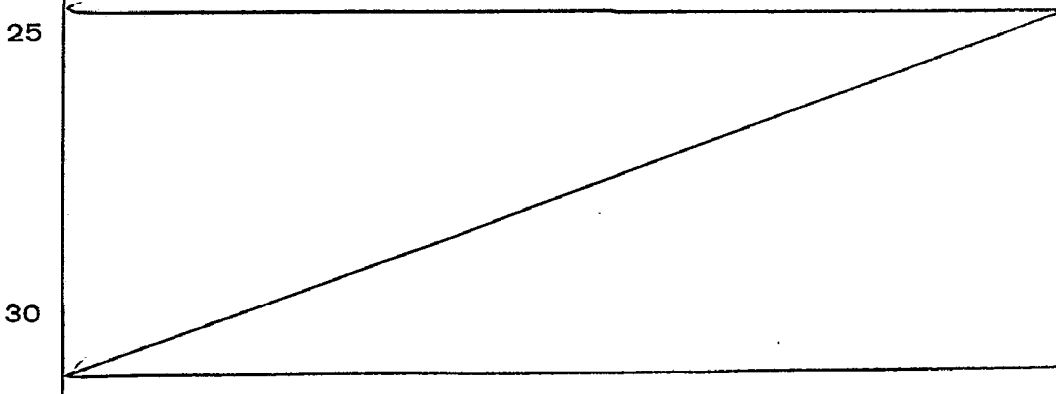




1 Naturalmente que pueden asegurarse de otro modo com
puestos dentro del alcance del presente invento. Por ejemplo,
pueden conseguirse análogos de 5'-O-acilo por vía de acila-
ción selectiva como puede ser, por ejemplo, 2'-O-acilo, 3'-O-
5 acilo y análogos diO-acilo, con consiguiente separación de
vía de cromatografía de columna. Véase por ejemplo, C.A.
- Decker y L. Goodman, The Carbohydrates volumen 2A, P.26 (se-
gunda edición 1970) Academic Press, N.Y.

EJEMPLO 6.

10 Varios de los compuestos preparados en los ejemplos
precedentes fueron ensayados para actividad en vivo contra
influenza A₂ (Japón 305) de muertes inducidas en ratones ma-
chos suizos (19-20 gm) y los resultados se compararon con
- aquellos obtenidos con 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-
15 carboxamida. Los ratones fueron inoculados intranasalmente
con virus y se trataron con el compuesto bajo ensayo por admi-
nistración oral tres veces al día durante 8 días, comenzando
8 horas antes y 4 horas después de la inoculación del virus.
La dosificación de virus fue de 3,2 LD₅₀. Los ratones infecta-
20 dos fueron observados durante 21 días. Los resultados de las
pruebas se presentan en la tabla I. Todos los compuestos ensa-
yados fueron oralmente no tóxicos en las dosificaciones ensa-
yadas.



30

25

20

15

10

5

1

- T A B L A - I -

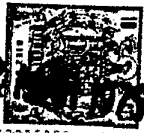
Efectos de Compuestos sobre Influenza A₂ (Japón 305)

Compuesto de Ejemplo	Dosis de Droga mg/kg/día	Muerres Inducidas en Ratones			Tiempo medio de supervivencia aumento p
		Supervivientes Infectados Total	Aumento Super vivientes p	Supervivencia media Tiempo (días)	
--	0	1/20		7.1	
+	75	1/10	0.46	8.0	<0.05
	37.5	0/10	0.67	7.3	>0.5
3	300	0/10	0.67	8.5	<0.05
	150	1/10	0.46	8.6	<0.01
	75	1/10	0.46	8.2	<0.01
	37.5	0/10	0.67	7.6	<0.5
1	300	1/10	0.46	8.9	<0.01
	150	1/10	0.46	8.6	<0.01
	75	1/10	0.46	6.7	-
	37.5	0/10	0.67	7.3	>0.5
2	300	5/10	0.0085	9.6	<0.001
	150	1/9	0.44	7.9	<0.1
	75	0/10	0.67	8.0	<0.05
	37.5	0/10	0.67	7.2	>0.5

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

ap = Probabilidad (Test de Fischer de Probabilidad Exacta)

b Animales que murieron antes del día 21

c_p = Probabilidad (Test t)

- 8 -

17 MAR



1

El compuesto del ejemplo 4 fue similarmente ensaya-
do, salvo que los ratones fueron ratones machos suizos de 17-
18 gr., la dosis de virus fue de 3,2 LD₅₀ y la droga fue pri-
meramente administrada 5 minutos antes de la inoculación del
virus.

5

Los resultados aparecen en la tabla II.

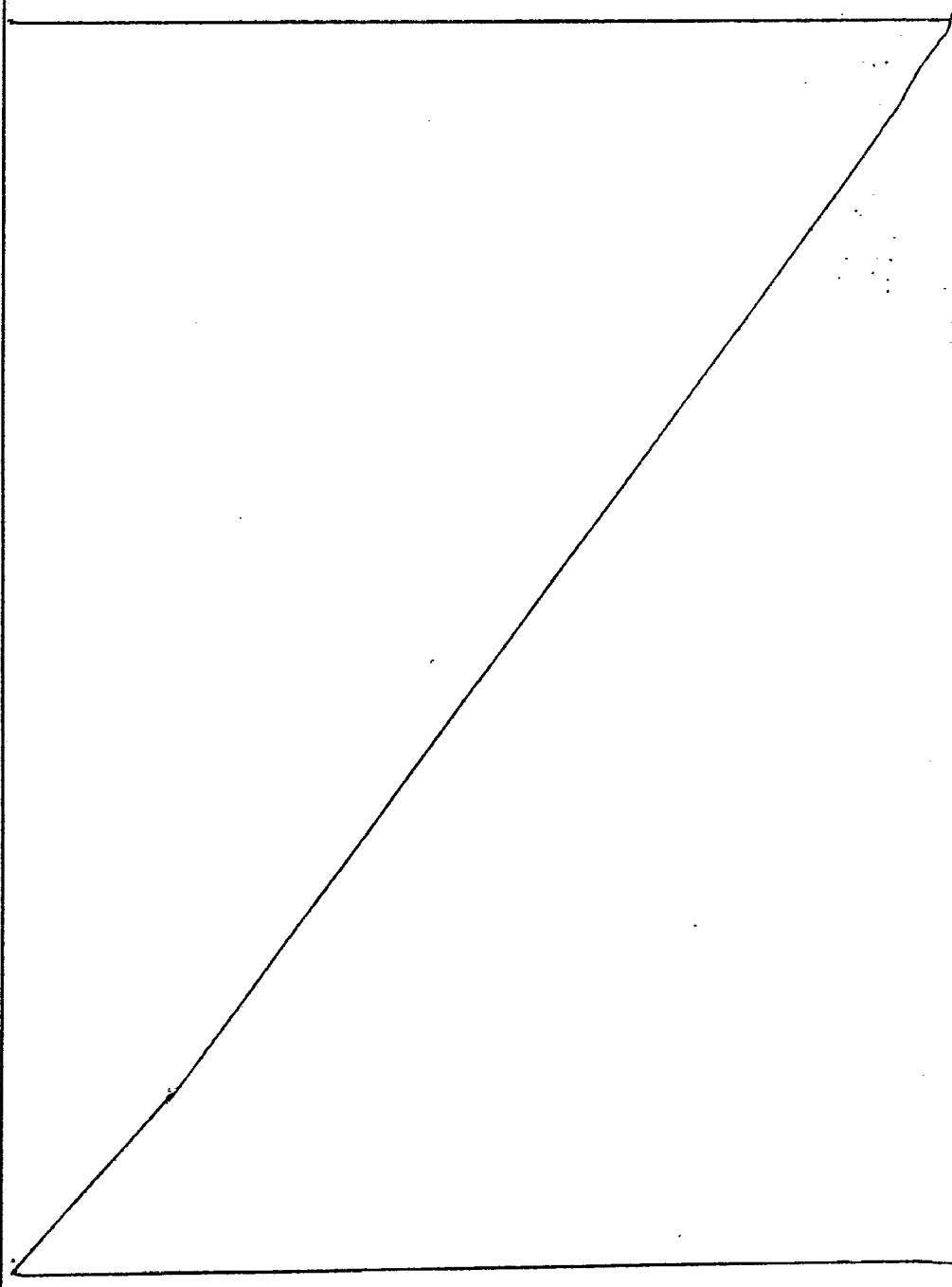
10

15

20

25

30



30 25 20 15 10 5 1

- T A B L A - II -

Efectos de Compuestos sobre Influenza A₂ (Japón 305) Muertes Inducidas sobre Ratones

Compuesto de Ejemplo	Dosis de Droga mg/kg/día	Supervivientes Infectados Total	Incremento superviviente - p	Tiempo medio de supervivencia (días)	Incremento medio de tiempo de supervivencia p
+	75 37.5	6/10 5/10	<0.05 <0.1	16.5 19.1	<0.01 <0.2
4	300 150 75 --	8/10 5/10 3/10 4/20	<0.01 <0.1 >0.3	18.8 16.2 12.5 11.8	<0.001 <0.01 >0.3

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

a_p = Probabilidad (análisis chi cuadrado)

b Animales supervivientes fueron considerados como muertos el día 21

c_p = Probabilidad (ensayo t)

17





1 Los 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-R₁ fosfa
tos 2'-3'-cíclicos del invento se prepararon por una adapta-
ción del procedimiento de T. Ueda e I. Kawai, Chem. Pharm. -
Bull. (Japón) 18, 2303 (1970) en que el correspondiente nu-
5 cleósido se hace refluir en dimetilformamida con la sal de -
tri-n-butil amina de ácido pirofosfórico. El producto se pu-
rificó por cromatografía de intercambio de iones de celulosa.
Los fosfatos 5'-O-acilo 2'-3'-cíclicos pueden prepararse si-
milarmenete comenzando con los 5'-O-acilados nucleósidos.

10 Se aseguran fosfatos mixtos (2',3') por división -
de los correspondientes fosfatos cíclicos, por ejemplo, con
ácido diluido. Si se desea, hidroxilos de glicocilo, libres
de otro modo de la mezcla resultante, pueden ser acilados y
separados O-acil 2'- y 3'- fosfatos pueden separarse uno de
15 otro.

EJEMPLO 7

Preparación de 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxami-
da 2',3'-fosfato cíclico.

20 Una solución de 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-
-carboxamida (1,22 g, 5,0 mmole) ácido pirofosfórico (10,0 -
mmoles) y tri-n-butyl-amina (40,0 mmoles) en dimetilformamida
(100 ml) se hizo refluir durante 2,5 horas. El disolvente -
fue separado en vacío y el residuo fue disuelto en hidróxido
25 amónico 1N (100 ml). La solución fue extraída con éter y la
fase acuosa fue concentrada a un pequeño volumen. La solución
fue diluida con agua a 60 ml. y el pH fue ajustado a 8,5 con
hidróxido amónico. Esta solución fue aplicada a DE 52 celuo-
sa (130 g) en columna en la forma de bicarbonato. La emul-
30 sión se hizo con un gradiente lineal de agua (1.000 ml.) a -



1 0,05 M bicarbonato de trietilamina (1.000 ml.) y se recogie-
ron fracciones de 20 ml. El producto estuvo contenido en frac-
ciones 35-50 que fueron combinadas y evaporadas a sequedad.
El residuo fue disuelto en agua (20 ml.) y se hizo pasar a -
5 través de una columna de Dowex 50 x 8 (20 ml.) en la forma de
amonio. La columna fue eludida con agua y la solución contien
do el producto fue evaporada a sequedad. El residuo fue disuel
to en metanol y una pequeña cantidad de impureza fue separa-
da por filtración. El filtrado fue evaporado a sequedad y el
10 residuo fue disuelto en agua. La solución fue liofilizada pa
ra procurar la sal de amonio del fosfato 2'-, 3'-cíclico.

Análisis. Calculado para $C_8H_{14}N_5O_7P.H_2O$:
C, 27,93; H, 4,58; N, 21,13.
Hallado: C, 28,26; H, 4,73; N, 20,53

15 Sales de metal de álcali o el fosfato 2',3'-cíclico
libre pueden obtenerse de la sal de amonio por intercambio -
de iones.

Después de breve tratamiento con ácido diluido el
fosfato 2',3'-cíclico fue convertido al 2'(3')-fosfato como
20 se ilustra por cromatografía de capa fina sobre gel de sílice
con 7:3 (volumen/volumen) de acetronitrilo: 0,1 N cloruro
acuoso de amonio.

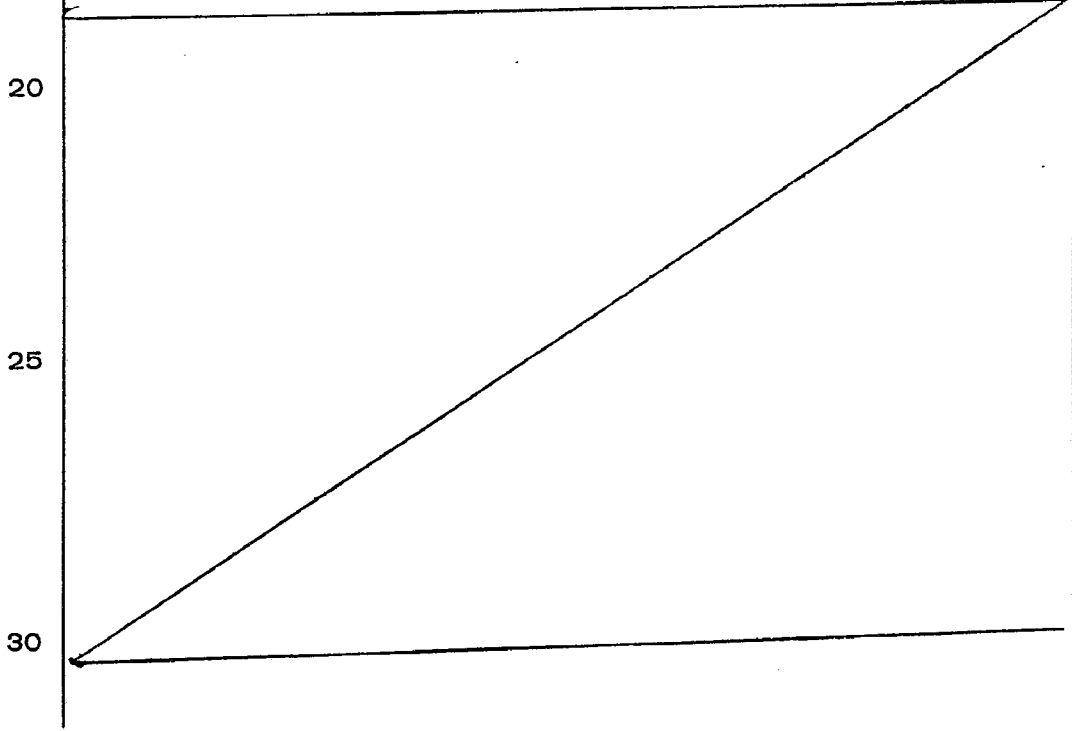
EJEMPLO 8

25 El compuesto del ejemplo 7 fue aprobado para acti-
vidad antiviral por el método de régimen de virus (VR) del -
Sidwell y otros. Appl. Microbiol 22, 797 (1971) contra virus
de herpes simplex del tipo 1 (HSV/1), tipo 13 de rinovirus
(RV/13) tipo 3 de virus de para-influenza (PIV/3), tipo A de
30 virus de influenza. ZNWS (I^{NWS}), y virus de vaccinia (VV),



1 en las línea de selva mostradas en la tabla III más abajo. -
V.R. $>1,0$ es indicativo de definida actividad antiviral, V.R.
de $0,5 - 0,9$ es indicativo de moderada actividad antiviral y
5 V.R. $<0,5$ sugiere ligera o ninguna aparente actividad anti-
viral. Para demostrar la actividad antiviral de los conceptos
resultantes cuando el fosfato cíclico fue abierto por hidro-
lisis ácida, se aciduló la solución (en medio de cultivo de
célula) conteniendo la más alta concentración de productos -
a pH 1,5 con 1N de HCl. La formación de una mezcla de 2'- y
10 3'-fosfato de 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol se confir-
mó por cromatografía de capa fina. Esta solución y una solu-
ción similar que no fue acidulada se incubaron lado a lado a
15 37° C durante 2 horas. La solución acidulada fue entonces -
neutralizada añadiendo 1N de NaOH y las dos soluciones incu-
badas fueron diluidas y ensayadas en cultivo de célula junto
con una solución similar que no había sido incubada.

Siguen los resultantes datos VR.





17

- 14 -

- T A B L A - III -

Régimen de virus de ciertos 1,2,4-triazol-3-carboxamida-
1-β-D-ribofuranosil

Compuesto	RV/13		PIV/3	INWS		
	KB	RK-13	KB	CE		
Sal de amonio de 1-(β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida 2',3'-cíclico fosfato	0.8,1.2	1.1	0.6	0.2,0.3	1.1,1.1	0.4
-- idem -- (incubado)	0.8	--	--	0.2	1.0	0.4
2'- y 3'-fosfatos mixtes (incubados) de 1-(β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol-3-carboxamida	0.8	--	--	0.6,0.6	1.0	0.5

La mezcla de 2'- y 3'-monofosfato exhibió actividad similar a la del fosfato cíclico salvo en el caso de RW/13 que demostró ser mas sensible a los fosfatos no cíclicos.

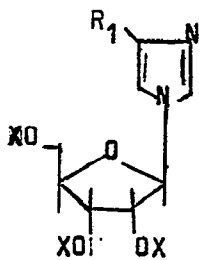
N O T A

La presente patente de adición comprende las siguientes reivindicaciones:

- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal No. 403.142 por "Procedimiento para la preparación de 1,2,4-triazol nucleósidos" especialmente (β-D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol nucleósidos de la estructura

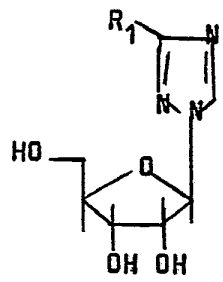
30

1



5 en que R_1 se selecciona del grupo consistente en a) carboxamida, b) tiocarboxamida y c) grupos carboxamidino y sales de adición de ácido, fisiológicamente aceptables de c) y en que X es hidrógeno ó $C_1 - C_{18}$ acilo, siendo por lo menos un X hidrógeno y siendo por lo menos un X acilo, caracterizadas porque
 10 preferencialmente se acila con un haluro de acilo o anhídrido de acilo, uno o varios de los grupos hidroxilo libres de un compuesto de la estructura

15

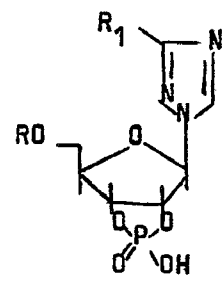


en que R_1 es como se ha indicado arriba y aislando el producto.

20

2.- Mejoras según la reivindicación 1, especialmente para preparar 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazol nucleósidos de la estructura,

25



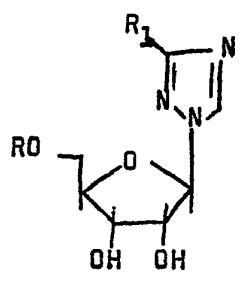
en que R_1 se selecciona del grupo consistente en a) carboxamida, b) tiocarboxamido y c) grupos carboxamidino y sales de

30

Handwritten signature

1 adición de ácido fisiológicamente aceptables de c); y en que R
es hidrógeno o C₁-C₁₈ acilo, caracterizadas porque se fosfori-
la un compuesto de la estructura

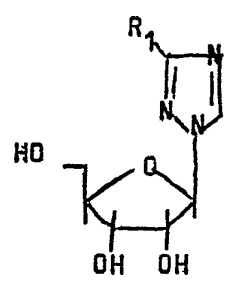
5



en que R₁ y R son como se ha indicado arriba; con ácido fos-
fórico en dimetilformamida y se aísla del producto.

10 3.- Mejoras según las reivindicaciones preceden-
tes, especialmente para preparar 2' y 3' fosfatos de un 1-
(β-D-ribofurancil)-1,2,4-triazol nucleótido de la estruc-
tura

15



20 en que R₁ se selecciona del grupo consistente en a) carboxa-
mida, b) tiocarboxamido y c) grupos carboxamidino y sales de
adición de ácido fisiológicamente aceptables de c); caracte-
rizadas porque el producto de la reivindicación 2 se hidro-
liza con ácido diluido.

25

4.- "Mejoras introducidas en el objeto de la pa-
tente principal 403.142, por: "Procedimiento para la prepa-
ración de 1,2,4-triazol nucleósidos".


30



1

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

5

Madrid, a

17 MAR 1975.

CARLOS ROEB
P. P.

Fda: Pedro Holmerson

10

15

20

25

Re
30