

442073

15 NOV. 1975

P.- 61.632
Case X 113 - Div

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl. C07D // A61K

para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED

entidad británica

con domicilio en 183/193 Euston Road, Londres N.W.1.,
Inglaterra

por: "UN METODO DE PREPARAR DERIVADOS DE PIRIMIDINA"

5.11.75

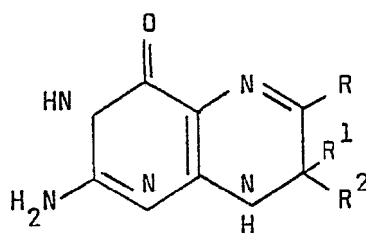
- 1 -

**POOR
QUALITY**

La presente invención se refiere a la preparación de productos intermedios para la síntesis de derivados de pteridina. La Memoria Descriptiva describe también composiciones y formulaciones farmacéuticas que comprenden estas pteridinas en combinaciones que son útiles en el tratamiento de infecciones microbianas.

Se ha establecido ya que los compuestos 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetil-7,7-dimetil-7,8-dihidropteridina y 2-amino-4-hidroxi-6-metil-7,7-dimetil-7,8-dihidropteridina o sus tautómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables, tienen actividad bacteriostática, siendo particularmente efectivos contra Cl. perfringens y Derm. dermatonomus, según se describe en las Memorias Descriptivas de la Patente Británica Nº 1303171 y la Solicitud británica Nº 36289/70 (Patente Belga Nº 770.577).

Se ha descubierto ahora que las nuevas pteridinas representadas mediante la fórmula (I) que sigue o sus tautómeros o sus sales farmacéuticamente aceptables,



5 en donde R es un grupo alcohol inferior, sustituido facultativamente con un grupo hidroxilo, y R^1 y R^2 son iguales o diferentes y cada uno de ellos es un grupo alcohol inferior que tienen juntamente por lo menos 3 átomos de carbono o R^1 y R^2 , junto con el átomo de carbono en la estructura de anillo de pteridina, forman un sistema de anillo espirocicloalcohol que tiene de 4 a 6 átomos de carbono exteriores a la estructura de anillo de la pteridina, son asimismo útiles como antagonistas del metabolismo microbiano.

10 Como se usa aquí y a lo largo de la Memoria Descriptiva, la expresión "grupo alcohol inferior" se refiere a un grupo alcohol de cadena recta o ramificada que, a menos que se especifique de otro modo, tiene de 1 a 4 átomos de carbono.

15 En la fórmula anterior, los compuestos preferidos son aquéllos en que R es un grupo hidroxialcohol, en particular un grupo hidroximetilo. Además, son más preferidos aquellos compuestos en que R^1 y R^2 , junto con el átomo de carbono en la estructura de anillo de la pteridina, forman un grupo espirociclohexilo, o en especial aquéllos en que R^1 y R^2 son, ambos, grupos alcohol, en particular grupos etilo. De este modo se ha descubierto que los compuestos 2-amino-4-hidroxilo-6-hidroximetil-7,7-dietil-7,8-dihidropteridina y menos pre-

feriblemente el 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetil-7-espirociclohexil-7,8-dihidropteridina son particularmente útiles en el tratamiento de infecciones microbianas.

5 Por consiguiente, conforme a la presente invención, se proporcionan en un aspecto los nuevos compuestos de fórmula (I).

10 Los compuestos anteriores y sus sales inhiben una de las enzimas que toma parte en la biosíntesis del ácido dihidrofólico, a saber la hidroximetildihidropteridina pirofosfoquinasa, que es esencial para el crecimiento de microorganismos, por ejemplo bacterias. Así pues ellos pueden ser usados en investigaciones farmacológicas in vitro, en ensayos clínicos y en ensayos de diagnóstico, que establezcan, por ejemplo, las propiedades de bacterias. Cuando se usan como bacteriostáticos pueden encontrarse presentes en una concentración de 50 a 500, en particular de 110 a 180 mg de base/ml de la solución en que el organismo crece en ausencia de un compuesto. Un uso adicional de los compuestos, cuando 15 están en solución, es en el tratamiento de heridas, por ejemplo después de una intervención quirúrgica, para evitar el crecimiento de bacterias. Además los compuestos de fórmula (I) y sus sales, manifiestan una toxicidad inesperadamente baja en mamíferos o aves, por ejemplo 20 aves de corral, lo que las hace particularmente ade-

cuados para aplicaciones contra infecciones microbianas en tales receptores bajo circunstancias descritas más adelante en esta Memoria.

5 Los co-factores de tetrahidrofolato son metabolitos esenciales en todas las células para la biosíntesis de las purinas, ácido timidílico, serina y diversos otros compuestos biológicamente importantes. La mayor parte de estos co-factores son aductos de un carbono del ácido tetrahidrofólico. La fuente última de éstos
10 para los animales superiores y el hombre son los alimentos, que contienen folatos previamente formados, habitualmente en forma de vitaminas.

En los microorganismos, los co-factores son sintetizados a partir de compuestos químicos más sencillos. En general el procedimiento biosintético proporciona en primer lugar "dihidropteridina" (Pt), es decir, 2-amino-4-hidroxi-6-hidroxi-metil-7,8-dihidropteridina (HMPT) éster de pirofosfato, partiendo de su precursor inmediato HMPT en presencia de la enzima hidroximetil-dihidropteridina-pirofosfoquinasa (HMPPS). La Pt se condensa después con ácido p-aminobenzoico (pAB) en presencia de la enzima dihidropterato-sintetasa formando el ácido dihidropterico (DPTA). Este intermedio se condensa además con un glutamato formando ácido dihidrofólico (DFA o "folato") que después es reducido enzimáticamente
20
25

proporcionando el tetrahidrofolato esencial, por ejemplo, en bacterias y otros microorganismos.

La provisión del "folato" a partir de los bloques de edificación básicos, es decir pteridina, pAB y glutamato, y la conversión ulterior de éste en el tetrahidrofolato, se sabe es inhibida de dos modos diferentes. Por ejemplo, las sulfonamidas desplazan el pAB en el esquema de reacción anterior. Debido a su estrecho parecido estructural con el pAB, las sulfonamidas u otros 'antagonistas' similares entran en la biosíntesis y evitan la formación de DPTA, y de DFA, y por consiguiente son antimetabolitos para el metabolito pAB. También es sabido que los compuestos que son 'inhibidores' de la enzima ácido dihidrofólico-reductasa bloquean la etapa de síntesis que lleva a tetrahidrofolato. Un considerable número de derivados pirimidínicos muestran propiedades antimicrobianas sustanciales sobre la base de tal bloqueo.

Fué establecido más tarde que tales inhibidores pueden actuar sinérgicamente con las sulfonamidas, es decir, puede existir un doble bloqueo sucesivo y una fuerte potenciación mutua de los efectos anti-bacterianos de los dos materiales. El grado de acción antimicrobiana ejercido mediante tales combinaciones es considerablemente más amplio que el esperado de la actividad de cada uno de los compuestos medicamentosos, y organismos

que sólo son marginalmente sensibles a los agentes individuales se hacen muy sensibles a las combinaciones.

5 Se sugirió también hipotéticamente, que antimetabolitos a Pt podrían inhibir la biosíntesis de DPTA (y DFA) (véase Hitchings y Burchall Advances in Enzymology, 27, 417-468 (1965) pero los compuestos ensayados hasta este punto para tal propósito han resultado fallidos, siendo o bien inactivos o demasiado tóxicos o frecuentemente ambas cosas a la vez (véanse los compuestos descritos en las Patentes Británicas Nos. 10 981.506 y 987.916).

15 Se ha establecido que, para fines antimicrobianos, constituye un requisito previo para el antagonismo efectivo de Pt que el compuesto debe ser un inhibidor de HMPPS sin actuar también como antimetabolito de la dihidropteridina que sirve como un co-factor para la hidroxilación de fenilalanina y tirosina, precursores de las catecolaminas, tales como la norepinefrina, que ejercen acciones importantes como reguladores de sistemas 20 cardiovasculares. Tal efecto antimetabólico pudiera conducir a una toxicidad prohibitiva para especies avícolas o mamíferas, que son normalmente los receptores infectados con los microbios.

25 Se ha descubierto actualmente que los compuestos de fórmula (I) y sus sales colman los requisitos

anteriores, es decir, la inhibición de HMPPS combinada con toxicidad baja para las especies receptoras, como se demuestra, por ejemplo, en pollos y ratas. Estos compuestos no sólo inhiben el crecimiento de microorganismos por sí mismos, aún cuando en una extensión limitada con ciertas bacterias, tales como Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus faecalis, Escherichia coli, Salmonella typhi, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pasteurella multocida entre otras, sino que también se ha encontrado que actúan con un efecto sinérgico sumamente notable cuando se combinan con un antagonista del ácido p-aminobenzóico, es decir sulfonamidas y compuestos semejantes, o con inhibidores selectivos de la dihidrofólico reductasa, es decir pirimidinas y compuestos relacionados, o con una combinación de ambos de estos tipos de agentes antimicrobianos. Este efecto de potenciación de los compuestos de fórmula (I) es la materia de la Solicitud de Patente Británica análoga Nº 36774/71.

En esta Solicitud se describe y reivindica una composición para ensayar o tratar sistemas microbianos o infecciones, que comprende una cantidad potenciadora eficaz de un compuesto de fórmula (I) en combinación con una cantidad eficaz de un antagonista o inhibidor o ambos, como se ha definido en esta memoria.

Las infecciones microbianas contra las que son eficaces estas combinaciones son infecciones por protozoos o bacterias, ocasionadas por aquellos microorganismos que sintetizan por lo menos una parte sustancial de sus requisitos de cofactor de tetrahidrofolato. Más específicamente estos microorganismos que ocasionan infecciones son aquéllos que absorben adecuadamente las combinaciones farmacéuticas descritas en esta Memoria y además son aquéllos en que estas combinaciones tienen un efecto sinérgico interfiriendo con la síntesis de novo de los co-factores de tetrahidrofolato requeridos. Por ejemplo, se ha encontrado que las composiciones descritas son útiles en el tratamiento de infecciones ocasionadas por Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Pasteurella multocida.

Se ha encontrado específicamente que, cuando se combinan compuestos de fórmula (I) con una cantidad del antagonista y/o el inhibidor que no es suficiente de ordinario para ser eficaz como agente antimicrobiano por sí misma, la combinación de un compuesto de fórmula (I) con esta cantidad normalmente ineficaz del antagonista y/o el inhibidor proporciona una composición que actúa en su totalidad como un agente antimicrobiano eficaz. Esto es especialmente notable cuando la cantidad del compuesto de fórmula (I) es tan baja que no tiene

sustancialmente efecto microbiano al nivel particular, no obstante en la combinación la potenciación es marcada, y en algunos casos muy marcada. Así pues, usando una cantidad potenciadora eficaz de un compuesto de fórmula (I) junto con el antagonista y/o el inhibidor, es posible ahora reducir significativamente la cantidad del antagonista y/o del inhibidor requerida para inhibir el crecimiento de estas bacterias.

Por consiguiente, conforme a cuanto antecede, la expresión "una cantidad eficaz" utilizada en asociación con las expresiones un 'inhibidor' de la dihidrofolico-reductasa y un 'antagonista' del ácido para-amino-benzoico, significa o bien (a) una cantidad del 'inhibidor' ó 'antagonista' que es eficaz en un grado igual al de a un agente antimicrobiano por derecho propio, pero que es potenciado mediante el uso de un compuesto de fórmula (I) o (b) una cantidad del 'inhibidor' ó 'antagonista' que es ineficaz como agente antimicrobiano pero que cuando se combina con un compuesto de fórmula (I) proporciona una composición que es un agente antimicrobiano eficaz. Una "cantidad potenciadora eficaz" significa una cantidad del compuesto de fórmula (I) que aumenta la actividad de un inhibidor y/o de un antagonista, de modo que proporciona una efectividad mejorada o adecuada para la combinación total.

Debe hacerse resaltar que la inhibición de los procesos biosintéticos mediante tales medios podría denominarse como antagonismo competitivo en los tres casos, y pudiera haber potenciación entre los tres tipos de agentes. Las expresiones 'inhibidor', 'antagonista' y 'potenciación' mediante un compuesto de fórmula (I) son arbitrarias y sólo deben servir como nombres convenientes para el tipo apropiado de componentes en productos de combinación descritos y reivindicados en la Memoria Descriptiva de la solicitud análoga antes mencionada.

La actividad de inhibición frente a HMPPS de un compuesto de fórmula (I) seleccionado, puede ensayarse, por ejemplo, comprobando la transferencia del fosfato terminal de adenosin-trifosfato-ATP- γ - P^{32} a 'dihidropteridina'. Se encontró que las concentraciones necesarias para la inhibición del 50% de la formación de Pt (CI₅₀) en tales ensayos, estaban bien relacionadas y dentro del margen de error obtenido por otros ensayos apropiados a este respecto, que miden la inhibición de cualquiera de las dos enzimas que toman parte en la formación de HMPT y DPTA. Tal inhibición, por ejemplo, puede llevarse a cabo fácil y sencillamente incubando un extracto de *E. coli* con pAB-7-C¹⁴, ATP, Mg y 'dihidropteridina'. La formación del dihidropterato-C¹⁴ puede valorarse cuantitativamente después de separar el sustrato de pAB sin reaccionar, por

ejemplo mediante cromatografía. Se ha descubierto que los compuestos que poseen en tales ensayos un valor de IC_{50} de aproximadamente $100 \mu M$ o menos, habitualmente inferiores a $50 \mu M$ representan compuestos que ejercen un efecto de potenciación útil, con tal que su toxicidad en los vertebrados apropiados sea aceptable. Preferiblemente, el valor es $25 \mu M$ o menos, por ejemplo en el intervalo comprendido entre 2 y $12 \mu M$. En general es deseable un valor inferior a $7 \mu M$.

Como se ha explicado anteriormente, para el fin descrito es esencial que el compuesto de fórmula (I) no tenga una toxicidad prohibitiva para los sistemas cardiovasculares de los mamíferos o aves receptores. Si bien la toxicidad baja es, por consiguiente, un requisito esencial, un índice terapéutico incorpora tanto los valores de actividad y toxicidad pertinente a la descripción presente, y podría usarse con ventaja para la selección de compuestos potenciadores de fórmula (I).

El índice terapéutico se define como la proporción de la dosis máxima tolerada a la dosis mínima eficaz y en la mayor parte de los casos es, de preferencia, superior a 10, adecuadamente de 5 por lo menos y en circunstancias excepcionales de 3 aproximadamente por lo menos, en el hombre, pero posiblemente tan bajo como 2 en animales.

Aún cuando la técnica está enterada de muchos compuestos que se sabe son antagonistas del ácido paraaminobenzoico y son antimicrobianos, los compuestos de azufre que se describen como agentes antimicrobianos desde la parte superior de la página 994 a la página 1007 del Merck Index, 8ª Edición, 1968, se presentan únicamente a título de ejemplo.

De los compuestos conocidos que son antagonistas, se prefieren, para el fin descrito, las siguientes sulfonamidas (o sus sales farmacéuticamente aceptables).

Sulfanilamida, sulfadiazina, sulfametisazol, sulfametizol, sulfapiridina, sulfatiazol, sulfameracina, sulfametazina, sulfisoxazol, sulfadoxina, sulfasomidina, sulfaclorpiridiazina, 2-(p-aminobenceno)-sulfonamido-3-metoxipirazina (Melfizina), α -amino-p-toluensulfonamida, 5-sulfanilamido-2,4-dimetil pirimidina, 4-(N'-acetilsulfanilamido)-5,6-dimetoxipirimidina, 3-sulfanilamido-4,5-dimetilisoxazol, 4-sulfanilamido-5-metoxi-6-decilo xipirimidina, sulfamonometoxina, 4-p-(8-hidroxi-quinilil-4-azo)-fenilsulfanilamido-5,6-dimetoxipirimidina, sulfadimetoxina, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina, y p-(2-metil-8-hidroxi-quinolinil-(5)-azo)fenilsulfanilamido-5,6-dimetoxipirimidina. Son ejemplos de antagonista de tipo no sulfonamida, el ácido p-aminosalicílico (PAS) y la p,p'-diaminodifenilsulfona.

Similarmente, aún cuando se conocen muchos com-
puestos que inhiben la dihidrofólico-reductasa y actúan
como agentes antimicrobianos, los compuestos descritos
en las patentes siguientes se presentan a título de ejem-
5 plo de compuestos adecuados para el uso para el fin des-
crito.

Patentes de E.E.UU. Nos. 2.658.897; 2.767.183;
3.021.332; 2.937.284; 3.322.765; 2.909.522; 2.624.732;
2.579.259; 2.945.859; 2.576.939; 2.926.166; 2.697.710;
10 2.749.345; y 2.749.344.

No obstante, se prefieren los inhibidores si-
guientes (o sus sales farmacéuticamente aceptables) para
las combinaciones descritas:

2,4-diamino-6-etil-5-p-clorofenilpirimidina (pi-
15 rimetamina), 2,4-diamino-5-(3',4',5'-trimetoxibencil)piri-
midina (trimetoprim), 2,4-diamino-5-(3',4'-dimetoxibencil)-
pirimidina (diaveridina), 2,4-diamino-5-(2'-isopropil-4'-
clorofenoxi)pirimidina, 2,4-diamino-5-metil-6-secbutilpi-
rido(2,3,d)pirimidina, 2,4-diamino-5-metil-6-bencilpirido-
20 (2,3-d)pirimidina, 2,4-diamino-6-bencilpirido(2,3,-d)piri-
midina, 2,4-diamino-5-6-trimetilenoquinoxalina, 2,4-diami-
no-5,6-tetrametilenoquinoxalina, 2,4-diamino-5-(2',4',5'-
trimetoxibencil)pirimidina, 2,4-diamino-5-(2'-etil-4',5'-
dimetoxibencil)pirimidina, 2,4-diamino-5-(2'-metil-4',5'-
25 dimetoxibencil)pirimidina.

Sin embargo, las combinaciones más preferidas incluyen aquéllas que combinan un compuesto de fórmula (I), en especial en el que R es un grupo hidroximetilo y R¹ y R² son ambos grupos etilo, con sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfadoxina o sulfaquinoxalina como antagonistas, o con trimetoprim, diaveridina o pirinetamina como inhibidores. En vista de las posibles ventajas sinérgicas al usar ciertos antagonistas e inhibidores en combinación, contra enfermedades particulares, y el efecto de potenciación de los compuestos de fórmula (I) sobre ambos de estos tipos de compuestos antibacterianos, se ha preferido formular combinaciones triples, que comprenden un compuesto de fórmula (I) con uno de los antagonistas preferidos antes mencionados, y uno de tales inhibidores. Por ejemplo, combinaciones de sulfadiazina/trimetoprim, sulfametoxazol/trimetoprim, sulfadoxina/trimetoprim o sulfaquinoxalina/diaveridina, cada una de ellas junto con un compuesto de fórmula (I), proporcionan una eficacia mejorada cuando se comparan con los componentes solos o con pares de ellos.

Los compuestos de fórmula (I) o bien solos o junto con el antagonista y/o el inhibidor, pueden presentarse en asociación con un excipiente en formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral, tópica, rectal u oral. Las formulaciones para administración oral o rectal se presentan con ventaja en unidades

individuales, tales como tabletas, cápsulas, sellos, ampollas o supositorios, cada una de las cuales contiene una cantidad previamente determinada de cada compuesto, pero también pueden presentarse como polvo, como gránulos, como solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como pomada o pasta para administración tópica. Para uso parenteral, las formulaciones que incorporan un excipiente líquido acuoso o no acuoso deben ser estériles y presentadas en recipientes herméticamente cerrados. Las formulaciones pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos conocidos y pueden incluir uno o más de los ingredientes accesorios siguientes: diluyentes, solutos para hacer a las soluciones isotónicas con la sangre, agentes tampón, aromatizantes, aglutinantes, dispersantes, tensioactivos, espesantes, lubricantes y materiales de recubrimiento, agentes de conservación, bacteriostáticos, antioxidantes, bases de supositorios y pomadas, y cualquier otro excipiente aceptable.

En otro aspecto de la presente invención, por consiguiente, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona un método de fabricación de una formulación farmacéuti-

ca, mezclando el compuesto de fórmula (I) con un excipiente, mediante técnicas conocidas. La Memoria Descriptiva de la Solicitud análoga antes mencionada describe además y reivindica una formulación farmacéutica que
5 comprende una composición, según se ha definido anteriormente en esta Memoria, junto con un excipiente, y su método de preparación, mezclando la composición con el excipiente mediante técnicas conocidas.

Las formulaciones que contienen el compuesto
10 de fórmula (I) en asociación con un antagonista o un inhibidor pueden presentarse también en forma de un equipo, que comprende unidades a dosis de estos componentes envasadas por separado, con instrucciones para su uso en forma combinada. Las instrucciones pueden especificar
15 asimismo el modo de administración y las indicaciones para lo que es adecuada la fórmula.

Los compuestos de fórmula (I), tanto para usarlos solos o en asociación con un antagonista y/o un inhibidor, así como los antagonistas e inhibidores, pueden
20 presentarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables de un ácido mineral u orgánico, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido maleico o ácido salicílico, o, en especial
25 para el antagonista de sulfonamida, de una base, tal como

hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de tetrametilamonio o amoniaco.

5 Las proporciones en que se utilizan los compuestos de fórmula (I) terapéuticamente activos en las composiciones descritas en esta Memoria Descriptiva, pueden variarse entre límites amplios. Dependiendo de la naturaleza y circunstancias de uso, las composiciones pueden contener el compuesto de fórmula (I) con el antagonista y/o el inhibidor en proporciones y dosis apropiadas. Por ejemplo, en los casos de empleos in vivo es a menudo deseable mantener una cierta proporción de componentes en el suero sanguíneo o líquidos tisulares, preferiblemente durante un periodo de tiempo prolongado. Según los grados diversos de absorción, descarga o descomposición de los componentes, las cantidades y proporciones iniciales de los ingredientes de la formulación pueden ser diferentes de las deseadas en los tejidos in vivo. Las formulaciones y dosis recomendadas para el tratamiento general de una enfermedad particular de hombre o de un animal deben ser ajustadas conforme a los requisitos particulares de los receptores de la enfermedad, las actividades conocidas del componente antagonista o inhibidor contra los organismos causantes, la vida media y la toxicidad de los componentes in vivo y otros requisitos prácticos.

10

15

20

25

5 Por ejemplo, la composición o formulación farmacéutica puede contener de 1 a 30 partes en peso aproximadamente, de preferencia de 5 a 15 partes, del compuesto de fórmula (I), o una cantidad equivalente de una de sus sales, y de 1 a 30 partes, de preferencia de 5 a 15 partes, de un antagonista o una cantidad equivalente de una de sus sales, y/o una parte de un inhibidor, o una cantidad equivalente de una de sus sales.

10 La dosis variará según el organismo que ocasiona la infección, pero bajo circunstancias ordinarias, pueden administrarse diariamente en varias dosis hasta unos 60 mg/kg de cada uno de un compuesto de fórmula (I) y el antagonista, y hasta unos 7,5 mg/kg de inhibidor, en combinación. La composición o formulación farmacéutica puede administrarse al hombre en formas unitarias de administración que contienen hasta 750 mg del compuesto de fórmula (I) y hasta 750 mg del antagonista, y/o hasta 25 mg del inhibidor. Preferiblemente para dosis para adultos la cantidad del compuesto de fórmula (I) podría ser de unos 200 mg, la del antagonista de unos 200 mg y/o la del inhibidor de unos 25 mg.

25 La formulación farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula (I) en combinación con el antagonista y/o el inhibidor puede usarse también en solución para irrigar heridas, por ejemplo después de una inter-

vención quirúrgica, para evitar el crecimiento de bacterias. Por ejemplo, puede usarse una solución antibacteriana que tenga la concentración de componentes preferida, que figura a continuación:

5 1-30 mg/ml del compuesto de fórmula (I),
1-30 mg/ml del antagonista y/o 0,03-1 mg/ml del inhibidor, en un disolvente farmacéuticamente aceptable, adecuado para uso externo.

10 El efecto de potenciación de los compuestos de fórmula (I) puede ser demostrado y utilizado in vitro con relativa facilidad para fines de investigación y prácticos. Tales posibilidades incluyen diagnosis e identificación de la flora bacteriana de individuos y la selección consiguiente del modo de tratamiento clínico.

15

Las diversas combinaciones pueden ser incorporadas en discos porosos (tales como discos de papel de filtro) o en Medio Nutriente de Agar u otros medios para el crecimiento de bacterias, para determinar la susceptibilidad. Los artículos que incorporan el compuesto de fórmula (I) con un compuesto antagonista y/o un inhibidor, pueden ser distribuidos o vendido a doctores, hospitales y clínicas para los fines anteriores. Un disco de ensayo típico puede impregnarse con una solución

20

25 que contiene de 5 a 50 µg/ml de un antagonista del ácido

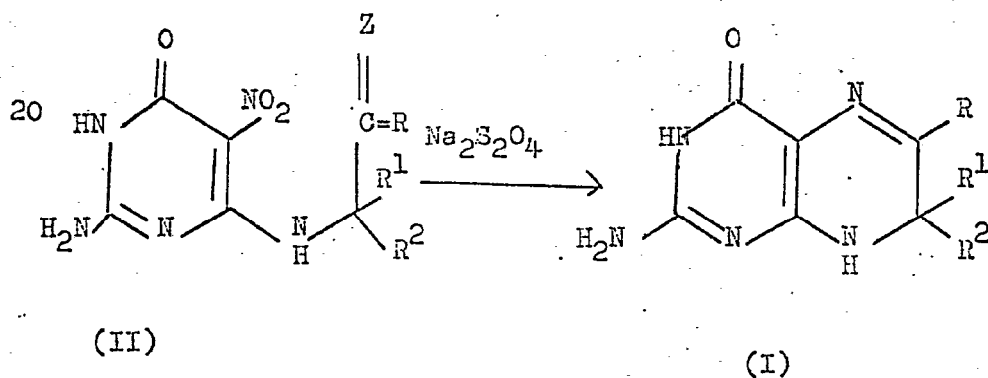
5 para-aminobenzoico, 0,5 a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de un inhibidor de la dihidrofólico-reductasa, y aproximadamente de 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de un compuesto de fórmula (I) en un medio que comprende una mezcla de una infusión acuosa y digerido con papaína de músculo de caballo.

10 Además, tales ensayos farmacológicos que llevan consigo antagonistas o inhibidores potenciados, pueden ser útiles también para la caracterización de bacterias conforme a su sensibilidad y a su resistencia particular, por ejemplo a un antagonista, cuando se usa aislado, y tales investigaciones que llevan consigo una variedad de formulaciones como se describe en esta Memoria, forman también la base para determinar las composiciones o formulaciones seleccionadas con fines de tratamiento general. La toxicidad de los compuestos de fórmula (I) es, en general, considerablemente más baja que la de los antagonistas o inhibidores comúnmente usados, lo que puede permitir al clínico mantener o aumentar la eficacia de la actividad antibacteriana de la formulación con un aumento concurrente de la proporción terapéutica o disminución en los efectos tóxicos o secundarios del medicamento.

20 Además de lo que antecede, se ha encontrado que los compuestos de fórmula (I) potencian la actividad de los antagonistas y/o inhibidores antes citados, con-

tra infecciones con microorganismos en animales domés-
ticos, incluyendo aves de corral, por ejemplo frente a
Pasteurella multocida, pero en especial frente a la co-
cidiosis, enfermedad protozoaria. Las formulaciones tri-
5 ples que comprenden un compuesto de fórmula (I) junto
con un compuesto tal como la sulfaguinoxalina y un in-
hibidor tal como la disveridina, son eficaces a concen-
traciones más bajas que los componentes antagonista o
10 inhibidor aislados y poseen una actividad mejorada, sien-
do eficaces contra todas las especies de Eimeria rele-
vantes, que ocasionan esta enfermedad en las aves de co-
rral.

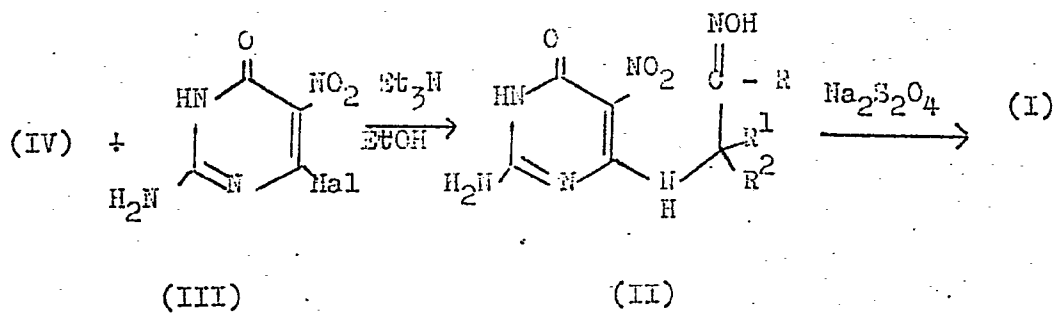
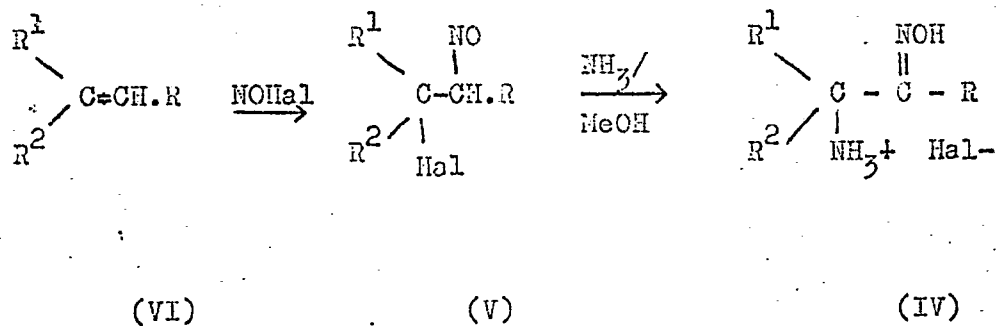
Los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse
mediante la ciclización reductiva de un compuesto de
15 fórmula (II).



en donde R, R¹ y R² son como se ha definido anteriormente y Z es un átomo de oxígeno cetónico o un grupo protector de éste, tal como un grupo semicarbazona o un grupo oxima, preparado conforme a los procedimientos descritos por Pfleiderer y Zondler (Chem. Ber. 99, 3008 (1966), y las Memorias Descriptivas de la Patente Británica nº 1303171 y de la Solicitud de Patente Británica pendiente nº 36289/70 (Patente Belga nº 770.577) respectivamente.

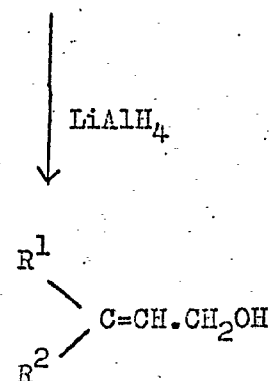
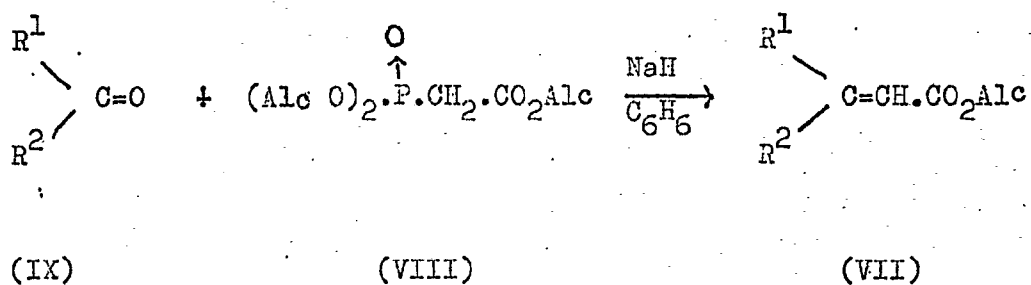
No obstante es particularmente preferido el método descrito en la Solicitud de Patente Británica nº 36289/70.

En este método, un compuesto R¹R²C = CHR (VI), en donde R, R¹ y R² son como se ha definido anteriormente, experimenta una reacción de adición con un haluro de nitrosilo preparado in situ y el nitrosihaluro (V) que resulta se convierte en oxima (IV) mediante reacción con solución de amoníaco. Haciendo reaccionar la oxima (IV) con una 2-amino-4-halogeno-6-hidroxi-5-nitropirimidina (III) se obtiene la cetoxima pirimidínica (II) que después se ciclisa reductivamente obteniéndose la pteridina (I), como se indica en la sucesión de reacciones siguientes:



El compuesto de fórmula (VI) en que R es un grupo hidroxialcilo puede prepararse a su vez a partir de la cetona $\text{R}^1\text{R}^2\text{C}=\text{O}$ (IX) haciendo reaccionar ésta con un éster trialcilo-fosfónico (VIII) y reduciendo el

éster (VII) formado de este modo para obtener el alcohol (VI).



(VI)

Si se precisa una pteridina que tenga R^1 y R^2 como sustituyentes diferentes, entonces se obtendrá una mezcla racémica de dos estereoisómeros del nitrosaluro (V), a la vista del átomo de carbono asimétrico

presente. Puede ser ventajosa la separación de los dos isómeros en esta etapa mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica.

Conforme a la presente invención en aspectos adicionales se proporcionan también

5 1) Los métodos aquí descritos para preparar cualquiera de los compuestos de fórmula (I), que comprende llevar a cabo la ciclización reductiva de los compuestos de fórmula (II).

10 2) Los métodos aquí descritos para preparar cualquiera de los compuestos (II), en los que Z es un grupo oxima, a partir de (IV), (IV) procedente de (V) ó (VI) y (VI) procedente de (IX).

15 3) Los compuestos de fórmula (I), (II), en los que Z es un grupo oxima, (IV) y (V), siempre y cuando se preparen mediante un método tal como se ha indicado en (1) ó (2).

4) Como compuestos nuevos de valor como intermedios químicos:

los compuestos de fórmula (II), (IV) y (V).

20 5) Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o una de sus sales en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, siempre y cuando se prepare mediante el método descrito en esta Memoria.

25 Los Ejemplos siguientes ilustran la invención

pero no estén destinados en modo alguno, a limitar el alcance de la invención.

Las temperaturas se indican en grados Celsius.

5 Ejemplo A : Preparación de 2-amino-4-hidroxi-6-hidroxi-
metil-7,7-diethyl-7,8-dihidropteridina.

(I, R=CH₂ OH; R¹=R²=Et)

Ejemplo 1

3-ethylpent-2-enolato de etilo (VII) (R¹=R²=Et)

10 Se colocó hidruro de sodio (6 g) en un matraz con benceno secado con sodio (100 ml) y el matraz se llenó con nitrógeno seco exento de oxígeno. A esta solución se añadió un ligero exceso de fosfonoacetato de trietilo (VIII) (Alc=Et) (61,7 g) durante un periodo de
15 tiempo de 1,5 horas y se mantuvo la temperatura en <15° durante la adición. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 1 hora más y después se trató gota a gota con pentan-3-ona (IX), (R¹=R²=Et) (21,5 g). Después de terminar la adición de la cetona se agitó la mezcla de
20 reacción a temperatura ambiente hasta que hubo precipitado el fosfato de dietil-sodio sólido (aproximadamente 10 h). Las aguas madres se decantaron del sólido, que se lavó con benceno (4 x 25 ml). Los extractos bencénicos se reunieron y evaporaron en vacío obteniéndose un aceite
25 de color amarillo pálido (29 g) que se destiló en

vacío proporcionando 3-etilpent-2-enoato de etilo (VII) (21,8 g, rendimiento 56%) como un aceite incoloro, punto de ebullición 52-54°/4 mm Hg.

5

Ejemplo 2(a)

3-Etilpent-2-en-1-ol. (VI) ($R^1=R^2=Et$)

10

15

20

25

Se trató 3-etilpent-2-enoato de etilo (VII) (42,3 g) en éter anhidro (400 ml), gota a gota, con una solución al 70% (en benceno) de un ligero exceso de dihidro bis-etoximetoxi-aluminato de sodio (D.A.S) (86,1 g), manteniéndose la temperatura a 0° hasta que fué completa la adición del agente reductor. La mezcla de reacción se agitó después a temperatura ambiente durante 6 horas y se destruyó el exceso de D.A.S mediante la adición cuidadosa de agua. El aluminato de sodio sólido que precipitó, se separó por filtración y se extrajo el filtrado con acetato de etilo (4 x 50 ml). Los extractos reunidos se lavaron con solución saturada de sal, se secaron sobre sulfato sódico y se eliminó el disolvente. El aceite de color amarillo pálido que resultó (23 g) se destiló proporcionando 3-etilpent-2-en-1-ol (VI) (18,5 g, rendimiento 60%) en forma de un aceite viscoso incoloro, punto de ebullición 60°/4 mm Hg.

Ejemplo 2(b)

3-Etilpent-2-en-1-ol (VI) ($R^1=R^2=Et$).

5 Se añadió gota a gota una suspensión de hidru-
ro de litio y aluminio (H.L.A.) (8,2 g) en éter seco, a
una solución de 3-etilpent-2-enoato de etilo (VII)
(33,7 g) en éter seco (100 ml) a 0°. Después de que la
adición del H.L.A. se concluyó, se agitó la mezcla a tem-
peratura ambiente durante 2 horas. Se destruyó el exceso
de H.L.A. a 0° añadiendo una solución saturada de sul-
10 fato de sodio. La solución se filtró y el filtrado se
extrajo con acetato de etilo operándose como se ha des-
crito en el ejemplo 2(a), obteniéndose el alcohol (VI)
(19 g, rendimiento 77%).

15 Ejemplo 3

3-Cloro-3-etil-2-nitroso-pentan-1-ol. (V) ($R=CH_2OH$,
 $R^1=R^2=Et$)

20 Se añadió gota a gota ácido clorhídrico concen-
trado (23 ml), durante 1,5 horas, a una mezcla de 3-etil-
pent-3-en-1-ol (VI) (23 g) y nitrito de amilo (22,4 g)
en ácido acético glacial (46 ml) a 0° (baño de hielo
y sal). Una vez concluida la adición del ácido se agitó
la mezcla a esta temperatura durante 30 minutos, se en-
25 frió después en un baño de acetona-dióxido de carbono
durante 15 minutos cuando se formó una pasta blanca. Se

separó por filtración, el sólido, se lavó con agua y metanol frío y se recrystalizó en benceno obteniéndose el nitrosocloruro (V) (13 g, rendimiento 36%) en forma de cristales incoloros, punto de fusión 110°.

5

Ejemplo 4

Clorhidrato de 3-amino-3-etil-1-hidroxi-pentan-2-ona-oxima (IV) ($R=CH_2OH; R^1=R^2=Et$).

10 Se colocó en un matraz de tres bocas de fondo redondo 3-cloro-3-etil-2-nitroso-pentan-1-ol (V) (10 g) y se trató con una solución saturada de amoníaco en metanol. Se tapó el matraz, asegurándose cada tapón con alambre de cobre, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. Se obtuvo una solución amarilla
15 transparente. El disolvente se eliminó en vacío a temperatura ambiente y el aceite amarillo obtenido se trituró con benceno caliente y se decantó el benceno. El residuo se disolvió en etanol y el cloruro amónico insoluble presente se separó por filtración. Se eliminó el etanol en vacío a temperatura ambiente y el aceite amarillo
20 residual se trató con acetona caliente obteniéndose un sólido blanco que se separó por filtración, se lavó con acetona y se recrystalizó en 2-butanol obteniéndose el clorhidrato de cetoxima (IV) (5 g; rendimiento 46%) en
25 forma de agujas incoloras, Punto de fusión 182-184°.

Ejemplo 5

2-Amino-4-hidroxi-5-(1,1-dietil-3-hidroxi-2-hidroxiimino-propilamino)-5-nitropirimidina (II) (R=CH₂OH; R¹=R²=Et)

5 Se trató una suspensión de 2-amino-4-cloro-6-hidroxi-5-nitropirimidina (III) (Hal=Cl) (2,6 g) en etanol seco (50 ml), con clorhidrato de 3-amino-3-etil-1-hidroxi-pentan-2-ona oxima (IV) (2,66 g) y trietilamina seca (2,89 g), y la mezcla se calentó a reflujo durante 8 horas. Se filtró la solución y el filtrado se evaporó a sequedad en vacío a temperatura ambiente. El aceite amarillo obtenido se trató con agua fría y el sólido amarillo que precipitó se separó por filtración y se lavó con agua. Por recristalización en agua en presencia de carbón vegetal se obtuvo la nitropirimidina oxima (II) (1,3 g; 15 rendimiento 30%) en forma de un sólido blanco fino, punto de fusión > 250° (se descompone).

Ejemplo 6

20 2-Amino-4-hidroxi-6-hidroximetil-7,7-dietil-7,8-dihidrop-teridina (I)

(R=CH₂OH; R¹=R²=Et)

25 Se añadió ditionito sódico en porciones a una solución caliente de 2-amino-4-hidroxi-6-(1,1-dietil-3-hidroxi-2-hidroxiiminopropilamino)-5-nitropirimidina (II) (450 mg) en hidróxido sódico 0,1N hasta que el color cam-

bió del rojo al amarillo muy pálido. No se obtuvo un producto sólido ni enfriando ni ajustando el pH. Al objeto de separar el producto del material inorgánico, la solución se evaporó y se extrajo el producto con etanol, y se separó por filtración el material inorgánico. Se repitió esta extracción y los extractos reunidos se evaporaron a sequedad en vacío. El residuo se disolvió en la cantidad mínima de agua y se colocó en una columna resina de cambio iónico Amberlita (C.G. 50) (2,5 x 28 cm). La elución con agua proporcionó dos bandas fluorescentes principales. La evaporación de la solución que contenía la primera banda proporcionó el derivado 6-carboxaldehído del compuesto del título (10 mg, rendimiento 3%) en forma de polvo de color anaranjado brillante, mientras que la segunda banda proporcionó la 7,8-dihidropteridina (I) (160 mg, rendimiento 44,5%) en forma de polvo de color amarillo brillante, punto de fusión $>300^{\circ}$ (descompone)

Ejemplo B: Preparación de 2-amino-4-hidroxi-5-hidroximetil-7-espirociclohexil-7,8-dihidropteridina (I)
(R = CH₂OH; R¹R²=espirociclohexilo).

Ejemplo 1
Ciclohexiliden-acetato de etilo (VII) (R¹R²=espirociclohexilo).

5 Se añadió benceno secado con sodio (200 ml) a un matraz que contenía hidruro de sodio (16 g) y el matraz se llenó de nitrógeno exento de oxígeno. A esta mezcla se añadió, durante 1 hora, un ligero exceso de fosfoacetato de trietilo (VIII) (Alc=Et) (154,3 g) manteniendo la temperatura en 0°. La mezcla de reacción se agitó durante una hora más a 0° y después se trató con ciclohexanona (IX) (R^1R^2 =espirociclohexilo) (65,4 g) a la misma temperatura.

10 Después que se concluyó la adición de la ciclohexanona a (~40 min) la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, haciéndose difícil la agitación después de este tiempo debido a un precipitado gomoso de fosfato de dietilo y sodio.

15 La mezcla se calentó después a 60-65° durante 15 minutos durante cuyo tiempo se agitó sin dificultad. La mezcla se enfrió a 15° y la solución bencénica se decantó y se lavó el sólido con benceno. Las aguas madres y los lavados reunidos se evaporaron, obteniéndose un
20 aceite amarillo pálido que por destilación proporcionó ciclohexiliden-acetato de etilo (VII) (62 g; rendimiento 55,4%) en forma de un aceite incoloro, punto de ebullición 86-88°/2 mm de Hg.

25 Ejemplo 2(a)

2-Ciclohexiliden-etanol (VI) (R^1R^2 =espirociclohexilo)

Una solución al 70% (en benceno) de dihidrobise-
toximetoxi aluminato de sodio (100 g) se añadió en porcio-
nes a ciclohexiliden-acetato de etilo (VII) (58,8 g) en
éter seco (300 ml) a 0°. La mezcla de reacción se agitó
5 durante 6 horas a temperatura ambiente y se destruyó el
exceso de agente reductor mediante la adición de agua.
El aluminato sódico sólido se separó por filtración y el
filtrado se extrajo con acetato de etilo (4 x 50 ml).
10 Los extractos reunidos se lavaron con solución saturada
de sal, se secaron sobre sulfato sódico y se evaporó el
disolvente en vacío. Se obtuvo un aceite amarillo pálido
que por destilación dió el 2-ciclohexiliden-etanol (VI)
(31 g; rendimiento 70%) en forma de aceite incoloro, pun-
15 to de ebullición 80°/ 2mm Hg.

Ejemplo 2(b)

2-Ciclohexiliden-etanol (VI) (R^1R^2 =espirociclohexilo)

Se enfrió a 0° una solución de ciclohexiliden-
20 acetato de etilo (VII) (60 g) en éter anhidro (300 ml)
y se trató en porciones con una suspensión de hidruro
de litio y aluminio (15 g) en éter seco (150 ml), mante-
niéndose la temperatura por debajo de 5° durante la adi-
ción. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos
25 a esta temperatura y durante 20 minutos más a temperatu-

ra ambiente. El hidruro en exceso fué destruido con solución saturada de sulfato sódico y la solución etérea se trató como anteriormente proporcionando el alcohol (VI) (23 g; rendimiento 51%) en forma de aceite incoloro.

5

Ejemplo 3.

3-Cloro-2-nitroso-3-espirociclohexilpropan-1-ol (V)

(R=CH₂OH; R¹R²=espirociclohexilo).

Se disolvió 2-ciclohexiliden-etanol (VI) (23 g),
10 en ácido acético glacial (76 ml). Se añadió nitrito de amilo (21,5 g) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo y sal. La solución enfriada se trató gota a gota con ácido clorhídrico concentrado frío (23 ml), con agitación. Después de completada la adición del ácido se agitó la
15 mezcla de reacción a la misma temperatura durante 30 minutos, seguido de enfriamiento en un baño de acetona-dióxido de carbono durante 10 minutos. El sólido de color ante se separó por filtración, se lavó con metanol frío y se recristalizó en acetona, obteniéndose el nitrosocloruro (V) (15 g; rendimiento 45%) en forma de agujas incoloras, punto de fusión 130°.

20

Ejemplo 4

Clorhidrato de 3-Amino-1-hidroxi-3-espirociclohexilpropan-2-ona-oxima (IV) (R=CH₂OH; R¹R²=espirociclohexilo)

25

Se añadió una solución de metanol saturado con amoníaco a 3-cloro-2-nitroso-3-espirociclohexilpropan-1-ol (V) (14,5 g) en un matraz tapado firmemente sujeto y la mezcla se agitó durante tres días a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a reflujo entonces durante 1,5 horas en atmósfera de amoníaco, se enfrió y se filtró. Se eliminó el disolvente y el aceite amarillo residual se lavó con benceno caliente y se decantó. El sólido se recrystalizó en etanol obteniéndose el clorhidrato de la oxima (IV) (7,8 g; rendimiento 50%) en forma de cristales incoloros, Punto de fusión, 197°.

Ejemplo 5

2-Amino-4-hidroxi-6-(3-hidroxi-2-hidroxiimino-1-espirociclohexilpropilamino)-5-nitropirimidina (II)
(R=CH₂OH; R¹R²=espirociclohexilo)

Se trató una suspensión de 2-amino-4-cloro-6-hidroxi-5-nitropirimidina (III) (Hal=Cl) (2,3 g) en etanol seco, con clorhidrato de 3-amino-1-hidroxi-3-espirociclohexilpropan-2-ona-oxima (IV) (2,5 g) y trietilamina anhidra (2,7 g) y la mezcla se calentó a reflujo durante 7 horas. La mezcla de reacción se filtró y el sólido se lavó con etanol caliente. Se eliminó el disolvente desde el filtrado y el aceite amarillo resultante se trituró con agua fría obteniéndose un sólido amarillo que por

recristalización en agua, en presencia de carbón vegetal, proporcionó la nitropirimidina (II) (1,85 g; rendimiento 47,4%) en forma de polvo de color blancuzco, punto de fusión $> 300^{\circ}$ (se descompone).

5

Ejemplo 6

2-Amino-4-hidroxi-6-hidroximetil-7-espirociclohexil-7,8-dihidropteridina (I) ($R=CH_2OH$; R^1R^2 =espirociclohexilo).

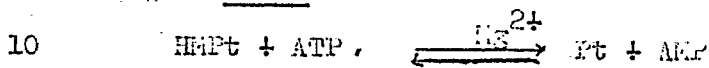
Se disolvió 2-amino-4-hidroxi-6-(3-hidroxi-2-
10 hidroxiiimino-1-espirociclohexilpropilamino)-5-nitropiri-
midina (II) (500 mg), en la mínima cantidad de hidróxido
sódico 0,1 M, calentando sobre un baño de agua. Se aña-
dió dititionito sódico en porciones hasta que se obtuvo
una solución casi incolora. Al enfriar se separó la dihi-
15 dropteridina que, se separó por filtración y se purificó
disolviéndola en HCl 2M, y se volvió a precipitar median-
te la adición de amoníaco de 0,88 hasta pH 8. Por reposo
se obtuvo la dihidropteridina (I) (150 mg; rendimiento
38%) en forma de sólido cristalino de color amarillo pá-
20 lido, punto de fusión > 300 (se descompone).

Ejemplo C

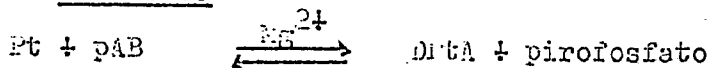
Los antagonistas pteridínicos potenciales de
fórmula (I) pueden ensayarse investigando el efecto inhi-
25 bitorio que ejercen sobre las enzimas responsables de la

5 biosíntesis del ácido dihidropterico (DHPA), a saber la hidroximetildihidropteridina-pirofosfoquinasa (HMPPS), y la dihidropteroato-sintetasa, denominada más adelante en esta Memoria 'sintetasa'. En las ecuaciones de reacción siguientes, se denominan a los compuestos mediante sus formas abreviadas indicadas en la página de la Memoria Descriptiva.

1. HMPPS



2. Sintetasa



(a) Se desarrolló un ensayo para la HMPPS en el que pudo comprobarse la transferencia del fosfato terminal de ATP- γ - P^{32} a la Pt, y relacionarse con la cantidad de inhibición de la HMPPS por el compuesto en ensayo.

15

El compuesto de fórmula (I) en ensayo se incorporó a diversas formulaciones que comprendían metabolitos y enzimas contenidos en tubos de ensayo, según se indica en la TABLA I.

20

Los componentes de la mezcla eran los siguientes:

- I- 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetil-7,8-dihidropteridina (HMpt) en una concentración de 800 μM , es decir, micromolar;
- II- una fuente de HMPPS obtenida de un extracto de E.coli y separado de la 'sintetasa' sobre Sephadex G-100

25

(Marca Registrada), conforme al método de Richey y Brown en J. Biol. Chem. 244, 1582-1592 (1969)

III- 3 mM ATP- γ - 32 P.

IV- 0,10 M ATP neutralizado (sin marcar).

5 V- 0,02 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

VI- 0,1 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

VII- Fuente de HMPFS y 'sintetasa'

VIII- El compuesto en ensayo a una concentración de $0,93 \times 10^{-3}$ M

10 IX- 0,4 mM de pAB- C^{14} .

Como se muestra en la TABLA 1, los tubos 1 a 9 contenían una fuente de HMPFS, ATP marcado y 0,02 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, los tubos 2 a 9 contenían adicionalmente HMPt y los tubos 4 a 9 contenían además el compuesto en ensayo. Los tubos testigo 10 a 12 incluían una fuente de HMPFS y sintetasa, ATP sin marcar, 0,1M de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y pAB marcado.

Los tubos 1 a 9 que contenían las cantidades de componentes indicadas en la Tabla, se llenaron hasta 200 μ l con agua destilada, se incubaron durante 60 minutos a 37°C y después se enfriaron en hielo. Se añadieron a la solución dextrosa (20 μ l que contenían 72,1 mg/ml) y he-
20 xoquinasa (5 μ l que contenían 2000 unidades/ml), y la solución se dejó en reposo a temperatura ambiente duran-
25 te 15 minutos. Se añadió a cada tubo 'Darco-G-60' (Marca

Registrada) (10 mg) y los contenidos se mezclaron periódicamente durante 10 minutos. Se separó el carbón vegetal a través de un filtro 'Millipore AP 250 2200' (Marca Registrada) y el filtro se lavó con tres porciones de 10 ml de agua fría. El carbón vegetal y el filtro fueron recontados radioactivamente.

El recuento radioactivo de los contenidos de los tubos 2 y 3 se tomó como el recuento máximo, ya que estos tubos no contenían compuesto en ensayo y por tanto daban 0% de inhibición enzimática. El tanto por ciento de inhibición producido por los contenidos de los tubos restantes pudo ser calculado entonces relacionando su recuento radioactivo con el máximo, determinado anteriormente.

Los contenidos de los tubos 10 a 12 fueron analizados cromatográficamente como se describe en la parte (b), y se usaron como testigos, y a los tubos 10 y 11 que no contenía compuesto en ensayo (y por consiguiente daban 0% de inhibición) se les dió el valor 100%. El tanto por ciento de inhibición exhibido por los contenidos de los tubos en la parte (b) del experimento pudo calcularse entonces con relación a éste, comparando los cromatogramas respectivos.

(b) Se determinó la actividad del compuesto en ensayo de fórmula (I) frente a 'sintetasa' de la manera siguiente,

comprobando la formación de dihidropterato C^{14} .

5 Se preparó un baño de Pt a partir de ATP neu-
tralizado (50 μ l, 0,1M), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (50 μ l, 0,1M), ditio-
treita (100 μ l, 0,1M), tampón tris (100 μ l, 0,4M, pH 8,3),
10 HMPT (25 μ l, 876 μ M) y 170 μ l de una solución que conte-
nía HMPPS. La mezcla se incubó durante 60 minutos a 37°C,
se enfrió brevemente en hielo y después se añadieron a
la solución, a temperatura ambiente, dextrosa (100 μ l que
contenían 72,1 mg/ml) y hexoquinasa (20 μ l que contenían
2000 unidades/ml), dejando en reposo la solución a tal
temperatura durante 15 minutos.

15 Se preparó una solución de $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ (10 μ l,
0,1M), pAB- C^{14} (10 μ l, 0,4 mM), ditiotreita (20 μ l, 0,1M)
y tampón tris (20 μ l, 0,4M, pH 8,3), en cada uno de cin-
co tubos de ensayo y después se añadieron a cada uno 80 μ l
de los contenidos del depósito, junto con sintetasa y/o
compuesto en ensayo de fórmula (I), como se indica en la
Tabla 2. La solución se completó después hasta 200 μ l con
agua destilada.

20 Se prepararon dos tubos de ensayo testigos, con-
teniendo cada uno de ellos ATP (10 μ l, 0,1M), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
(10 μ l, 0,1M), ditiotreita (20 μ l, 0,1M) tampón tris
(20 μ l, 0,4M, pH 8,3), pAB- C^{14} (10 μ l, 0,4 mM), y 20 μ l
de una solución que contenía HMPPS y 'sintetasa' de activi-
25 dad conocida. El compuesto en ensayo se añadió al segundo

de estos dos tubos hasta una concentración final de 10^{-5} M, y ambos tubos se completaron con agua destilada hasta 200 μ l.

5 Los siete tubos se incubaron después durante 30 minutos a 37°C, se enfriaron en hielo y entonces éstos, junto con los tubos testigo 10 a 12 de la parte (a), se analizaron cromatográficamente del siguiente modo.

10 Se colocaron en forma de mancha 100 μ l de los contenidos de cada uno de los tubos sobre papel para cromatografía Whatman Nº 3MM (2 x 20 cm) en el origen, efectuándose la cromatografía descendente en un tampón de Sörensen de fosfatos de sodio y potasio (0,1M, pH 7,0) con un recorrido de 10 a 15 cm. De las posiciones relativas de las manchas obtenidas de los contenidos de los diferentes tubos, pudieron evaluarse los diversos porcentajes de inhibición de sintetasa por referencia a los tubos testigo 10 y 11, que dieron 0,5 de inhibición.

15 Los compuestos que como resultado de estos ensayos se encontró proporcionaban 50,5 de inhibición a una concentración de 100 μ M o menos, son aquéllos que ejercen un efecto de potenciación útil, y a reserva de que su toxicidad sea favorable, pueden incluirse en las composiciones descritas en esta Memoria Descriptiva.

25 se encontró que la 2-amino-4-hidroxi-6-hidroxi-metil-7,7-dietil-7,8-dihidropteridina proporcionaba una

inhibición del 50% a una concentración de 2,1 µM.

Ejemplo D

5 En este experimento se determinaron datos de la zona inhibidora para evaluar la actividad sinérgica de 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetil-7,7-dietil-7,8-dihidropteridina o su combinación con trimetoprim (TMP) y/o sulfametoxazol (SMX) contra Staphylococcus aureus.

10 La pteridina se incluyó en un medio de peptona y soja de bajo contenido de timidina (ágar de ensayo de Sensibilidad Wellcotest) contenido en una placa de Petri y se añadió el otro u otros componentes a la cavidad que resultó de la separación de una pequeña porción del medio. La superficie del medio se inoculó con el organismo de ensayo y después se incubó. La cantidad de zona de inhibición se muestra en la Tabla 3, en la que los números representen la zona de inhibición completa (es decir el número de centímetros desde el borde de la cavidad después de 6 aumentos aproximadamente) y las cifras entre paréntesis incluyen las zonas de inhibición parcial.

15

20

Los resultados muestran que la pteridina exhibe sinergismo con TMP y SMX solos y sinergismo múltiple con ambos frente al Staphylococcus aureus.

25

Ejemplo E

Formulación de tabletas

- Compuestos de fórmula (I) ($R=CH_2OH$; $R^1=R^2=Et$)
- | | |
|--------|--------|
| (puro) | 100 mg |
|--------|--------|
- 5 Trimetoprim (puro) 25 mg
- | | |
|-------------------------|--------|
| Sulfaguanidina (B.P.C.) | 100 mg |
|-------------------------|--------|
- + almidón de maíz, lactosa, gelatina
talco y estearato de magnesio
- 10 Preparación - Se mezclaron los constituyentes anteriores
utilizando métodos conocidos de farmacia, para formar
una granulación que después se comprimó en tabletas.

Ejemplo F

15 Formulación de Tabletetas

- | | |
|-------------------------------------|-------|
| "Fyremethimine" (Pirimetamina) B.P. | 15 mg |
|-------------------------------------|-------|
- Compuesto de fórmula (I)
($R=CH_2OH$; $R^1=R^2=Et$) (puro) 150 mg
- 20 que después se preparó para formar una tableta como en
el Ejemplo E.

Ejemplo G

Formulación de Tabletetas

- | | |
|----------------------|--------|
| Sulfanilamida B.P.C. | 150 mg |
|----------------------|--------|
- 25 Compuesto de fórmula (I)
($R=CH_2OH$; $R^1=R^2=Et$) (puro) 175 mg

que después se preparó para formar una tableta como en el Ejemplo E.

Ejemplo H

5 Formulación de cápsulas

Trimetoprim (puro)	20 mg
Compuesto de fórmula (I) (R=CH ₂ OH; R ¹ =R ² =Et) (puro)	100 mg

Preparación:

10 Los compuestos, en forma granular, se mezclaron junto con lactosa, almidón de maíz y estearato de magnesio. El polvo se llenó en una cápsula de gelatina de pared dura, de dos piezas, utilizando una máquina de encapsular.

15

Ejemplo I

Solución de irrigación

Compuesto de fórmula (I) (R=CH ₂ OH; R ¹ =R ² =Et) (puro)	1 mg/ml
20 Trimetoprim (puro)	0,2 mg/ml
Disolvente	agua

Ejemplo J

Solución de irrigación

25 Compuesto de fórmula (I) (R=CH ₂ OH; R ¹ =R ² =Et) (puro)	2 mg/ml
α-amino-p-toluen-sulfonamida (pura)	2 mg/ml

Ejemplo K

Solución

	Compuesto de fórmula (I) (R=CH ₂ OH; R ¹ =R ² =Et) (puro)	1,5 mg/ml
5	Diaveridina B.Vet.C.	0,5 mg/ml
	Kelfizina	1,0 mg/ml
	Disolvente	Agua

Ejemplo L

10 Formulación de tabletas

	Compuesto de fórmula (I) (R=CH ₂ OH; R ¹ =R ² =Et) (puro)	500 mg
	Celulosa microcristalina	100 mg
	Almidón	40 mg
15	Estearato de magnesio	10 mg
	Metilhidroxietilcelulosa	<u>3 ml</u>
		653 mg

20 La pteridina (I), la celulosa microcristalina y el almidón se granularon con una solución de la metilhidroxietilcelulosa en alcohol etílico acuoso de 50%. Se añadió el estearato de magnesio a los gránulos desecados y se comprimió el total.

TABELA 1.

Tubo No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII Final	IX
1	-	100 μ l	15 μ l	-	10 μ l	-	-	-	-
2	5 μ l	"	"	-	"	-	-	-	-
3	"	"	"	-	"	-	-	-	-
4	"	"	"	-	"	-	-	2,5x10 ⁻⁶ M	-
5	"	"	"	-	"	-	-	"	-
6	"	"	"	-	"	-	-	1,0x10 ⁻⁵ M	-
7	"	"	"	-	"	-	-	"	-
8	"	"	"	-	"	-	-	9,3x10 ⁻⁵ M	-
9	"	"	"	-	"	-	-	"	-
Testigos									
10	-	-	-	10 μ l	-	10 μ l	20 μ l	-	10 μ l
11	5 μ l	-	-	"	-	"	"	-	"
12	"	-	-	"	-	"	"	1,0x10 ⁻⁵ M	"

TABLA 2

Tubo No.	Sintetasa en exceso	Concentración final del compuesto. en ensayo
1	-	-
2	+	$8,7 \times 10^{-5}M$
3	+	$1,0 \times 10^{-5}M$
4	+	$2,5 \times 10^{-6}M$
5	+	
Testigos		
6	-	$1,0 \times 10^{-5}M$
7	-	

TABLA 3

Staphylococcus aureus

Medicamento ($\mu E/ml$)	TMP (30)	SMX (300)	TMP + SMX (5)	SMX (100)
----------------------------	----------	-----------	---------------	-----------

R = CH₂OH 12,5(17,0) 12,5(17,0) 12,5 (17,0)

R¹=R² = Et

(30)

" 10,5(13,0) 10,5(14,0) 11,0(14,5)

(10)

" 8,5(10,5) 6,5(12,5) 10,5(12,5)

(3)

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Gran Bretaña, el 1 de Agosto de 1972, bajo el Nº 35814/72, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

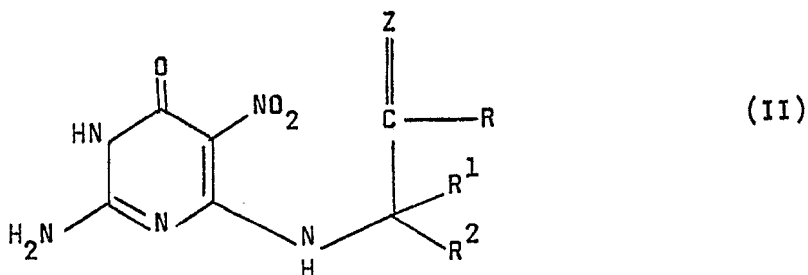
- REIVINDICACIONES -

10

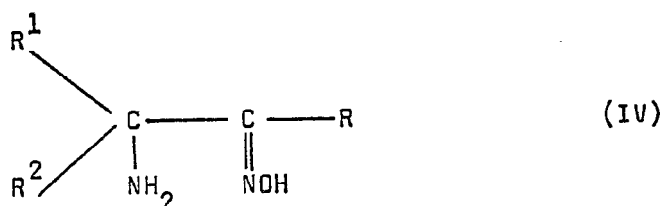
Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

15
20 1a.- Un método de preparar derivados de pirimidina de fórmula (II)

25



en la que R es un grupo alcoholo inferior, sustituido facultativamente con un grupo hidroxilo, R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno es un grupo alcoholo inferior teniendo en conjunto por lo menos 3 átomos de carbono o R¹ y R², junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un sistema de anillo espirocicloalcoholo que tiene de 4 a 6 átomos de carbono, y Z es un grupo oxima, caracterizado porque se hace reaccionar un compuesto de fórmula (IV) o una de sus sales



en la que R, R¹ y R² son como se han definido antes, con una 2-amino-4-halógeno-6-hidroxi-5-nitropirimidina.

2a.- Un método según la reivindicación 1a, caracterizado porque se hace reaccionar un compuesto de fórmula (IV) o una de sus sales, como se ha definido en la reivindicación 1a, con una 2-amino-4-halógeno-6-hidroxi-5-nitropirimidina.

3a.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1a y 2a, caracterizado porque la sal es el clorhidrato.

5 4a.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1a a 3a, caracterizado porque el derivado de pirimidina es 2-amino-4-cloro-6-hidroxi-5-nitropirimidina.

10 5a.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1a a 4a, caracterizado porque la reacción se lleva a cabo en presencia de un agente de fijación de ácido.

6a.- Un método según la reivindicación 5a, caracterizado porque el agente de fijación es una amina terciaria.

15 7a.- Un método según la reivindicación 6a, caracterizado porque la amina es trietilamina.

8a.- Un método de preparar derivados de pirimidina.

20 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

25

5.11.75

Esta Memoria consta de cincuenta y dos
hojas escritas a máquina por una sola cara.

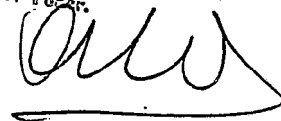
5

Madrid,

15 NOV. 1975

P.A.

Oscar de Elzaburu
For Peder.



10

15

20

25

5.11.75

EAS.-