

20 SET. 1978

ES

10

NUMERO

467.300

10 A1

FECHA DE PRESENTACION

24-2-1978



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

*(Handwritten signature)*

467300

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
771.778 53905/77	24-2-1977 24-12-1977	EE.UU. Gran Bretaña

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07F/A61K	

54 TITULO DE LA INVENCION

"UN METODO DE PREPARACION DE UN DERIVADO DE 9-HIDROXIETOXI-METILGUANINA"

71 SOLICITANTE (S)

THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED (Case B 291)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

183-193 Euston Road, Londres N.W.1., Inglaterra

72 INVENTOR (ES)

Howard John Schaeffer

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-68.260)

jga.

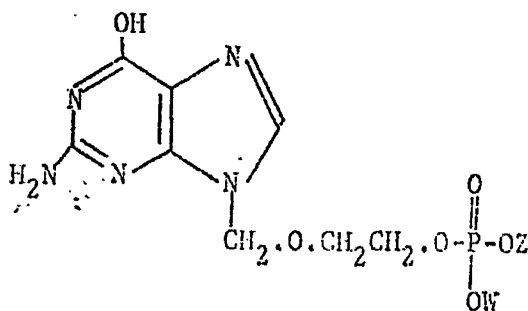
POOR  
QUALITY

1            Esta invención se refiere a monofosfato de 9-(2-  
-hidroxietoximetil)guanina, en particular a sales farma-  
cúticamente aceptables del mismo. La invención se refiere  
también a métodos de preparación de este compuesto y sus  
5 sales, y también a composiciones farmacéuticas que los con-  
tienen.

Se sabe que los derivados 2-hidroxietoximetilados  
en la posición 9 de las purinas tienen actividad antiviral  
contra diversas clases de virus de DNA y RNA tanto en ex-  
10 perimentos in vitro como in vivo, véase la patente españo-  
la nº 440.631. En particular, estos compuestos son activos  
como agentes antivirales contra el virus de la vacuna, y  
los virus de los herpes, con inclusión del herpes simplex,  
el herpes zóster y la varicela en los mamíferos, los cuales  
15 virus causan enfermedades tales como la queratitis herpéti-  
ca en los conejos y la encefalitis herpética en los rato-  
nes.

Se ha encontrado ahora que el éster monofosfato  
de 9-(2-hidroxietoximetil)guanina no sólo es tan activo  
20 como el compuesto no fosforilado, sino que también tiene  
la ventaja selectiva de una solubilidad mucho mayor al me-  
nos a un pH comprendido entre 1 y 7,5 en comparación con  
el correspondiente compuesto sin fosforilar.

De acuerdo con la presente invención, se propor-  
25 ciona un derivado de 9-hidroxietoximetil-guanina de fórmu-  
la (I):



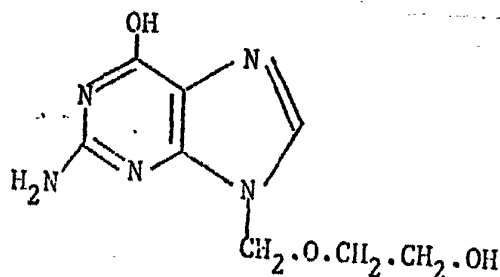
1 donde  $W$  y  $Z$  son iguales o diferentes y cada uno de ellos  
representa un átomo de hidrógeno o un catión farmacéutica-  
mente aceptable.

5 El catión farmacéuticamente aceptable puede se-  
leccionarse a partir de un grupo que comprende sodio, pota-  
sio, litio, calcio/2, magnesio/2, aluminio/3, o amonio. Se  
prefieren los compuestos de fórmula (I) en la que  $Z$  es so-  
dio, potasio o amonio y  $W$  es hidrógeno, y son particularmen-  
te preferidos los compuestos de fórmula (I) en la que  $Z$  es  
10 sodio o amonio y  $W$  es hidrógeno.

En la definición anterior de  $W$  y  $Z$ , los cationes  
polivalentes se expresan como calcio/2, magnesio/2 y alu-  
minio/3, con lo que se intenta significar el catión dividi-  
do por su valencia, esto es,  $Ca^{++}/2$ ,  $Mg^{++}/2$  y  $Al^{+++}/3$ . Es  
15 to debe entenderse con el significado de que los cationes  
calcio o magnesio están en asociación iónica con dos oxíge-  
nos de fosfato, y el aluminio con tres.

En un segundo aspecto de la presente invención,  
se proporciona un método de preparación de un compuesto de  
20 fórmula (I), como se define arriba, caracterizado por el  
hecho de que:

un compuesto de fórmula (II)



se hace reaccionar con un agente de fosforilación para pro-  
ducir un compuesto de fórmula (I) en la que tanto  $W$  como  $Z$

30

1 -son átomos de hidrógeno; y opcionalmente se convierte un  
compuesto de fórmula (I) en la que W y Z son ambos hidróge  
no en un compuesto en el que uno cualquiera o ambos de W y  
Z es (son) un catión farmacéuticamente aceptable, por reac-  
5 ción con una base o una sal que contiene el catión deseado.

En el método se prefieren para la fosforilación  
derivados de ácido fosfórico que tienen uno a tres grupos  
hidroxi reemplazados por átomos de halógeno, p.ej. cloro,  
tales como oxiclورو de fósforo. Hasta dos de los grupos  
10 hidroxi pueden sustituirse también para formar grupos alco  
xi que opcionalmente llevan sustituciones adicionales para  
formar por ejemplo grupos benciloxi. Tales derivados fosfo  
halogenados o fosfatos se aplican en las condiciones usua  
les neutras o alcalinas, requiriendo los últimos preferi  
15 blemente activación, por ejemplo por carbodiimida, p.ej.  
diciclohexilcarbodiimida excepto cuando aquéllos se presen  
tan en la forma del anhídrido.

En los casos en que al menos dos de los grupos hi  
droxi en el derivado de ácido fosfórico están reemplazados  
20 por halógeno, entonces después de la reacción con el com  
puesto de fórmula (II) es necesario separar los halógenos  
libres por una hidrólisis acuosa moderadamente suave, uti  
lizando por ejemplo un equivalente molar de agua en un di  
solvente miscible con el agua tal como un alcohol.

25 Los grupos alcoxi sustituidos o insustituidos in  
troducidos con un fosfato pueden hidrolizarse en un medio  
acuoso adecuado en presencia de bases en una etapa subsi  
guiente. Los grupos alcoxi sustituidos aromáticamente ta  
les como benciloxi pueden someterse también a hidrogenoli  
30 sis, preferiblemente en presencia de un catalizador, de

1 -acuerdo con las técnicas usuales de desdoblamiento reductor.

Un método preferido de fosforilación de los compuestos intermedios de esta invención implica la reacción de un compuesto de fórmula (II), como se ha definido arriba, con oxiclорuro de fósforo en presencia de un fosfato de trialcoholo y preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 0°C o menos.

Otros métodos útiles para preparar el monofosfato incluyen la reacción de un compuesto de fórmula (II) con oxiclорuro de fósforo en piridina seca.

El compuesto de fórmula (II) puede considerarse como intermedio en la síntesis de compuestos de fórmula (I) y se puede preparar de acuerdo con los métodos descritos en la patente española nº 440.631.

Las sales farmacéuticamente aceptables de fosfato de 9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina pueden prepararse por neutralización del monofosfato en su forma ácida con una cantidad equivalente (esto es, equinormal) de una base tal como un hidróxido, bicarbonato, o carbonato que contiene el catión deseado, esto es, sodio, potasio, amonio, calcio, litio, magnesio o aluminio. Alternativamente, aquéllos se pueden preparar por reacciones de intercambio por las que una sal del monofosfato se trata con una solución, preferiblemente acuosa, de una sal que contiene el catión deseado. Por ejemplo, la sal de bario ligeramente soluble del monofosfato de 9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina se trata en suspensión acuosa con sulfato de sodio para separar el bario en forma del sulfato de bario muy insoluble, dejando en solución monofosfato de 9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina y sodio.

1            En otro aspecto de la invención, se proporciona  
una composición farmacéutica que comprende un compuesto de  
fórmula (I) como se ha definido anteriormente en esta memo-  
ria junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para  
5            el mismo.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables son ma-  
teriales útiles para el fin de administrar la composición,  
y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos, los  
cuales son por lo demás inertes y médicamente aceptables,  
10           y son compatibles con el ingrediente activo. Estas composi-  
ciones farmacéuticas pueden administrarse oralmente, paren-  
teralmente, utilizarse como un supositorio o pesario, apli-  
carse tópicamente como un unguento, crema, aerosol, o pol-  
vo, o aplicarse como gotas oftálmicas o nasales, dependien-  
15           do de si la preparación se utiliza para tratar infecciones  
virales internas o externas.

Para infecciones internas, los compuestos de fór-  
mula (I) se administran a niveles de dosis de 0,1 a 250 mg  
por kg, calculados como la forma de fosfato libre, preferi-  
20           blemente de 1,0 a 50 mg por kg de peso corporal del manife-  
ro, y se utilizan en el hombre, en una forma de dosifica-  
ción unitaria, administrada por ejemplo unas cuantas veces  
al día, como una o más dosis unitarias, en una cantidad de  
1 a 800 mg por dosis unitaria, preferiblemente de 1 a 250  
25           mg por dosis unitaria, y lo más preferiblemente de 10 a  
200 mg por dosis unitaria.

Para administración parenteral, o administración  
tópica en forma de gotas, p. ej. para infecciones oculares,  
los compuestos de la fórmula (I) se pueden presentar en so-  
luciones acuosas en una concentración comprendida entre  
30

1 -aproximadamente 0,1 y 10% peso/volumen, preferiblemente 0,1  
a 7%, y lo más preferiblemente 0,2 a 5% peso/volumen.

5 Alternativamente, para infecciones de los ojos o  
de otro tejido externo, p. ej. la boca y la piel, se pre-  
fieren formulaciones en solución, unguento o formulaciones  
tópicas de cremas. Pueden utilizarse concentraciones com-  
prendidas entre aproximadamente 0,1 y 10%, preferiblemente  
entre 0,3 y 6%, y lo más preferiblemente de 3%.

10 En otro aspecto adicional de la invención, se  
proporciona un método de tratamiento de las infecciones vi-  
rales en los mamíferos que comprende la administración de  
una cantidad antiviral efectiva y no tóxica de un compues-  
to de fórmula (I) como se ha definido anteriormente. Tal  
como se utiliza en esta memoria, el término "cantidad anti-  
15 viral efectiva y no tóxica" tiene por objeto significar  
una cantidad antiviral predeterminada suficiente para ser  
efectiva contra el virus in vivo.

La invención se ilustrará ahora con referencia a  
los Ejemplos siguientes.

20 EJEMPLO 1

Monofosfato de 9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina

Se añadió oxiclорuro de fósforo (0,76 ml) a una  
mezcla agitada y enfriada (-10°C) de 9-(2-hidroxi-etoxime-  
25 til)guanina (0,225 g) y fosfato de trietilo (5 ml). Se de-  
jó que la temperatura de la mezcla de reacción se elevase  
a 0°C en 30 minutos, y se mantuvo a esta temperatura duran-  
te 2 horas. Se vertió después sobre una mezcla de hielo y  
agua, y el pH se ajustó a 7 con hidróxido de potasio 2N.

30 La solución resultante se extrajo dos veces con cloroformo

1 -y una vez con éter. El pH de la solución acuosa restante  
se ajustó a 7,1 con hidróxido de potasio 2N y se liofilizó  
después. El sólido blanco resultante se disolvió en agua  
(7 ml), y se añadió metanol (7 ml) para precipitar las sa-  
5 les inorgánicas, las cuales se separaron luego por filtra-  
ción. Se añadió acetona al filtrado, precipitando una goma  
blanca. La goma se disolvió en agua (7 ml), se añadió eta-  
nol (7 ml) y se filtró la mezcla. Se añadió un gran exceso  
de acetona (70 ml), precipitando de nuevo la goma. Se di-  
10 solvió la goma en etanol (aproximadamente 20 ml) y se sepa-  
ró el disolvente por evaporación instantánea, dando un pol-  
vo blanco (2,6 g) que era una mezcla de sales inorgánicas  
y el fosfato deseado. El sólido se disolvió en agua (10  
ml), se aplicó a una columna de Bio-Gel P-2 (74-37 micras,  
15 2,7 x 90 cm) y se eluyó con agua. Se eluyó la mayor parte  
del monofosfato en un volumen de 50 ml después que se hu-  
bieron recogido 166 ml del producto de elución, como se  
muestra por cromatografía en capa delgada sobre celulosa  
Eastman Chromatogram <sup>®</sup> en n-propanol:agua (70:30 vol/vol);  
20 Rf = 0,26 para fosfato de 9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina y  
Rf = 0,11 para fosfato de 9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina y  
potasio. Se liofilizó el producto de elución para dar 0,28  
g de un sólido que, según se demostró por espectroscopía  
ultravioleta, contenía 0,2 g de producto monofosfato.

25

EJEMPLO 2

Monofosfato de 9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina y  
amonio

30

Se disolvió fosfato de 9-(2-hidroxi-etoximetil)-  
guanina (0,28 g) en agua (30 ml) y el pH de la solución se

1 -ajustó a 6 con ácido clorhídrico 6N. Se adsorbió el produc  
to sobre 14 ml de carbón vegetal compactado (Fischer 5-690B,  
de 297-74 micras, lavado a los ácidos y desactivado con to  
lúeno). El carbón vegetal se lavó bien con agua y se eluyó  
5 con 70 ml de etanol acuoso al 50% que contenía 2% de hidró  
xido de amonio concentrado. Se evaporó el disolvente a pre  
sión reducida para dar monofosfato de 9-(2-hidroxi-etoxime-  
til)guanina y amonio (0,048 g); Rf = 0,30 sobre celulosa  
Eastman en n-propanol:agua (70:30 vol/vol).

10

EJEMPLO 3 - Tableta

Fosfato de 9-(2-hidroxi-etoxime- til)guanina y sodio	100 mg
Lactosa	200 mg
Almidón	50 mg
Polivinilpirrolidona	5 mg
Estearato de magnesio	4 mg
Peso total	<u>359 mg</u>

15

EJEMPLO 4 - Solución Oftálmica

20

Fosfato de 9-(2-hidroxi-etoxime- til)guanina y sodio	1,0 g
Cloruro de sodio, reactivo analítico	0,9 g
Trimerosal	0,001 g
Agua purificada, cantidad suficien- te para	100 ml
pH ajustado a	5,5-7,5

25

EJEMPLO 5 - Solución Inyectable

30

Fosfato de 9-(2-hidroxi-etoxime-  
til)guanina y amonio

12058

1                    guanina y sodio                    0,775 g  
Tampón de fosfato de pH 7, estéril  
y exento de pirógenos, cantidad  
suficiente para                    25 ml

5

EJEMPLO 6Fosfato de 9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina y diso-  
dio

10                    Se añadió oxiclورو de fósforo (54 ml) en el  
transcurso de un período de 3 horas a una mezcla agitada y  
enfriada (-30° a -20°) de 9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina  
(25 g) y fosfato de trietilo (250 ml). Se dejó que la tem-  
peratura de la mezcla de reacción se elevase a 0°C en el  
15                    transcurso de 45 minutos y se mantuvo a dicha temperatura  
durante 45 minutos más. Se vertió luego en una mezcla de  
hielo y agua, y el pH se ajustó a aproximadamente 1 con hi-  
dróxido de sodio 2N. La solución resultante se extrajo una  
vez con cloroformo y una vez con éter. El pH de la solución  
acuosa remanente se ajustó a 6,8 con hidróxido de sodio 2N  
20                    y subsiguientemente a 7,3 con hidróxido de sodio 10N, dan-  
do un volumen final de 2,5 litros.

25                    La solución neutralizada se aplicó a una columna  
que contenía 2000 g de Dowex 1 x 8 que se había equilibra-  
do con 50 mM de  $\text{KHCO}_3$ . La elución se efectuó con un gra-  
diente lineal de 30 litros de 50-500 mM de  $\text{KHCO}_3$  seguido  
por un lavado con 30 litros de 500 mM de  $\text{KHCO}_3$ . Las frac-  
ciones que contenían el producto se combinaron y la mayor  
parte del  $\text{KHCO}_3$  se separó por adición de Dowex 50- $\text{H}^+$  y se-  
paración de  $\text{CO}_2$  a vacío. El volumen se redujo a 2 litros  
30                    en vacío y el producto se precipitó a 4°C por adición de

1 -10 litros de acetona. El precipitado seco, 55 g, se aplicó  
 a una columna de Bio-Gel P-2 de 10 x 110 cm y se eluyó con  
 agua. Se obtuvieron 22 g del sólido. El material se recris-  
 talizó a 4°C en forma de la hidrogeno-sal a partir de una  
 5 solución en agua de pH 3 y se obtuvo más material a partir  
 de las aguas madres por cristalización en etanol al 20% a  
 pH 3. La hidrogeno-sal se disolvió en un volumen mínimo de  
 agua, se llevó a pH 8,5 con NaOH y se precipitó con dos  
 volúmenes de etanol a 4°C. Este precipitado se disolvió en  
 10 100 ml de agua y se precipitó con 9 volúmenes de etanol a  
 4°C para dar 15,1 g de sal disódica dihidratada del mono-  
 fosfato de 9-(2-hidroxi-etoximetil)-guanina.

La pureza se confirmó por análisis elemental, cro-  
 matografía en fase líquida a alta presión y espectros ul-  
 15 travioleta.

Fórmula empírica:  $C_8H_{12}N_5O_6P \cdot 2Na \cdot 2H_2O$

Teoría: C 24,94%; H 3,66%; N 18,19%; P 8,04%

Encontrado: C 25,20%; H 3,63%; N 18,10%; P 7,89%.

Espectros ultravioleta:

20 <u>Disolvente</u>	<u><math>\lambda</math> máxima</u>	<u><math>\epsilon</math></u>	<u><math>\lambda</math> mínima</u>	<u>inflexión</u>
HCl 0,1M	254	12970	225	272
pH 7	299	14060	219	266
NaOH 0,1M	255-264	11760	228	

Pureza por cromatografía en fase líquida a alta  
 25 presión = 99%

Relación base/fosfato = 1,00/1,01

30

12058

1

## - REIVINDICACIONES -

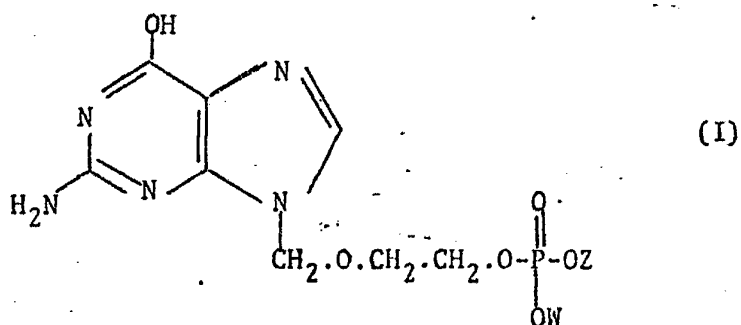
5

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:

10

1ª.- Un método de preparación de un derivado de 9-hidroxi-etoximetil-guanina de fórmula (I)

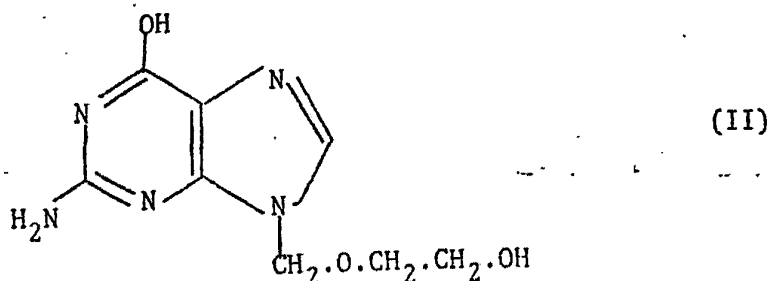
15



20

donde W y Z son iguales o diferentes y cada uno de ellos representa un átomo de hidrógeno o un catión farmacéuticamente aceptable, caracterizado por el hecho de que: un compuesto de fórmula (II)

25



30

se hace reaccionar con un agente de fosforilación para producir un compuesto de fórmula (I) en el que tanto W como Z son átomos de hidrógeno; y opcionalmente se convierte un

1 -compuesto de fórmula (I) en la que W y Z son ambos hidróge-  
no en un compuesto en el que uno cualquiera de los dos o  
ambos, W y Z, es (son) un catión farmacéuticamente acepta-  
ble, por reacción con una base o una sal que contiene el  
5 catión deseado.

2ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación  
1ª en el que el agente de fosforilación es un derivado de  
ácido fosfórico.

3ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación  
10 2ª en el que el derivado de ácido fosfórico tiene de uno a  
tres grupos hidroxil reemplazados por átomos de halógeno.

4ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación  
3ª en el que el derivado de ácido fosfórico es oxiclóru-  
ro de fósforo.

5ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación  
15 2ª en el que hasta dos grupos hidroxil del ácido fosfórico  
se sustituyen para formar grupos alcoxi, que opcionalmente  
llevan sustituciones adicionales.

6ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación  
20 4ª en el que el compuesto de fórmula (II) se hace reaccio-  
nar con oxiclóru-  
ro de fósforo en presencia de un fosfato  
de trialcoholo a una temperatura de 0°C o inferior.

7ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación  
4ª en el que el compuesto de la fórmula (II) se hace reac-  
25 cionar con oxiclóru-  
ro de fósforo en piridina seca.

8ª.- Un método de acuerdo con cualquiera de las  
reivindicaciones 1ª a 7ª en el que la base, con la cual se  
hace reaccionar un compuesto de fórmula (I) en la que W y  
Z son ambos hidrógeno, es un hidróxido, bicarbonato o car-  
30 bonato que contiene el catión farmacéuticamente aceptable

1 -deseado.

9ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 8ª en el que el catión deseado es sodio, potasio, amonio, calcio, litio, magnesio o aluminio.

5 10ª.- Un método de preparación de un derivado de 9-hidroxietoximetilguanina.

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

10 Esta Memoria consta de trece hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 31.MAY 1978

P.A.

15 **Alberto de Elizaburu**  
Por Poder,



20

25