



ESPAÑA

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

484167

ES	11) NUMERO	10) AI
	21)	
	22) FECHA DE PRESENTACION	
	14-9-79	

PATENTE DE INVENCION

40) PRIORIDADES: 21) NUMERO	22) FECHA	23) PAIS
942.802	15-9-78	EE. UU.
Int. Cl: C07D 473/26 // A61K 31/52		

47) FECHA DE PUBLICIDAD	51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	53) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07D 473/00 // A61K 31/52	

54) TITULO DE LA INVENCION

"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR 9-(HIDROXIALCOHIL)-PURINAS"

71) SOLICITANTE (S) (Docket (Newport 10-SP))

1) NEWPORT PHARMACEUTICALS INTERNATIONAL, INC y
2) SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

1) 1590 Monrovia Boulevard, Newport Beach, California y 2) 1275 York Avenue, Nueva York Nueva York, (Estados Unidos de América)

72) INVENTOR (ES)

LIONEL NORTON SIMON y JOHN WINTHROP HADDEN

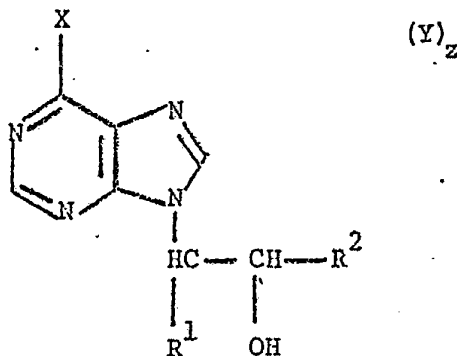
73) TITULAR (ES)

74) REPRESENTANTE

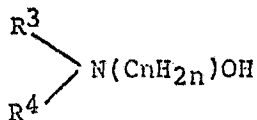
DON ALBERTO DE ELZABURRI MARQUEZ (P.- 72.655)

POOR QUALITY

El presente invento está basado en el descubrimiento de que compuestos de la fórmula



en donde X es OH, NH₂, SH, OR ó SR en donde R es alcoholo de 1 a 4 átomos de carbono o bencilo, R¹ es H ó alcoholo de 1 a 8 átomos de carbono, R² es H o metilo, Y es la sal de una amina de la fórmula



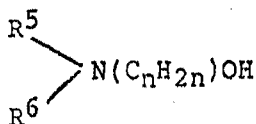
en donde R³ y R⁴ son alcoholo inferior, por ejemplo de 1 a 4 átomos de carbono, y n es un número entero de 2 a 4 con ácido para-acetamido-benzoico y en donde z es un número de 0 a 10, son útiles como inmunomoduladores, como agentes antiviricos y en casos específicos tienen actividad antitumoral. Los compuestos y las composiciones en donde z es 1 a 10 son nuevos de por sí.

Quando R² es H, la presencia de Y acrecienta la

actividad inmunorreguladora y la actividad antivírica. Si X es NH_2 hay actividad inmunoinhibidora pero no actividad inmunoestimuladora (inmunopotenciadora).

La actividad inmunorreguladora aparece como acrecentada al aumentar la longitud de cadena para R^1 , al menos desde metilo hasta hexilo. Preferiblemente R^1 es n-alcoholo, es decir metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-amilo, n-hexilo, n-heptilo ó n-octilo. R^2 es preferiblemente metilo. R puede ser metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, isopropilo, etc. Cuando X es NH_2 el compuesto puede estar presente como la base libre o como la sal con un ácido no tóxico, es decir un ácido farmacéuticamente aceptable, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, ácido acético, ácido propiónico, ácido para-tolueno-sulfónico, ácido metano-sulfónico, ácido maleico, ácido succínico, ácido malónico, ácido adípico.

Una clase preferida de aminas para formar la sal con ácido para-acetamidobenzoico tiene la fórmula



en donde R^5 y R^6 son alcoholos inferior, por ejemplo metilo, etilo, propilo, isopropilo o butilo y n es un número entero de 2 a 4. Ejemplos típicos de dichas aminas incluyen di-

5 metilaminoetanol, dimetilaminoisopropanol, dietilaminoetanol, dietilaminoisobutanol, dietilaminoisopropanol, metil-

etilaminoetanol, diisobutilamino-N-butanol, dimetilamino-

propanol, dimetilamino-N-butanol, diisobutilaminoetanol, di-

metilaminobutanol, dibutilamino-N-butanol, dibutilaminoeta-

10 nol, dipropilaminoetanol y diisopropilaminoetanol. La amina actualmente preferida es dimetilaminoisopropanol. Cuando Y está presente, es decir z es 1 a 10, preferiblemente z es 3. No obstante, z puede ser también 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10.

Si bien se utilizan preferiblemente los compues-

15 tos en donde Y es la sal de la amina $\begin{matrix} R^3 \\ \diagdown \\ N(C_nH_{2n})OH \\ \diagup \\ R^4 \end{matrix}$ con ácido para-acetamidobenzoico, se pueden utilizar también sales de la fórmula Y^1 en donde la amina es como se acaba de definir, el ácido es un ácido farmacéuticamente

20 aceptable distinto de ácido para-acetamidobenzoico, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido propiónico, ácido malónico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido tartá-

25 rico, ácido para-tolueno-sulfónico, ácido adípico, ácido maleico, ácido succínico, ácido metano-sulfónico, ácido salicílico y ácido acetilsalicílico.

5 Para describir los compuestos siguientes, cuando Y está presente, la abreviatura DIP·PACBA representa para-acetamidobenzoato de dimetilamino-2-propanol. A menos que un número entre paréntesis, por ejemplo (10), siga a esta abreviatura, Y es 3. Si un número entre paréntesis sigue a la abreviatura DIP·PACBA, allí el número indica el número de moles de grupos Y presentes por 1 mol de la 9-(hidroxialcohol)-purina.

10 En la tabla 1 siguiente se considera que los compuestos son puros excepto el compuesto 15.443, que se cree que también contiene una sal además del compuesto del invento.

15 Un inmunomodulador es un compuesto que regula la respuesta de inmunidad. Así, cubre tanto la inmunestimulación (inmunopotenciación) como la inmunoinhibición. Desde luego, la inmunestimulación es útil para formar inmunidad. La inmunoinhibición tiene también utilidad en un cierto número de sectores. Por ejemplo, es útil en trasplantes de órganos, por ejemplo trasplantes de riñón o de corazón, para evitar rechazo de órganos.

20 En las tablas que muestran las propiedades inmunopotenciadoras de los compuestos, un más (+) o un menos (-) indican propiedades inmunestimuladoras o inmunoinhibidoras, respectivamente. El número 0 indica que el compuesto
25 no tenía ni actividad inmunopotenciadora ni actividad in-

munoinhibidora.

En algunas de las tablas se incluyen varios compuestos en donde X no está dentro de lo reivindicado. Estos compuestos no reivindicados tienen por regla general actividades relativamente bajas y se incluyen para ilustrar el hecho de que el grupo X puede tener un efecto significativo sobre las propiedades de los compuestos.

Un mitógeno es una sustancia que induce la proliferación de células, que ocurre durante la inmunización.

La tabla 1 (excluyendo los compuestos 15.427 y 15.423) muestra compuestos útiles en el invento.

Los métodos de síntesis A hasta L mencionados en la tabla 1 se describen subsiguientemente con más detalle.

Las composiciones del invento son útiles para tratar a mamíferos (y células de mamíferos) incluyendo a seres humanos, cerdos, perros, gatos, reses de ganado vacuno, caballos, corderos, cabras, ratones, conejos, ratas, cobayas, hamsters, monos, etc.

A menos que se indique otra cosa, todas las partes y porcentajes están en peso.

Todas las temperaturas están en grados centígrados a menos que se indique otra cosa.

Las composiciones pueden comprender, consistir esencialmente o consistir exclusivamente en los materiales expuestos, y los procedimientos pueden comprender, consis-

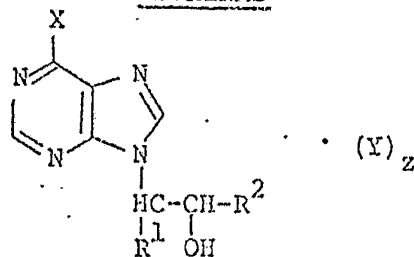
tir esencialmente o consistir exclusivamente en las etapas expuestas con dichos materiales.

5 Las composiciones pueden ser administradas a los mamíferos por técnicas convencionales, por ejemplo por vía oral, nasal, rectal, vaginal, enteral o parenteral. Pueden ser empleadas como soluciones inyectables, por ejemplo en agua, o como tabletas, píldoras, cápsulas, etc.

10

TABLA 1
RESUMEN DE PROPIEDADES QUIMICAS DE 9--(HIDROXIALCOHIL)-

--PURINAS



No.	Compuesto				Método de síntesis
	R ¹	R ²	X	Y	
15425	H	H	OH	-	D
15428	H	H	OH	DIP·PACBA	L
15435	H	H	SH	-	C
15437	H	H	SH	DIP·PACBA	L
15446	H	CH ₃	OH	-	A
15447	H	CH ₃	OH	DIP·PACBA	L
15431	H	CH ₃	NH ₂	-	B
15432	H	CH ₃	NH ₂	DIP·PACBA	L
15427	CH ₃	H	I	-	E
15423	CH ₃	H	Cl	-	F
15433	CH ₃	H	NH ₂	-	G
15434	CH ₃	H	NH ₂	DIP·PACBA	L
15443	CH ₃	H	OH	-	H
15444	CH ₃	H	OH	DIP·PACBA	L
15417	C ₆ H ₁₃	H	OH	-	I
15418	C ₆ H ₁₃	H	OH	DIP·PACBA	L
15392	C ₆ H ₁₃	CH ₃	OH	-	J
15410	C ₆ H ₁₃	CH ₃	OH	DIP·PACBA	L
15426	C ₆ H ₁₃	CH ₃	NH ₂	HCl Salt	K

No.	Espectros de UV		Análisis elemental					
	P.f. °C	λ_{Max}	λ_{Min}	Con ₃ 10 ⁻³	pH	C	H	N
15425	274°	250	222,5	11,93	7			
		250	219	11,0	1			
		254	221,5	12,53	10			
15428								
15435	278-80	323	251	23,0	7			
		323	252	19,9	1			
		323	251	19,9	10			
15437								
15446	244-5	250	223,5	11,0	7			
		250	220	10,6	1			
		254	223,5	12,1	10			
15447								
15431	198°	261	228	15,8	7	Cal 49,73	5,74	36,25
		259	231	15,4	1	Enc 49,56	5,62	36,22
		261	225	15,7	10			
15432								
15427	178°	276	237	10,9	7	Cal 31,60	2,98	18,43
		276	237	10,9	1	Enc 31,53	2,96	18,18
		276	237	10,9	10			
15423	200-204	265	228	9,1	7	Cal 45,20	4,26	26,36
		265	228	9,1	1	Enc 45,11	4,27	26,25
		265	228	9,1	10			
15433	215-16	261,5	228	13,56	7			
		259	231	13,26	1			
		261	224,5	13,80	10			
15434								
15443	198-199	250	223	7,52	7			
		250	218	6,91	1			
		255	225,5	7,91	10			
15444								
15417	226°C	250	224	11,09	7	Cal 59,07	7,65	21,16
		250	220	10,37	1	Enc 59,01	7,55	21,24
		255	223	11,96	10			
15418								
15392	202°C	250	224	12,1	7	Cal 60,41	7,97	20,13
		248	222	13,3	1	Enc 60,47	7,86	20,08
		254	220	14,1	10			
15410								
15426	176-9°C	261	230	9,77	7	Cal 53,58	7,71	22,32
		259	233	9,60	1	Enc 53,56	7,67	22,34
		251	235	9,77	10			

Otros compuestos dentro del invento se exponen en la tabla 1 a, siguiente en donde la fórmula básica es la misma que en la tabla 1. En las tablas 1 y la, los grupos alcohol para R^1 son todos ellos n-alcoholo.

TABLA 1 a

COMPUESTO

R^1	R^2	X	Y
C_6H_{13}	CH_3	OH	DIP·PACBA(10)
C_6H_{13}	CH_3	OH	DIP·PACBA(1)
H	CH_3	OH	DIP·PACBA(10)
H	CH_3	OH	DIP·PACBA(1)
CH_3	CH_3	OH	-
CH_3	CH_3	OH	DIP·PACBA
C_2H_5	H	OH	DIP·PACBA
C_2H_5	H	OH	-
C_3H_7	H	OH	-
C_3H_7	H	OH	DIP·PACBA
C_2H_5	CH_3	OH	-
C_2H_5	CH_3	OH	DIP·PACBA
C_2H_7	CH_3	OH	-
C_3H_7	CH_3	OH	DIP·PACBA
C_4H_9	H	OH	-
C_4H_9	H	OH	DIP·PACBA
C_4H_9	CH_3	OH	-
C_4H_9	CH_3	OH	DIP·PACBA

TABLA 1 a (cont.)

<u>COMPUESTO</u>		X	Y
R ¹	R ²		
C ₅ H ₁₁	H	OH	-
C ₅ H ₁₁	H	OH	DIP·PACBA
C ₅ H ₁₁	CH ₃	OH	DIP·PACBA
C ₅ H ₁₁	CH ₃	OH	-
C ₇ H ₁₅	H	OH	-
C ₇ H ₁₅	H	OH	DIP·PACBA
C ₇ H ₁₅	CH ₃	OH	-
C ₇ H ₁₅	CH ₃	OH	DIP·PACBA
C ₈ H ₁₇	H	OH	-
C ₈ H ₁₇	H	OH	DIP·PACBA
C ₈ H ₁₇	CH ₃	OH	-
C ₈ H ₁₇	CH ₃	OH	DIP·PACBA
C ₆ H ₁₃	CH ₃	OCH ₃	-
C ₆ H ₁₃	CH ₃	OCH ₃	DIP·PACBA
C ₆ H ₁₃	H	OCH ₃	DIP·PACBA
C ₆ H ₁₃	H	OCH ₃	-
CH ₃	H	OCH ₃	-
CH ₃	H	OCH ₃	DIP·PACBA
H	H	OCH ₃	-
H	H	OCH ₃	DIP·PACBA
H	CH ₃	OCH ₃	DIP·PACBA
H	CH ₃	OCH ₃	-

TABLA 1 a (cont.)

COMPUESTO

R ¹	R ²	X	Y
C ₆ H ₁₃	CH ₃	OC ₂ H ₅	-
C ₆ H ₁₃	CH ₃	OC ₂ H ₅	DIP·PACBA
C ₆ H ₁₃	H	OC ₂ H ₅	DIP·PACBA
C ₆ H ₁₃	H	OC ₂ H ₅	-
C ₆ H ₁₃	CH ₃	OC ₃ H ₇	-
C ₆ H ₁₃	CH ₃	OC ₃ H ₇	DIP·PACBA
CH ₃	H	OC ₃ H ₇	DIP·PACBA
CH ₃	H	OC ₃ H ₇	-
H	H	OC ₃ H ₇	DIP·PACBA
H	CH ₃	OC ₃ H ₇	DIP·PACBA
C ₆ H ₁₃	CH ₃	OC ₄ H ₉	-
C ₆ H ₁₃	CH ₃	OC ₄ H ₉	DIP·PACBA
C ₆ H ₁₃	H	OC ₄ H ₉	-
C ₆ H ₁₃	H	OC ₄ H ₉	DIP·PACBA
H	H	OC ₄ H ₉	-
H	H	OC ₄ H ₉	DIP·PACBA
H	CH ₃	OC ₄ H ₉	-
H	CH ₃	OC ₄ H ₉	DIP·PACBA
CH ₃	CH ₃	OC ₄ H ₉	-
CH ₃	CH ₃	OC ₄ H ₉	DIP·PACBA
CH ₃	H	OC ₄ H ₉	-
CH ₃	H	OC ₄ H ₉	DIP·PACBA

TABLA 1 a (cont.)

<u>COMPUESTO</u>			
R ¹	R ²	X	Y
C ₆ H ₁₃	CH ₃	SCH ₃	-
C ₆ H ₁₃	CH ₃	SCH ₃	DIP·PACBA
C ₆ H ₁₃	H	SCH ₃	-
C ₆ H ₁₃	H	SCH ₃	DIP·PACBA
CH ₃	CH ₃	SCH ₃	-
CH ₃	CH ₃	SCH ₃	DIP·PACBA
CH ₃	H	SCH ₃	-
CH ₃	H	SCH ₃	DIP·PACBA
H	H	SCH ₃	-
H	H	SCH ₃	DIP·PACBA
H	CH ₃	SCH ₃	DIP·PACBA
H	CH ₃	SCH ₃	-
C ₆ H ₁₃	CH ₃	SC ₄ H ₉	-
C ₆ H ₁₃	CH ₃	SC ₄ H ₉	DIP·PACBA
C ₆ H ₁₃	H	SC ₄ H ₉	DIP·PACBA
C ₆ H ₁₃	H	SC ₄ H ₉	-
CH ₃	H	SC ₄ H ₉	-
CH ₃	H	SC ₄ H ₉	DIP·PACBA
H	H	SC ₄ H ₉	-
H	H	SC ₄ H ₉	DIP·PACBA
H	CH ₃	SC ₄ H ₉	DIP·PACBA
H	CH ₃	OH	DIP·PACBA (10)
H	CH ₃	OH	DIP·PACBA (1)

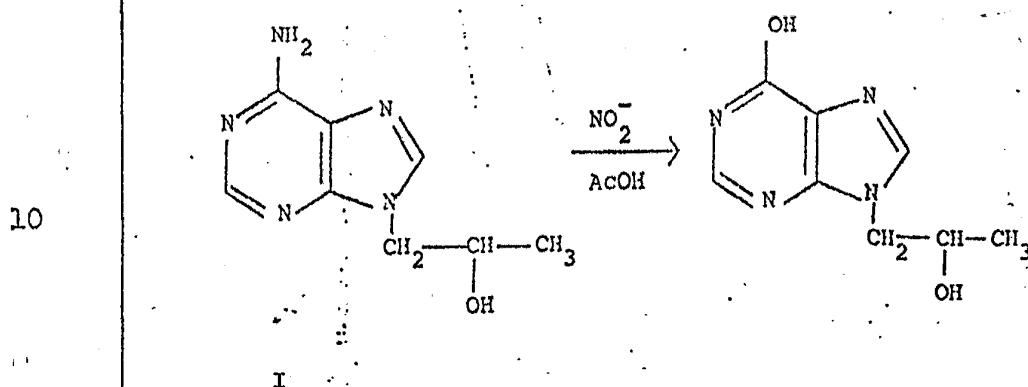
TABLA 1 a (cont.)

COMPUESTO

R^1	R^2	X	Y
C_6H_{13}	H	O-bencil	-
C_6H_{13}	H	O-bencil	DIP·PACBA
C_6H_{13}	CH_3	O-bencil	-
C_6H_{13}	CH_3	O-bencil	DIP·PACBA
C_6H_{13}	CH_3	S-bencil	-
C_6H_{13}	CH_3	S-bencil	DIP·PACBA
C_6H_{13}	H	S-bencil	-
C_6H_{13}	H	S-bencil	DIP·PACBA

Descripción de las formas preferidas de realizaciónMETODO A

5 9-(2-hidroxi-1-propil)-hipoxantina (NPT 15446)



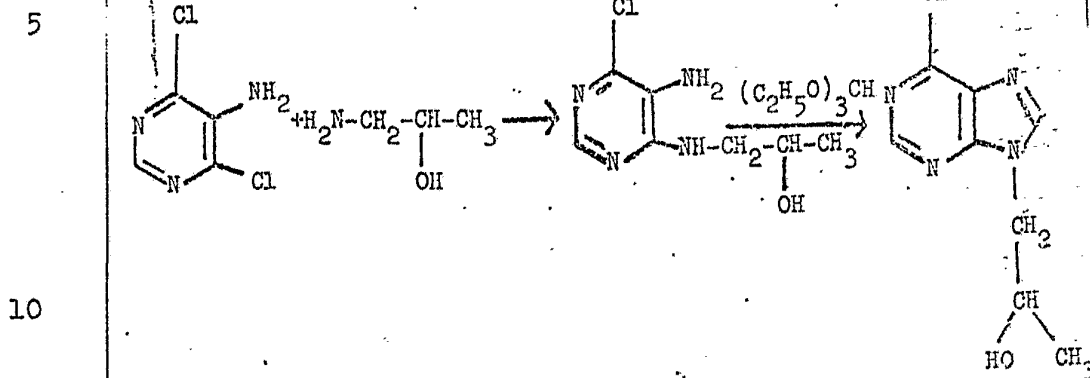
15 Se suspendió 9-(2-hidroxi-1-propil)-adenina (I, 4,0 g, 20,7 milimoles) en ácido acético al 50% (20 ml) y se añadió lentamente nitrito de sodio (4 g, 58 milimoles). La mezcla fué agitada a 25° durante 3 horas. La solución

20 resultante fué evaporada hasta sequedad y se añadió isopropanol; esta operación fué repetida una vez. El residuo sólido fué hervido en isopropanol y filtrado. El filtrado fué evaporado y cristalizado por adición de acetona. Se hizo la recristalización en isopropanol/metanol (98:2); se obtuvo un producto cristalino incoloro. Rendimiento 3,3 g

25 (82%), p.f. 244-250°, uv (H₂O; pH 5,5) λ max 250 nm.

METODO B

9-(2-hidroxi-1-propil)-6-cloropurina



15 Se emplearon los métodos de Schaeffer, H.J. Vogel, D. y Vince, R., J. Med. Chem. 8, 502 (1965); y Schaeffer, H.J. y Vince, R., J. Med. Chem. 10, 689 (1967).

20 Una solución de 5-amino-4,6-dicloropirimidina (I, 20 g, 0,12 moles) en solución etanólica al 11% de isopropanolamina (200 ml) fue puesta a reflujo durante 8 horas. La mezcla de reacción fué evaporada para formar un jarabe, se añadió etanol y se evaporó de nuevo; esta operación fué repetida una vez. El jarabe resultante fué vertido en agua (300 ml) dando una masa cristalina. Esta fué recogida por filtración, lavada con agua y secada para dar

25 19 g de 9-(2-hidroxi-1-propilamino)-5-amino-6-cloropirimi-

dina (II) bruta.

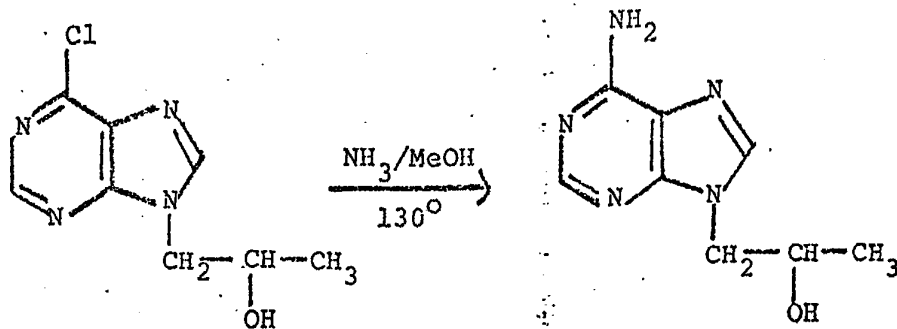
El compuesto II bruto fué suspendido en ortoformiato trietilico (120 ml) al que se añadió ácido etanosulfónico (5 gotas). Después de 15 minutos se disolvieron todos los sólidos y la solución fué mantenida a 25° durante la noche. La evaporación en vacío dió un jarabe espeso que fué sometido a evaporación en alto vacío para eliminar el exceso de isopropanolamina. Después de cristalización en xileno se obtuvieron 5 g de material bruto.

5
10

METODO B

9-(2-hidroxi-1-propil)adenina (NPT 15.431)

15



20

25

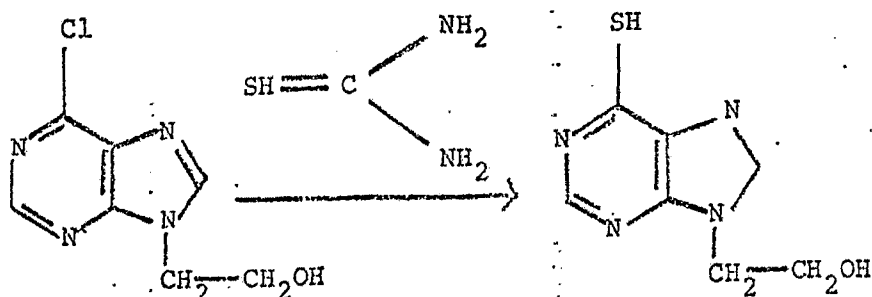
20089

Se disolvió 9-(2-hidroxi-1-propil)-6-cloropurina (I, 9 g., 42,4 milimoles) en amoníaco metanólico saturado y cloruro de amonio (50 mg). La mezcla fué calentada a 130° en un tubo-bomba durante 6 horas. La solución resultante fué evaporada hasta sequedad y recristalizada en etanol/acetona. Rendimiento = 6,68 g de un producto cristalino incoloro (81%) p.f. 193-194° uv (H₂O; pH 5,5) λ_{max} 260 nm CCD en CHCl₃:MeOH (5:1) R_F 0,44.

Anal. Calc. para C₈H₁₁N₅O: C, 49,73; H, 5,74; N, 36,25; Encontrado: C, 49,56, H, 5,62; N, 36,22.

METODO C

9-(1-hidroxielil)-6-mercaptopurina (NPT 15.435)



P-

Se empleó el método de Schaeffer y Bhargava, Biochemistry 4, 71 (1965).

5 Se disolvieron 9-(1-hidroxietil)-6-cloropurina (I, 2 g, 0,01 moles) y tiourea (0,76 g, 0,01 moles) en etanol (15 ml) y se pusieron a reflujo durante 30 minutos. El precipitado resultante fué recogido por filtración y suspendido en agua para formar una suspensión. La neutralización con acetato de sodio dió cristales incoloros. Rendimiento 1,5 g (76%).

10

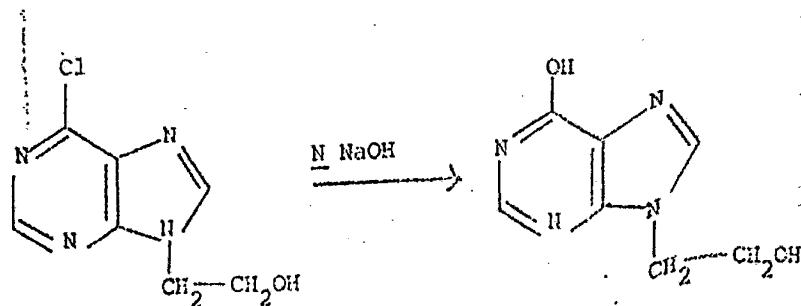
P.f. 278-280°; uv (H₂O, pH 5,5) λ_{\max} 320, 230 nm.

P-

MEECDC D

9-hidroxi-etil-hipoxantina (NPT 15.425)

5



10

Se utilizó el método de Schaeffer, H.J. y Bhargava, P.S., Biochemistry 4, 71 (1965).

15

Se añadió lentamente 6-cloro-9-hidroxi-etil-purina, III (4 g), a NaOH K (30 ml) moderadamente caliente y se puso a reflujo durante 2 horas. La mezcla de reacción es enfriada en hielo y neutralizada con ácido acético glacial. Después de filtración, se eliminan porciones de III no reaccionada. El producto es recristalizado en metanol y lavado con acetona. Cristales incoloros. Rendimiento, 1 g. (28%); p.f. 274^o; uv (H₂O, pH 5,5); λ_{max} 250 nm.

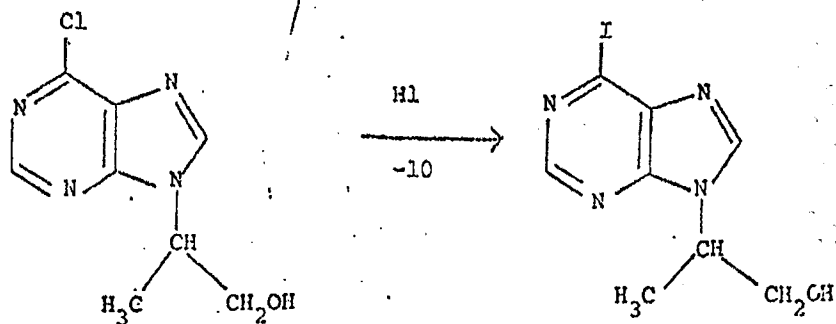
20

25

17089

METODO E

9-(1-hidroxi-2-propil)-6-yodopurina (NPP 15.427)



15

Se añadió 9-(1-hidroxi-2-propil)-6-cloropurina (I, 15 g, 7 milimoles) a ácido yodhídrico (15 ml) a -10° con agitación durante 45 minutos. El precipitado fué filtrado, neutralizado con acetato de sodio anhidro a 5° , y lavado con un poco de agua fría (3 veces). La recristalización en etanol/ H_2O , dió cristales incoloros. Rendimiento = 0,9 g (42%) p.f. = $193-194^{\circ}$ uv λ_{max} 276 nm (H_2O , pH 5,5).

20

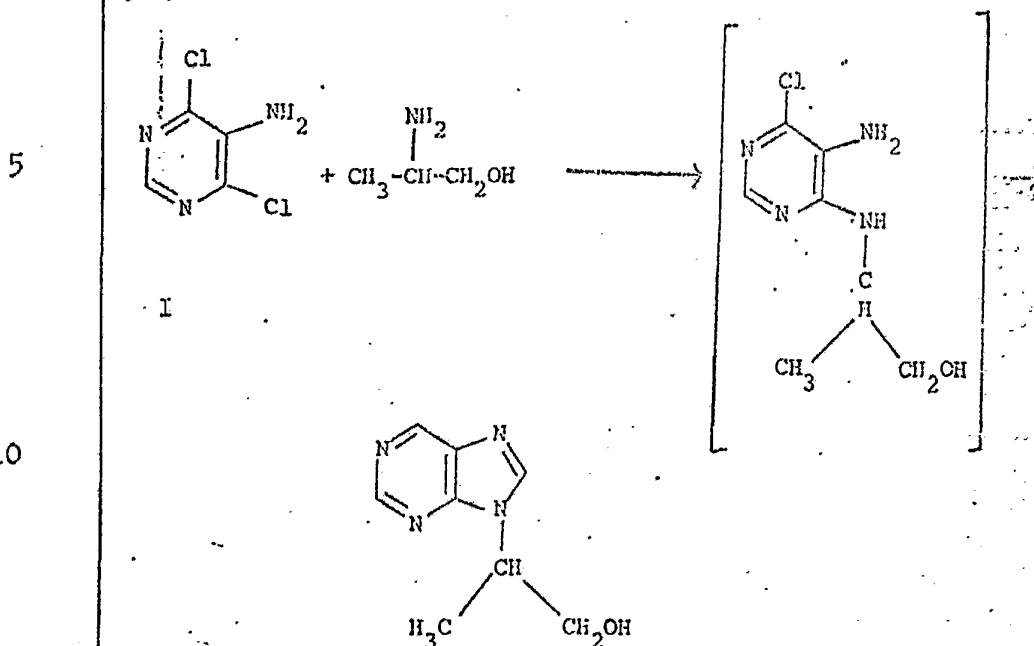
Anal. Calc. para $C_8H_9N_4OI$ Peso molecular = 304,1: C, 31,60; H, 2,98; N, 18,43; I, 41,73. Encontrado: C, 31,53; H, 2,96; N, 18,18; I, 41,70.

25

17089

METODO I

9-(1-hidroxi-2-propano)-6-cloropurina (EPT 15.423)



15 Se utilizó el método de Schaeffer, H.J. y Schwender, C.F., J. Med. Chem. 17, 6 (1974).

Una solución de 5-amino-4,6-dicloropirimidina (I, 6,56 g, 40 milimoles) y 2-amino-1-propanol (II, 3,3 g, 44 milimoles) se puso a reflujo en n-pentanol (288 ml) y ter.-butilamina (96 ml) durante 45 horas bajo atmósfera de N₂. La solución fué evaporada para formar un jarabe y se añadió etanol 4 veces y se evaporó. El jarabe resultante fue suspendido en ortoformiato trietilico (150 ml) y ácido etanosulfónico (10 gotas). La suspensión fué agitada vigorosamente durante la noche, luego evaporada hasta sequedad, se añadió etanol, y esta operación fué repetida tres

20

25

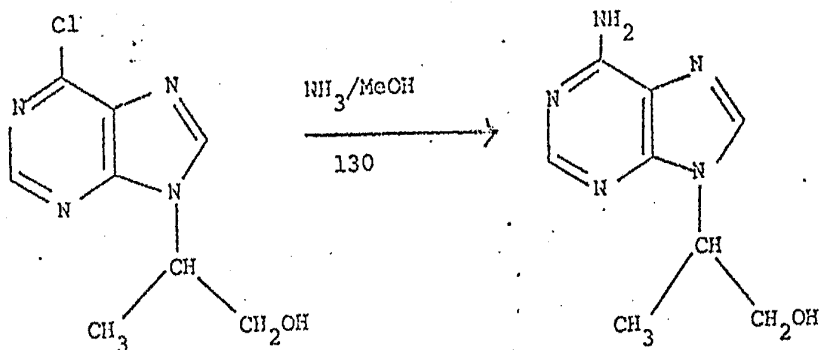
veces. Una cristalización de un producto incoloro se produce durante la evaporación. Los cristales fueron filtrados, y el filtrado fué evaporado, se añadió etanol y esta operación se repitió tres veces para dar un material bruto (3,6 g).

Se recristalizó en etanol acuoso al 98%. λ_{max} uv (H_2O , pH 5,5) λ_{max} 265 nm; p.f. 201-203°; rendimiento 2,79 g. (32%).

Anal. $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_4\text{OCl}$. Calc. C, 45,20; H, 4,26; N, 26,36; Cl, 16,68. Enc.: C, 45,11; H, 4,27; N, 26,25; Cl, 16,71.

MERCDC G

9-(1-hidroxi-2-propil)-adenina (EPT 15.433)



Se utilizó el método de Schaeffer, H. y Schwen-
der, C., J. Pharm. Sci., 60, 1204 (1971). También Schaeffer

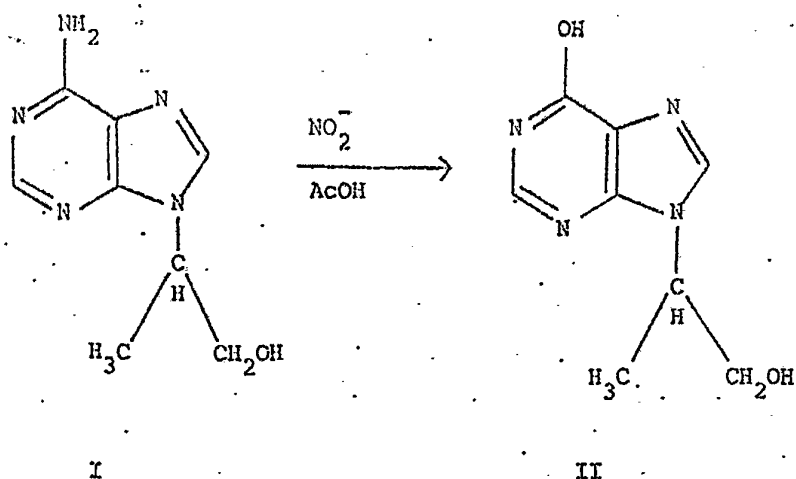
y otros., J. Med. Chem. 15, 456 (1972).

Se suspendió 9-(1-hidroxi-2-propil)-6-cloropurina (I, 2,0 g, 9,4 milimoles) en metanol/amoniaco (30 ml), se añadió cloruro de amonio (50 mg) como un catalizador y se calentó la mezcla a 130° durante 4,5 horas; la solución fué evaporada hasta sequedad. La recristalización en etanol del producto bruto obtenido dió agujas incoloras. Rendimiento 1,15 g (63%) p.f. = 215-216° uv (H₂O, pH 5,5)

λ max 260 nm

METODO H

9-(1-hidroxi-2-propil)-hipoxantina (NPI 15.443)



Se disolvió 9-(1-hidroxi-2-propil)-adenina (I, 4 g, 21 milimoles) en ácido acético al 50% (20 ml), se añadió nitrito de sodio (4 g, 58 milimoles) y la mezcla se agitó a 25°C durante 3½ horas. La solución fué evaporada

dos veces hasta sequedad con isopropanol. El residuo fué recogido en isopropanol y filtrado, el precipitado fué desechado, y el filtrado fué evaporado para formar un gel que solidificó, después de la adición de acetona. Rendimiento = 3,65 g (90%) de cristales incoloros. Se recristalizó en isopropanol/metanol (98:2). p.f. = 202-207°C CD en CHCl_3 : MeOH (5:1) l mancha R_f - 0,30 uv (H_2O , pH 5,5) = λ_{max} 250 nm.

5

10

METODO I

Compuesto NPT 15.417

Se utilizó el método de Schaeffer y otros, Journal of Pharmaceutical Sciences 16:1204-1210, método F.

El producto es el compuesto XL en la tabla III de Schaeffer y otros.

15

METODO J

Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)hipoxantina (NPT 15.392)

Un bosquejo de la sucesión de síntesis para la preparación de eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)hipoxantina (nonilhipoxantina, VIII) se muestra en los esquemas de flujo 1 y 2. Se indican las mejoras con respecto al método de H.J.Schaeffer y C.F. Schwender, J. Med. Chem. 17, 6 (1974) en la sucesión de reacciones que conduce a la eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-6-cloropurina. La última etapa, la hidró-

20

25

lisis del derivado de 6-cloropurina (VII), para rendir nonilhipoxantina (VIII) es una adaptación del método del que informaron A. Giner-Sorolla, C. Gryte, A. Bendich y G.G. Brown, J. Org, Chem. 34, 2157 (1969) para la hidrólisis de halogenopurinas.

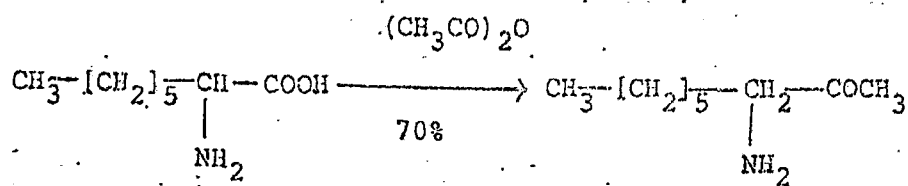
La vía alternativa, es decir la nitrosación de eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-adenina (EHKA) (IX), para rendir nonilhipoxantina (VIII) (mostrado en el esquema de flujo 2) consiste en la previa conversión por amonólisis del derivado clorado (VII) en la aminopurina (IX, EHKA) seguido por su nitrosación para rendir nonilhipoxantina (VIII).

ESQUEMA DE FLUJO 1

Bosquejo de la síntesis de eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-hipoxantina (VIII).

Etapa 1 Acetamidononan-2-ona (II)

Acilación de ácido 2-amino-octanoico



I

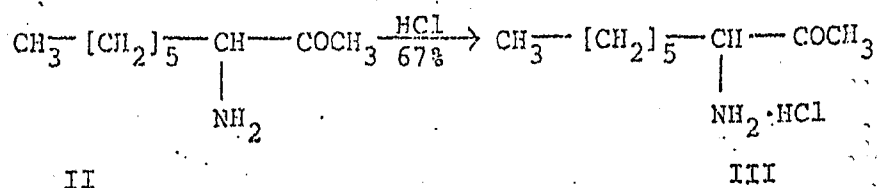
II

25

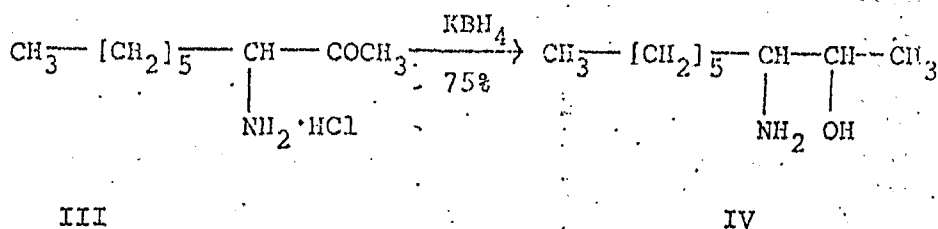
17089

Etapa 2 Clorhidrato de acetamidononan-2-ona (III)

Formación del clorhidrato de acetamidononan-2-ona

Etapa 3 Eritro-3-amino-2-nonanol (IV)

Reducción del clorhidrato de acetamidononan-2-ona

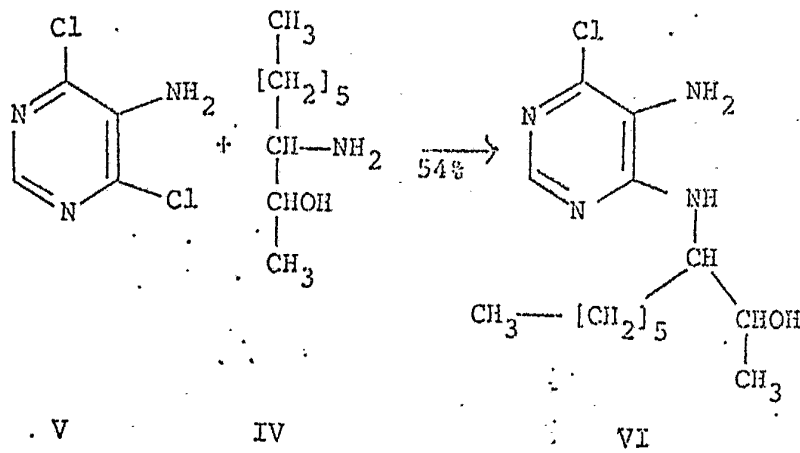


(los datos por debajo de las flechas se refieren a % de rendimiento)

Etapa 4 Eritro-5-amino-4-cloro-6-(2-hidroxi-3-encilamino)pirimidina (VI).

Condensación de eritro-3-amino-2-nonanol con 5-amino-4,6-dicloropirimidina.

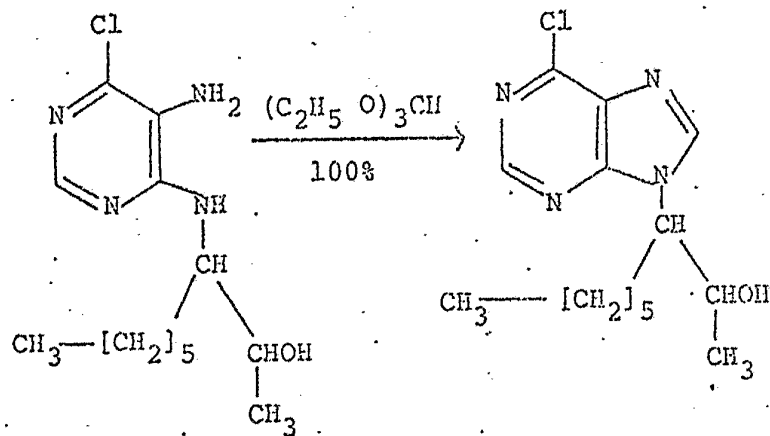
5



10

Etapa 5 Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-6-cloropurina (VII).
 Cierre de anillo de eritro-5-amino-4-cloro-6-(2-hidroxi-3-nonilamino)-pirimidina (V)

15

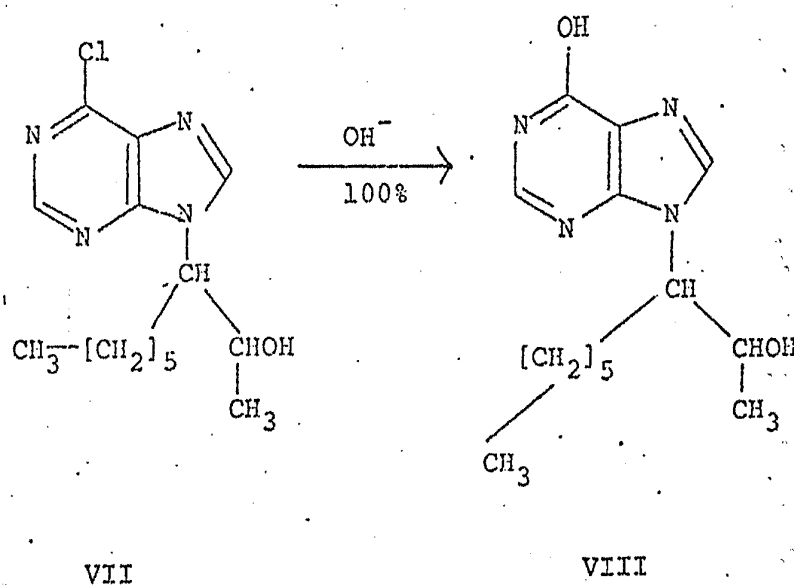


20

25

17089

Etapas 6 Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)hipoxantina (XIII)
(Por hidrólisis del derivado de 6-cloropurina)



15 ESQUEMA DE FLUJO 2

Vía alternativa para la preparación de eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-hipoxantina (VIII)

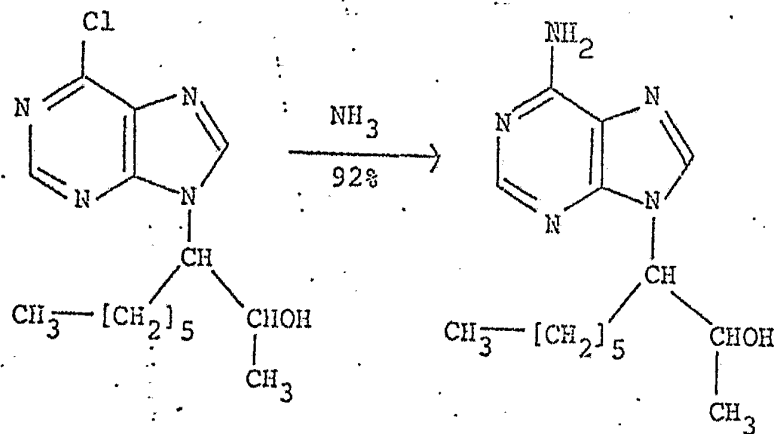
Etapas 1 a. Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina (IX)

Amonólisis de eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-6-cloropurina
(VII)

20

25

5



10

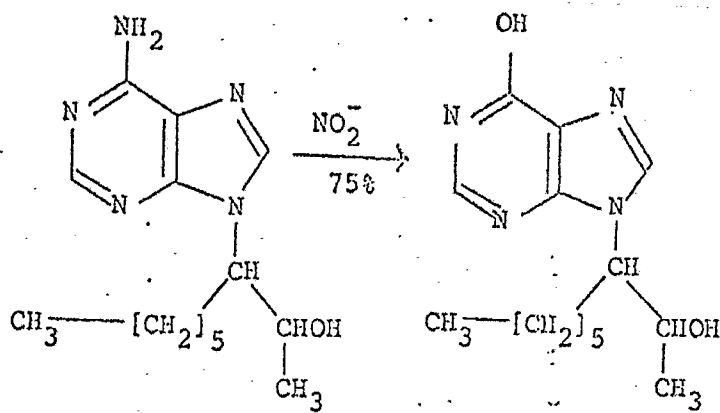
VII.

IX

Etapa 2b. Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)hipoxantina (VIII)

Nitrosación de eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina (IX)

15



20

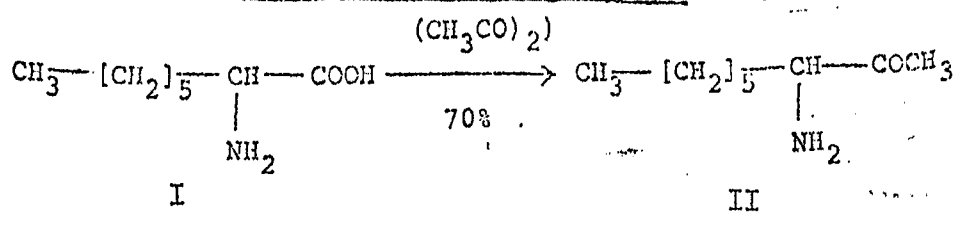
IX

VIII

25

17089

3-ACETAMIDONONAN-2-ONA (II)



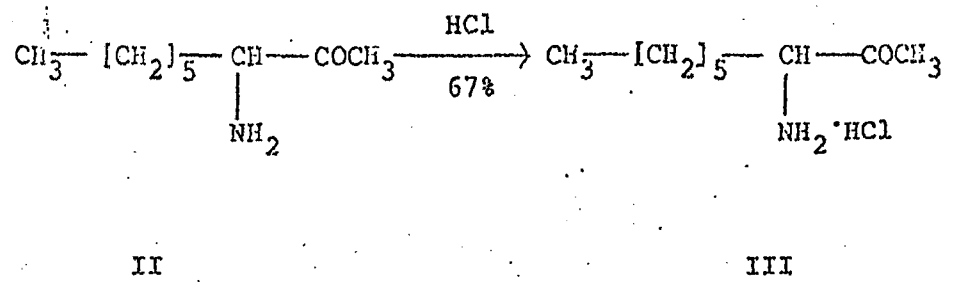
5

Una mezcla de ácido 2-amino-1-octanoico (I, 200 g, 1,26 moles) en anhídrido de ácido acético (960 ml) y piridina (640 ml) fué calentada sobre un baño de agua hirviendo durante 4 horas. La mezcla de reacción fué evaporada en vacío y el residuo fué repartido 6-8 veces entre solución acuosa al 5% de NaHCO₃ (400 ml) y éter (400 ml). Los extractos etéreos combinados fueron secados con MgSO₄ anhidro y evaporados hasta sequedad para dar 3-acetamidononan-2-ona bruta, 154 g (70%).

10

15

CLORHIDRATO DE 3-AMINO-2-NOCTANOICA (III)



20

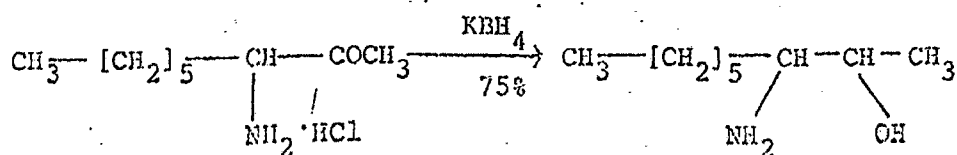
El producto bruto (II) obtenido en la operación precedente (154 g) fué disuelto en HCl acuoso concentrado (1.540 ml) y puesto a reflujo durante 2 horas y luego evaporado hasta sequedad en vacío. El sólido resultante fué

25

recristalizado en una solución moderadamente caliente en EtOH (etanol) (200 ml) y luego enfriado a 25°. A esta solución se añadió éter (600 ml). Aparece un precipitado cristalino blanco; la suspensión es mantenida a 5° durante la noche. El precipitado es recogido y lavado con éter (una vez con 100 ml) para dar 125 g (67%) de producto cristalino blanco, p.f. 112°, descomposición.

Si el material cristalino no fuese blanco o tuviera un punto de fusión más bajo, debería ser recristalizado con carbón orgánico en tetrahidrofurano. En una repetición de este método se utilizaron 150 ml de tetrahidrofurano por 100 g del clorhidrato (III) bruto.

BRIPTO-3-AMINO-2-NOCANOL (IV)



III

IV

Se disolvió clorhidrato de 3-amino-2-nonanol (43,8 g, 0,226 moles) en metanol absoluto (150 ml) y se enfrió a -10° en un baño de hielo y sal. 1/ Se añadió borohidruro de potasio (24,4 g, 0,45 moles) 2/ en pequeñas porciones durante un período de 2-3 horas. Luego la mezcla fué man-

tenida a -10 hasta -15° durante 3 horas 3,4/ y se dejó llegar lentamente a temperatura ambiente (22°), luego se agitó durante la noche (20 horas) a temperatura ambiente. Luego la mezcla fué evaporada hasta sequedad (jarabe) en vacío y repartida entre H_2O (150 ml) y cloroformo (150 ml). La capa en H_2O fué extraída adicionalmente (3 veces) con cloroformo (100 ml cada vez). La capa en cloroformo fué secada con $MgSO_4$ y evaporada en vacío para dar un producto oleoso, ligeramente amarillento. Este líquido fué destilado en alto vacío a $95-100^{\circ}$ (0,15 mm de Hg) para dar eritro-3-amino-2-nonanol puro, 26,4 g, rendimiento 75%, p.f. $81-86^{\circ}$.

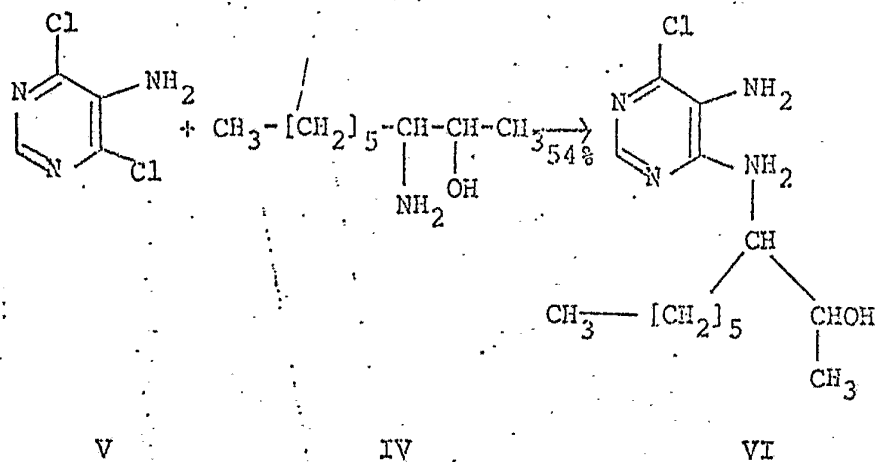
1.- Después de enfriar la solución de III, precipita algo de material; esto no tiene ningún efecto sobre el resultado de la reacción.

2.- En este punto, el presente método difiere del método de Schaeffer y otros. Schaeffer añade ácido acético al mismo tiempo que borohidruro potásico ($=KBH_4$), manteniendo el pH a 5-6. Se ha encontrado que la neutralización implica pérdida de KBH_4 y que se tolera un pH por encima de 5. Más importante es el hecho de que la simultánea adición de ácido acético y KBH_4 (tal como propone Schaeffer) hace muy difícil de controlar la reacción. La temperatura sube considerablemente y se producen pérdidas de rendimiento y/o calidad del producto.

3.- Se recomienda utilizar una agitación eficaz para asegurar la reacción apropiada, que estará completa cuando hayan desaparecido todos los pequeños terrones y porciones de borohidruro de potasio.

4.- El enfriamiento a 0°, tal como describen Schaeffer y otros (método D, línea 4 y siguientes) es insuficiente. Constituye una mejora el mantener la reacción bien por debajo de 0°; lo mejor es mantenerla por debajo de -10° en todo momento. Si se deja que la temperatura pase por encima de -10°, puede resultar una pérdida sustancial de rendimiento.

ERITRO-5-AMINO-4-CLORO-6-(2-HIDROXI-
-3-HEXILAMINO)PIRIMIDINA (VI)



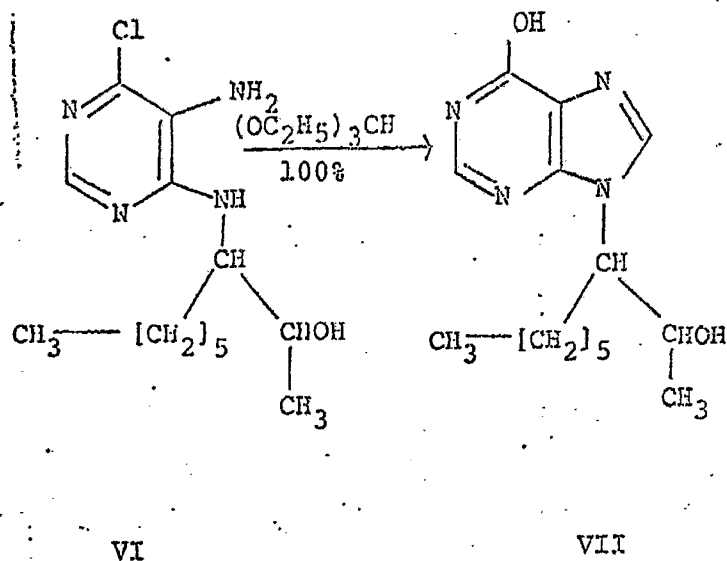
Se preparó con agitación a 25° una mezcla de 4,6-dicloro-
-5-aminopirimidina (V, 24,6 g, 0,15 moles) y eritro-3-ami-
no-2-nonanol (IV, 26,2 g, 0,164 moles) en 1-pentanol
(1.080 ml) y tributilamina (350 ml). La suspensión resul-
5 tante fué calentada a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno
durante 28 horas (tuvo lugar disolución en aproximadamente
½ hora). En este momento, una muestra del producto de reac-
ción manifestó un uv λ_{\max} 267 y 297 nm (H₂O, pH 5,5).

La solución resultante fué concentrada en un ba-
10 ño de agua caliente a una presión de 10 mm Hg para formar
un jarabe y luego evaporada adicionalmente en un baño de
aceite a 0,1 m y 100° para rendir un líquido viscoso al
que se añadió n-hexano (450 ml). La mezcla fué puesta a re-
flujo durante 1 hora, y la porción sobrenadante en hexano,
15 amarillenta y caliente, fué separada del líquido en el fon-
do del matraz de fondo redondo.

El aceite de color pardo claro resultante, del
que se eliminó cualquier cantidad de hexano residual, fué
evaporado en vacío y disuelto en cloroformo (150 ml). Esta
20 solución en cloroformo fué extraída 8 veces con una solu-
ción acuosa saturada de NaHCO₃ (250 ml cada vez). La capa
en cloroformo fué luego separada, secada (con sulfato de so-
dio o magnesio) y evaporada bajo alto vacío (0,1 mm Hg) a
40° (baño de agua) para dar un aceite de color pardo claro
25 que solidificó al enfriar. Este material puede ser utiliza

do directamente en la siguiente etapa o purificado como sigue: el aceite resultante fué disuelto en 75-100 ml de cloroformo y se añadió n-hexano (aproximadamente 300 ml) para separar por precipitación un sólido cristalino blanco que fué filtrado desde la solución enfriada. (La extracción se lleva a cabo 4-8 veces, hasta que ya no se desprende dióxido de carbono). Este tratamiento fué repetido dos veces más. Rendimiento: 23,3 g (54%) y λ_{\max} 267, 297 (H_2O , pH 5,5) p.f. 113-116°.

ENTERO-9-(2-HIDROXI-3-ECNIL)-
-6-CLOROPURINA (VII)



25

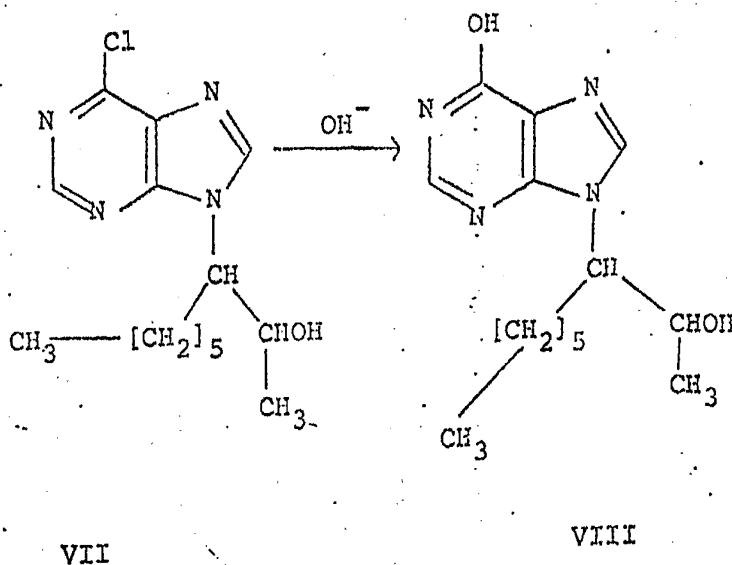
17089

El jarabe bruto procedente de la operación precedente, que consiste en eritro-5-amino-4-cloro-6-(2-hidroxi-3-nonilamino)pirimidina (11,48 g, 40 milimoles) fué disuelto en ortoformiato trietilico (106 ml) y se añadió cloroformo (34 ml) y ácido etanosulfónico (10 gotas) para efectuar disolución. Después de reposar durante la noche a 25°, la solución fué evaporada en vacío para formar un jarabe. Rendimiento 11,7 g (cuantitativo). Este jarabe, que consistía en eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-6-cloropurina (VII) bruta fué utilizado en la siguiente etapa. λ_{max} 264 nm.

ERITRO-9-(2-HIDROXI-3-NONIL)-

HIPOXANTINA (VIII)

(Por hidrólisis del derivado de 6-cloropurina)



Una suspensión de eritro-6-cloro-9-(2-hidroxi-3-nonil)purina (VII, 4,0 g, 13,4 milimoles) en NaOH 0,5 N (40 ml) fué puesta a reflujo durante 2 horas y enfriada. La neutralización con ácido acético glacial y el enfriamiento dieron un precipitado cristalino de eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)hipoxantina (VIII) que fué filtrado y secado. Rendimiento: 3,8 g (cuantitativo), p.f. 196^o uv λ_{\max} (pH 5,5) 251 nm.

El producto bruto (VIII) obtenido de este modo era homogéneo por cromatografía en papel (3 disolventes) y dió resultado negativo en el ensayo en cuanto a Cl⁻ (alambre de cobre y llama; fusión de sodio, acidificación y nitrato de plata).

La recristalización de una muestra del material bruto, efectuada 3 veces en etanol acuoso (véase purificación) dió cristales incoloros. p.f. 202^o. Calc. para C₁₄H₂₂N₄O₂ (VIII): C, 60,41; H, 7,97; N, 20,13. Encontrado: C, 60,47; H, 7,86; N, 20,08.

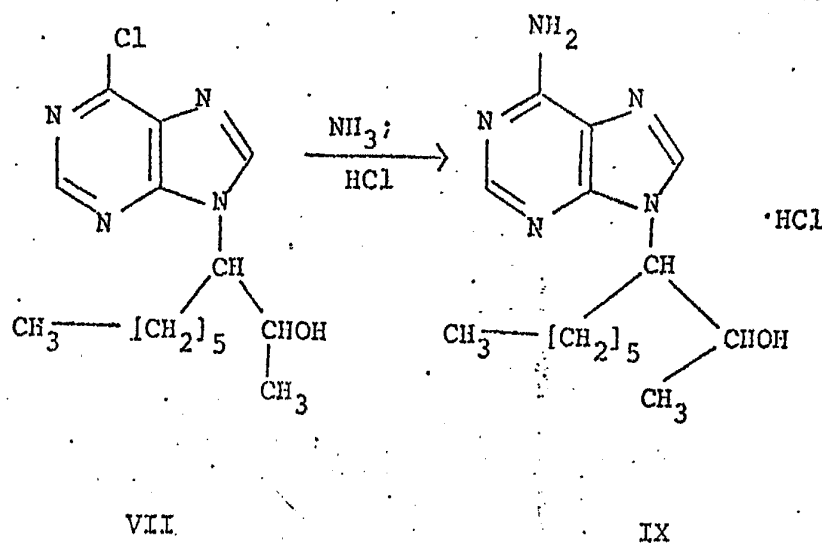
PURIFICACION DE

ERITRO-9-(2-HIDROXI-3-NONIL)-HIPOXANTINA (VIII)

La nonil-hipoxantina (VIII) bruta es purificada por recristalización. El material bruto es disuelto por calentamiento en aproximadamente 6-10 veces su peso de alcohol etílico, y luego se añade un volumen igual de H₂O. La

solución es tratada con carbón orgánico en un matraz Erlenmeyer, y filtrada a través de Celito mientras está caliente. La solución es evaporada con agitación continua sobre una placa caliente. Se añade agua en pequeñas porciones para reemplazar el volumen evaporado hasta que aparece un precipitado abundante. Se mantiene la evaporación del disolvente para eliminar todo el alcohol etílico, mientras se añade repetidamente H₂O hasta alcanzar un volumen de 8-12 veces el peso de material. La pérdida de material es de aproximadamente 10% por cada recristalización. Dos recristalizaciones aumentaron el punto de fusión a 202° y dieron un producto cristalino incoloro, mientras que el material bruto era algo amarillo o rosa y fundía a 192°.

BRIERO-9-(2-HIDROXI-3-NONIL)-ADENINA. HCl (IX)

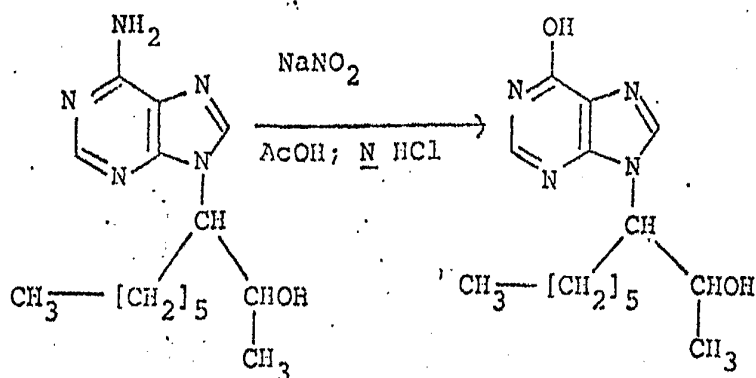


25

La eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-6-cloropurina (VII) oleosa bruta (6,15 g) procedente de las preparaciones precedentes, es disuelta en amoníaco metanólico saturado (300 ml) y cloruro de amonio (1 g) a 80-100° durante 1 hora en un tubo-bomba de acero inoxidable (Parr Instruments). Después de enfriar, la solución fué evaporada hasta sequedad en vacío. Se añadió metanol y se evaporó de nuevo (3 veces) para eliminar el exceso de amoníaco.

El residuo siruposo fué disuelto en alcohol metílico absoluto, y se borboteó HCl gaseoso seco, manteniendo la temperatura por debajo de 20° (con un baño de hielo/agua. Después de hacer pasar HCl durante $\frac{1}{2}$ hora, la mezcla fué enfriada a 5°. El precipitado fué recogido a través de un embudo de vidrio sinterizado, lavado con alcohol metílico frío y secado en aire. Rendimiento 6,0 g (92%) p.f. 173-175° desc. uv λ_{\max} 260 nm (en H₂O, pH 5,5).

VIA ALTERNATIVA PARA LA PREPARACION DE
ERITRO-9-(2-HIDROXI-3-NONIL)-HIPOXANTINA (VIII)
(por desaminación de VII)



5

10

VII

VIII

Se añadió lentamente nitrito de sodio (5,6 g, 71 milimoles) a una solución de eritro-9-(2-hidroxi-3-nonyl)-adenina (IX, 4,0 g, 14 milimoles) en ácido acético al 50% (20 ml) y HCl N (3,2 ml) a 25° con agitación. La mezcla fué agitada durante 2 horas a 25°. Después de este tiempo, se vigiló el espectro uv. Cuando el uv λ_{max} llegó a 250 nm, la solución fue neutralizada con NaOH 2 N. El precipitado resultante fué filtrado y lavado con H₂O. Rendimiento = 3,03 g (75%) p.f. = 195°.

20

Una muestra analítica fué recristalizada (3 veces) en agua, rindiendo un producto de p.f. 202°. Anal.

Calc. para C₁₄H₂₂N₄O₂: C, 60,40; H, 7,96; N, 20,13.

Encontrado: C, 60,40; H, 7,90; N, 20,12.

25

17089

METODO K

Compuesto NPT 15.426

Se utilizó el método de H.J. Schaeffer y S.F. Schwender, J. Med. Chem. 17:6 (1974).

5

METODO L

Preparación de NPT 15.410

0,1 milimoles de 9-(2-hidroxi-3-nonil)-6-hidroxi-purina, NPT 15.392 (27,9 mg) y 0,3 milimoles de 4-(acetilamino)benzoato de 2-hidroxipropil, dimetilamonio (DIP·PacBA) (77,1 mg) fueron pesados con exactitud y disueltos en 105 ml de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 0,25% para rendir una solución al 0,1% de NPT 15.410 (el compuesto formado a partir de NPT 15.392 y (DIP·PacBA) en una relación molar de 1:3).

10

15

Evidencia de formación de complejo

Estudios de solubilidad de fases llevados a cabo con NPT 15.392 y DIP·PacBA demuestran que el NPT 15.392 tiene solubilidad acrecentada en concentraciones crecientes de DIP·PacBA, en condiciones de pH constante. Esto es indicativo de que se produce una interacción en solución para rendir un complejo.

20

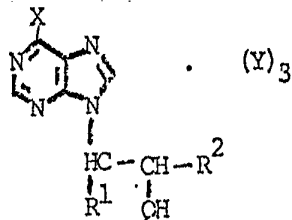
En lugar de la relación molar de 1:3 (NPT 15.392 y DIP·PacBA), se forman otros complejos utilizando relaciones molares de 1:1 y 1:10.

25

La actividad antivirica se muestra en las tablas 2 y 3.

TABLA 2

Inhibición de reproducción de virus de influenza por 9-(hidroxialcohol)purinas.



Cépa de virus Influenza A
USSR/90 (H₁N₁)

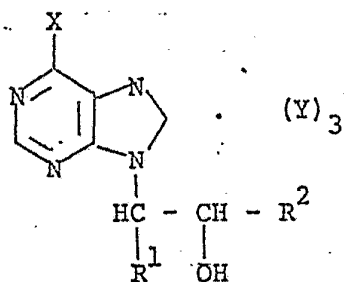
Com- puesto de en- sayo No.	Compuesto				% de inhibición de focos de hemoadsorción, concen- tración (µg/ml) de com- puesto de ensayo		
	R ¹	R ²	X	Y	<10	10-100	>100
15425	H	H	OH	-	-	-	-
15428	H	H	OH	DIP·PACBA	-	-	-
15435	H	H	SH	-	-	50	10
15437	H	H	SH	DIP·PACBA	-	65	65
15446	H	CH ₃	OH	-	2	0	0
15447	H	CH ₃	OH	DIP·PACBA	10	26	34
15431	H	CH ₃	NH ₂	-	-	22	0
15432	H	CH ₃	NH ₂	DIP·PACBA	-	48	62
15427	CH ₃	H	I	-	-	-	-
15423	CH ₃	H	Cl	-	2	13	6
15433	CH ₃	H	NH ₂	-	-	32	0
15434	CH ₃	H	NH ₂	DIP·PACBA	-	41	62
15443	CH ₃	H	OH	-	-	0	0
15444	CH ₃	H	OH	DIP·PACBA	-	44	54
15417	C ₆ H ₁₃	H	OH	-	18	58	60

TABLA 2 (cont.)

Compuesto de ensayo No.	R ¹	R ²	X	Y	<10	10-100	>100
15418	C ₆ H ₁₃	H	OH	DIP·PacBA	16	46	52
15392	C ₆ H ₁₃	CH ₃	OH	-	86	100	100
15410	C ₆ H ₁₃	CH ₃	OH	DIP·PacBA	58	96	96
15426	C ₆ H ₁₃	CH ₃	NH ₂	-	50	96	100
15110	-	-	-	DIP·PacBA	0	0	20

TABLA 3

Inhibición de reproducción de virus de herpes por 9-(hidroxialcohil)purinas



NPT No.	Compuesto				Placas (UPF)		Porcentaje de inhibición
	R ¹	R ²	X	Y	Ensayo (15-150 g/ml)	Testigo	
15392	C ₆ H ₁₃	CH ₃	OH	-			98%
15417	C ₆ H ₁₃	CH ₃	OH	-			
15418	C ₆ H ₁₃	H	OH	DIP·PacBA			
15410	C ₆ H ₁₃	H	OH	DIP·PacBA			98%

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Métodos

ACTIVIDAD ANTI-INFLUENZA - (EXPERI-
MENTO DE HEMOADSORCIÓN)

5 Después de infección de una monocapa de células de cultivo de tejidos por virus de influenza, la superficie de las células es alterada de manera tal que eritrocitos de cobaya pueden ser adsorbidos junto a la superficie de las células. El número de focos de células adsorbidas (unidades formadoras de focos de hemoadsorción UFFHA) es una medida cuantitativa de la infectividad. El método es como sigue.

10 Las monocapas fueron subcultivadas de la siguiente manera: el medio fué trasegado, y la monocapa fué lavada dos veces con aproximadamente 50 ml por lavado de solución salina tamponada con fosfato (PBS) exenta de calcio y magnesio (GIBCO #419) a un pH de 7,2. Se añadió a 37° 1 ml de solución de tripsina-EDTA (GIBCO #530 L) que contenía 0,5 g de tripsina (1:250) y 2,0 g de EDTA/litro de Solución Salina Modificada de Puck A a cada matraz y se dispersó sobre la monocapa con suave agitación. Luego los matraces fueron colocados en una incubadora a 37°C durante aproximadamente 3-5 minutos dependiendo del tiempo requerido para desalojar las células. Se requirió una agitación ocasional.

20 Se añadieron a cada matraz 10 ml de medio de cultivo y las

25

células fueron dispersadas aspirando y expulsando luego la suspensión desde la pipeta. Los contenidos de una serie de matraces fueron reunidos y las células en la suspensión fueron diluidas con medio de cultivo a $7-8,5 \times 10^4$ células/ml.

5 El medio de cultivo consistía en la siguiente composición: Medio Esencial Mínimo Eagles (MEM) con sales de Earle y tampón HEPES (GIBCO #236) suplementado añadiendo las siguientes sustancias, tal como se especifican, a 87 ml de MEM:

- 10 10 ml de suero de ternero fetal (FCS-GIBCO #614HI)
- 1 ml de L-glutamina (GIBCO #503 Molar)
- 1 ml de clorotetraciclina (5000 g/ml) GIBCO #528)
- 1 ml de mezcla de 10,000 unidades penicilina
- 15 10,000 unidades de estreptomina y 10,000 unidades de neomicina (PSN-GIBCO #564)

Las células fueron subcultivadas dentro de bandejas de cultivo de tejidos Limbro. Las bandejas consistían en 24 pozos de fondo plano cada uno con una capacidad de 3 ml por pozo; la suspensión de cultivo de células (1 ml) fué añadida a cada pozo.

20

Al día siguiente el medio fué retirado y reemplazado por medio de cultivo de nueva aportación. Las monocapas fueron utilizadas para experimentación cuando alcanzaron un estado en el que eran casi confluentes (aproximadamente 3-4 días).

25

5 Cuando los cultivos de células HeLa en bandejas Limbro estaban dispuestos para experimentación (véanse células), el medio fué decantado y se añadió 1 ml. de medio de mantenimiento (MEM con FCS reducido a 3%) que contenía el compuesto que estaba siendo ensayado en una concentración establecida, a 4 cultivos de repetición o reproducción dentro de una bandeja.

10 Se utilizaron una serie de diferentes concentraciones de droga que oscilaban en 2,3 y 150 g/ml. Se utilizó medio de mantenimiento por sí solo para cultivos testigo. Después de la administración de droga y medio testigo, se añadieron 0,1 ml de la suspensión de virus diluida a grupos experimentales y a grupos testigo infectados. Se añadió solución salina sola a cultivos testigo no infectados.

15 Las bandejas Limbro fueron incubadas luego a 37°C durante 18 horas, después de lo cual se aspiró medio en todos los grupos. Cada cultivo fué lavado una vez con PBS. La solución salina fué aspirada y se añadieron 0,5 ml de una suspensión de células sanguíneas rojas de cobaya al 0,4% v/v

20 en PBS a cada pozo de cultivo. Los cultivos permanecieron a temperatura ambiente durante 30 minutos después de lo cual el medio fué decantado y el cultivo fué lavado 2 veces con PBS para eliminar la totalidad de las células rojas excepto las específicamente fijadas. Después del tercer

25 lavado, se añadió a todos los cultivos medio de mantenimien

to.

Una pieza ocular de Micrómetro Howard (08385) fué insertada dentro del ocular de un microscopio de contraste de fase invertida Nikon. Cada cultivo fué explorado por un objetivo de papel bajo de 4 aumentos y se efectuaron recuentos directos de células rojas hemoadsorbidas utilizando la rejilla de pieza ocular como un marcador de campos. Se recontaron campos parciales o completos por cada grupo experimental dependiendo del número y densidad resultantes de células hemoadsorbidas en los cultivos testigo infectados. Se escogieron aumentos de 60x ó 150x para obtener las mejores condiciones con el fin de contar las células hemoadsorbidas. Se calcularon factores de campos para recontar la hemoadsorción a 60x y 150x. Con un aumento de 60x se calculó el recuento total de campos utilizando un factor de multiplicación de 55,5. Con un aumento de 150x el factor de multiplicación fué 273. Los factores de multiplicación de 55,5 y 273 representan el número total de campos con aumentos de 60x y 150x, respectivamente. El número de campos recontados oscilaba de 3 a 5 por pozo con 3 a 4 pozos por grupo de tratamiento empleado (véanse tablas de datos aproximados en la sección de resultados en cuanto al número de campos examinados). Se calcularon errores medios y típicos y los datos fueron evaluados utilizando el análisis de ensayo t de estudiante (Student).

ACTIVIDAD BIOLÓGICAACTIVIDAD ANTI-HERPES - (EXPERIMENTO DE PLACAS)

La infección de células de cultivo de tejidos por virus de herpes provoca la lisis de células. Después de un período de tiempo estas células lisadas son visualizadas como una minúscula zona clara (placa) sobre una capa de células. La incorporación de una sustancia de ensayo en los medios reducirá el número de placas si esta sustancia es capaz de evitar reproducción de virus. El método es como sigue:

MATERIALES Y METODOSVirus

Se empleó herpes hominis tipo 2, adquirido de American Type Culture Collection (ATCC), Bethesda, Maryland, ATCC #VR 540, Lote 3D. La suspensión de virus lipotilizada fué reconstituida con 1 ml. de agua destilada estéril. El virus fué hecho pasar dos veces a través de monocapas de células HeLa. Las porciones sobrenadantes de cultivo de tejido fueron reunidas, entregadas en porciones alicuotas de 1 ml, y almacenadas a -70°C . Se encontró que la concentración de esta suspensión de reserva - trabajo era de 10^{-4} DICT₅₀/0,1 ml (incubación durante 2 días).

Experimento de placa de virus de herpes

Células Vero en fase de crecimiento logarítmico fueron subcultivadas en una concentración de 1×10^5 células/ml en matraces Falcon de 50 ml en Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) suplementado con suero de ternero fetal al 10% (FCS) y antibióticos. Los medios fueron cambiados al día siguiente de la plantación. Las monocapas de Vero alcanzaron confluencia en el segundo día después de la plantación y con las células en fase logarítmica los cultivos fueron utilizados para el experimento de placas.

Los medios de cultivo fueron trasegados y las monocapas fueron lavadas una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se prepararon varias diluciones diferentes de la suspensión de virus de reserva - trabajo y cada matraz de cultivo fué infectado con 0,5 ml de una de las diluciones de virus añadidas a medio exento de FCS. Este medio contenía droga en una concentración de $150 \mu\text{g/ml}$. Se prepararon testigos con medio desprovisto de droga.

Se dejó desarrollarse la adsorción de virus durante 2 horas a 37°C , tiempo durante el cual los cultivos fueron sacudidos suavemente cada 15 minutos. Luego se trasegaron los medios y las monocapas fueron lavadas una vez con 10 ml de PBS.

Se preparó agarosa en una concentración de 6% en peso/volumen en 50 ml de PBS. Se preparó un medio de reser

5 va a base de MEM suplementado con 2% de FCS. Se añadió droga a algunos de los medios de reserva a 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las tres soluciones fueron mantenidas a 47°C. Además, se preparó una dilución 1:10 de sueros anti-herpes humanos reunidos. Justo antes del comienzo del tratamiento, se añadieron 15 ml de la solución de agarosa a 85 ml de medio. Otros 15 ml de agarosa fueron añadidos a 85 ml de droga-medio.

10 Cada una de las monocapas lavadas en un grupo de experimento fué tratada con 5 ml de agarosa-medio o con 5 ml de agarosa-droga-medio. En otro grupo de experimentos cada monocapa fué tratada con 0,2 ml de sueros anti-herpes en 5 ml de medio de reserva, o con 0,2 ml de sueros anti-herpes en 5 ml de droga-medio. Los sueros anti-herpes fueron utilizados en lugar de agarosa para localizar placas
15 mediante neutralización de cualesquiera virus libres en el medio. Los matraces fueron dejados permanecer a temperatura ambiente durante 5 minutos, después de lo cual fueron incubados a 37°C durante 2 días. Se utilizaron cultivos triplicados para la mayor parte de los grupos de tratamien
20 to.

Se añadieron luego 10 ml de PBS a cada matraz. Las capas superiores fueron agitadas suavemente y luego fueron vertidas y derramadas desde los matraces. Las monocapas fueron teñidas con una solución al 0,5% en peso/volumen
25

de Violeta Cristal en metanol al 50% en agua triplemente destilada.

5 Las placas fueron contadas directamente por luz fluorescente transmitida y macrovisión, o por la utilización de microscopía luminosa para microplacas. Las microplacas fueron contadas promediando tres campos por cada grupo experimental bajo un aumento 150 x.

En otros ensayos de actividad antivirica se obtuvieron los siguientes resultados:

10



20089

Compuesto	% de inhibición a $\mu\text{g/ml}$				virus
	0,1-1,0	1,0-10	10-100	>100	
15392	30-50	--	>70	>70	Influenza A Cerdo 1976 (H ₁ sw-N ₁)
15417	--	50-70	>70	--	Influenza A Cerdo 1976 (H ₁ sw-N ₁)
15418	--	--	>70	>70	Influenza A Cerdo 1976 (H ₁ sw-N ₁)
15426	20-30	30-50	50-70	50-70	(Ruso)
15410	50-70	30-50	>70	>70	(Cerdo)

Ensayos adicionales de actividad antivírica del compuesto 15.410 NPT se muestran en la tabla 3a

TABLA 3a
 INHIBICION DE REPRODUCCION DE VIRUS
 DE INFLUENZA POR NPT 15410

Virus	Margen de concentraciones (µg/ml)			
	,01-1,0	1,0-10,0	10,0-100	>100
A/Cerdo/76 (H ₁ ^{lsw} N ₁)	+++ ^a	++	++++	++++
A/Texas/77 (H ₃ N ₂)	++	+	++++	++++
A/Dunedin/73 (H ₃ N ₂)	NT	NT	+	++
A/Jap/305 (H ₂ N ₂)	NT	NT	++++	++++
A/PR ₈ (H ₀ N ₁)	++	++	++++	+++
A ₂ Hong Kong (H ₂ N ₂)	NT	NT	++	+++

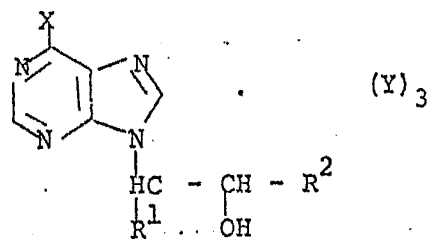
a

- NT = No ensayado
- + = 10-20% de inhibición
- ± = 20-30% de inhibición
- ++ = 30-50% de inhibición
- +++ = 50-70% de inhibición
- ++++ = >70% de inhibición

La actividad de inmunomodulación es mostrada en la tabla 4

TABLA 4

MODULACION DE INMUNIDAD MEDIDA POR
CELULAS, POR 9--(HIDROXIALCOHIL)PURINAS



NPT No.	Compuesto			
	R ¹	R ²	X	Y
15425	H	H	OH	-
15428	H	H	OH	DIP·PacBa
15435	H	H	SH	-
15437	H	H	SH	DIP·PacBA
15446	H	CH ₃	OH	-
15447	H	CH ₃	OH	DIP·PacBA
15431	H	CH ₃	NH ₂	-
15432	H	CH ₃	NH ₂	DIP·PacBA
15427	CH ₃	H	l	-
15423	CH ₃	H	CL	-
15433	CH ₃	H	NH ₂	-
15434	CH ₃	H	NH ₂	DIP·PacBA
15443	CH ₃	H	OH	-
15444	CH ₃	H	OH	DIP·PacBA
15417	C ₆ H ₁₃	H	OH	-
15418	C ₆ H ₁₃	H	OH	DIP·PacBA
15392	C ₆ H ₁₃	CH ₃	OH	-
15410	C ₆ H ₁₃	CH ₃	OH	DIP·PacBA
15426	C ₆ H ₁₃	CH ₃	NH ₂	-

Cambio porcentual máximo

NPT N.º	Proliferación de linfocitos de ratones inducida por mitógeno (Con A)			Proliferación de linfocitos humanos producida por mitógeno (PHA)		
	0,01-1,0	1,0-10	10-100	0,01-1,0	1,0-10	10-100
15425	11	0		100	0	0
15428						
15435				55	45	-50
15437						
15446	6	12	0	0	0	0
15447						
15431	-15	-27	-47	0	0	0
15432						
15427						
15423						
15433	+15	-23	-65	53	0	-50
15434						
15443	+17	+27	+27	0	+13	0
15444						
15417	0	0	0	0	0	-50
15418	41	73	26			
15392	172	162	-72	11-15	20	-50
15410	140	40	40	30-50	60	
15426	-50	-85	-91	6	-41	

Cambio porcentual máximo (Cont.)

NPT No.	Proliferación de macrófagos de co- ya inducida por linfoquina (LINF)		
	0,01-1,0	1,0-10	10-100
15425			
15428			
15435			
15437			
15446	0	0	0
15447			
15431			
15432			
15427			
15423			
15433			
15434			
15443	+20	0	
15444			
15417		13	-50
15418	12	80	-50
15392	33	23	
15410	12	23	
15426			

Varios compuestos fueron ensayados en cuanto a proliferación de linfocitos de muridos inducida por mitógenos con los siguientes resultados:

5	Compuesto	% de estimulación a $\mu\text{g/ml}$			
		01-1,0	1,0-10	10-100	>100
	15392	>50%	30-50%	30-50%	no ensayado
	15426	0	0	0	no ensayado
	15410	>50	30-50	30-50	no ensayado
10	15417	0	0	0	0
	15418	20-30	>50	20-30	no ensayado

15

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Experimento de inmunomodulación

Se utilizan los tres siguientes métodos de experimentación para evaluar la aptitud de las sustancias de ensayo para modular la actividad de varias clases de células en el sistema inmune. En estos sistemas es posible identificar tanto actividad inmunopotenciadora (evidenciada por un aumento del parámetro examinado) así como también actividad inmunosupresora (evidenciada por una inhibición o disminución del parámetro examinado).

25

20089

1.- Experimento de células de bazo de ratón inducida por mitógeno

Las células de bazo de ratón contienen una población de linfocitos tanto B como T que pueden ser estimulados para proliferar por un cierto número de sustancias ajenas (por ejemplo mitógenos de plantas, tales como Con A). Esta proliferación acrecentada es una indicación de acrecentada inmunidad medida por células. El método siguiente describe el sistema utilizado para evaluar sustancias de ensayo en calidad de inmunopotenciadoras.

Materiales

Concanavalina A (Calbiochem, La Jolla, California), lote #210073, liofilizada en NaCl, fué preparada primeramente como una solución al 1% y diluida como una concentración 2X para cada dilución (0,5, 1,0, 2,5 µg/ml)

Animales

Ratones de la misma raza Balb/c y C₃H machos de seis a ocho semanas de edad fueron obtenidos de los siguientes orígenes: Flow research Animals, Inc., Dublin, Virginia; Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, Massachusetts; Laboratory Supply Company, Indianapolis, Indiana; y Lionel Strong Foundation, San Diego, California.

Células

Tres a cinco ratones fueron sacrificados por dis-
locación cervical y se retiraron de manera aséptica los
bazos. Bazos reunidos fueron picados y desgarrados con
5 forceps estériles; luego fueron colados a través de una do-
ble capa de malla de Nylon. La suspensión de células fue
lavada una vez con 15 ml de RPMI 1640 suplementado con 5%
de suero de ternero fetal y antibióticos. Se cultivaron
células en una concentración de 10^6 células/0,1 ml/pozzo en
10 microplacas. Se incubaron cultivos en la presencia o au-
sencia de mitógeno en una atmósfera humidificada que con-
tenía 5% de CO_2 durante 48 horas. El compuesto de ensayo
fue añadido a cultivos en diversas concentraciones conco-
mitantemente con mitógeno.

15

Proliferación

Se experimentó la proliferación mediante el gra-
do de incorporación 1,0 Ci de [3H]-timidina por un pe-
ríodo de incubación de 18 horas. Los cultivos fueron cose-
20 chados mediante una unidad MASH (Otto Hiller Co., Madison
Wisconsin) y se experimentó la incorporación de timidina
mediante espectrometría por centelleo de líquido. Los cul-
tivos se realizaron por triplicado y los datos se expresan
como media más o menos el error típico de la media experi-
25 mental. Se calcularon también índices de estimulación por

droga sobre valores testigo y se representaron gráficamente.

5 2.- Linfocitos de sangre periférica humana inducidos por mitógeno

10 Existe una necesidad clínica de agentes terapéuticos para aumentar la respuesta inmune en pacientes con estados inmunes deficientes o deprimidos, tal como existen en enfermedades víricas o en cancer. Estudiando la aptitud de los agentes para aumentar la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana como respuesta a una sustancia ajena, pueden identificarse agentes con actividad inmunopotenciadora en seres humanos. El método es el que se acaba de exponer y está descrito también por Hadden, 15 J. W., Infect & Immunity, febrero de 1976, págs. 382-387, especialmente páginas 382-383.

20 3.- El macrófago representa una subpoblación de células sanguíneas blancas que son un componente importante del sistema inmune para controlar la inmunidad tanto celular como humoral. El sistema de experimentación abajo descrito evalúa las sustancias estudiadas como potenciadoras de la función de macrófago.

25 Se adquirió fitohemaglutinina (PHA) (HA-17) de Burroughs Welcome. Un preparado que contenía Factor Mitógeno Macrófago (MMF) y Factor Activador Macrófago (MAF) fué prepara-

do a partir de linfocitos de nodos de linfa inunes estimu-
mulados por antígeno (cobaya) tal como se describe ante-
riormente por Hadden y otros, Nature 257, 483-485 (1975).
La purificación parcial de este preparado por diálisis en
5 vacío y cromatografía en columna de Sephadex G-100 rindió
una fracción activa en el margen de 35-70.000 daltons, que
exhibía propiedades tanto mitógenas como activadoras. La
fracción activa fué empleada en los experimentos tanto de
proliferación como de activación.

10 Métodos.- Se prepararon linfocitos de sangre
periférica humana purificados por Ficoll-hipaco y se ex-
perimentó la proliferación de linfocitos inducida por PHA,
mediante la incorporación de timidina tritiada tal como se
describe en Hadden y otros, Cell, Immunol. 20, 98-103
15 (1975). Cada compuesto fué analizado en la presencia de
concentraciones subóptimas, óptimas y supraóptimas de PHA
(0,001, 0,01, 0,1 unidades/ml respectivamente). Se prepa-
raron macrófagos peritoneales de cobaya inducidos por acei-
te de parafina y se incubaron como capa de monocultivo (ma-
20 crófagos puros en >98%). Se experimentó la proliferación
inducida por linfoquina (LIF) mediante la incorporación de
timidina tritiada a los 3 y 5 días de cultivo tal como se
describe en Hadden y otros, Nature 257, 483-485 (1975).
La activación de macrófagos inducida por linfoquina (LIF)
25 para matar y destruir *Listeria monocytogenes* después de

5 días de cultivo en la presencia o ausencia de MAF se realizó durante un período de 6 horas tal como se describe en Hadden and England, Immunopharmacology, páginas 87-100 (plenum Press, 1977). La fagocitosis fué cuantificada durante una exposición en 20 minutos a *Listeria monocytogenes* contando el número de macrófagos que contenían bacterias y el número de bacterias por célula fagocítica por gramo de monocapas tañidas en cámaras Labtek. La destrucción intracelular de bacterias fué evaluada contando el número de células que contenían bacterias y el número de bacterias por célula 6 horas después de la exposición inicial de 20 minutos. Experimentos paralelos en los que macrófagos fueron lisados y bacterias intracelulares fueron cultivadas, confirman la validez de la actividad bacteriana determinada de esta manera en este sistema. Las drogas fueron empleadas en cada uno de los tres sistemas a lo largo de un margen de concentraciones logarítmicas en serie por triplicado en la presencia y en la ausencia de mitógeno o linfoquina. Cada tipo de experimento fué realizado al menos tres veces. Experimentos previos indican un paralelismo de respuesta a modulación farmacológica en los experimentos de proliferación y activación.

ACTIVIDAD BIOLÓGICAActividad anti-leucémica (inhibición de crecimiento de L-1210).

5 Células leucémicas aisladas de ratones que llevaban el tumor L-1210 son cultivadas "in vitro" y se puede medir su crecimiento contando el número de células en el cultivo durante un período de tiempo. La incorporación de una sustancia de ensayo en los medios impedirá el crecimiento de las células leucémicas, que es una indicación de un eficaz agente anti-leucémico.

10

La I_{50} (concentración de droga que inhibe el crecimiento de L-1210) en porcentaje para los compuestos ensayados fué como sigue:

15	Compuesto	Concentración (microgramos/ml)
	15392	28
	15410	54
	15417	47
	15418	70

20

El sistema de experimentación utilizado se expone seguidamente.

Para medir la inhibición del crecimiento de células leucémicas (L-1210)

25

Efectuar comprobación para ver que hay crecimiento

to de células adecuado en los cultivos de reserva. Se utilizan células 48-72 horas después de realizarse transferencias.

5

Pesar las drogas a 50 veces la concentración final deseada y efectuar diluciones en serie.

Reponer el medio final utilizando 500 ml de medio 5A de McCoy, 15% de suero de ternero fetal, 5 ml de solución de penicilina-estreptomina, y 5 ml de solución de antibiótico-antimicótico y dejarla reposar a temperatura ambiente.

10

Utilizando una técnica estéril, añadir 0,1 ml de las diluciones de droga a cada tubo.

15

Añadir una cantidad apropiada de células al medio preparado. Después de mezclar, retirar una muestra de 0,5 ml, colocarla en un vial que contiene 9,5 ml de solución salina, y recontarla en el contador Coulter. Multiplicar el recuento por 40 para compensar la dilución de 40 veces (0,5 ml en solución salina de 0,5 ml) y registrar el inóculo.

20

Añadir a cada tubo 5 ml de suspensión de células. Poner en turbulencia la botella cada 4 tubos para asegurar una distribución más uniforme de las células. Apretar los tapones y colocar en el incubador con CO₂ a 36-38° durante 96 horas.

25

Después de 96 horas retirar los tubos del incuba-

dor y recontar el contenido de cada uno en el contador Coulter. Multiplicar todos los recuentos por 40 y promediar los cuatro recuentos para cada dilución de droga. Si el recuento es menor que el inóculo, registrar una inhibición de 100%. Si el recuento es mayor que el promedio de los ocho recuentos testigo, registrar 0% de inhibición. Para todos los otros recuentos utilizar la siguiente fórmula:

$$10 \quad \frac{\text{Promedio de células/ml en cultivos tratados} - \text{inóculo en células/ml}}{\text{Promedio de células/ml en cultivos testigo} - \text{inóculo en células/ml}} \times 100 = \% \text{ de supervivencia}$$

100% - % de supervivencia = inhibición del crecimiento debido al tratamiento.

15 Se ha puesto de manifiesto que los compuestos objeto de este invento inhiben la reproducción de una muestra representativa de virus tanto RNA como DNA utilizando técnicas normalizadas de cultivo de tejidos. En el caso de virus RNA, se mostró que eran inhibidas varias cepas de virus de influenza que pertenecían a los subtipos A y B, utilizando la técnica de hemoadsorción (sección II, B). Los compuestos específicos de los que se halló que inhibían la reproducción de virus de influenza (tipo A/USSR 90) están mostrados en la tabla 1. Se mostró que varios miembros de

20

25 la serie NPT 15.392, NPT 15.410, NPT 15.417 y NPT 15.418

inhiben la reproducción de al menos 4 cepas diferentes de virus de influenza en concentraciones que oscilan entre 1-150 g/ml.

5 Además se ha mostrado que varios miembros de la serie, NPT 15.410 y NPT 15.392 inhiben la reproducción de virus Herpes Simplex, un miembro de la clase DNA de virus, y un virus responsable de graves lesiones mucocutáneas en seres humanos, juntamente con la fatal Herpes encefalitis. Otros miembros de esta clase de virus son responsables de la fiebre aftosa en cerdos y reses de ganado vacuno e infecciones de rinotraqueitis en gatos y tos de perrera en perros. Se encontró que incluso concentraciones menores de 100 µg/ml de NPT 15392 y 15.410 reducían la formación de placas causadas por virus Herpes Simplex en una extensión de >90%. Otros miembros de las clases RNA y DNA de virus se muestran en la tabla 5 y son responsables de las enfermedades especificadas. De todas las enfermedades del mundo se sabe que al menos el 25% son provocadas por virus. Además se han aislado un cierto número de virus, que se muestra que producen tumores. Así, se puede esperar que agentes antivirales tengan, por sí mismos, algunas propiedades antitumorales.

20 Es un hecho comprobado que muchos agentes infecciosos, tales como virus (virus de influenza, HSV, virus de leucemia de Friend), bacterias y hongos causan un esta-

do inmune suprimido en el huésped, debilitando sus defensas frente a infecciones por agentes infecciosos. La mayor parte de otras sustancias antimetabolito antivíricas, tales como AraC, provocan una supresión de mecanismos de defensa por inmunidad de huéspedes, manifestando de esta manera un potencial para disminuir los mecanismos de defensa natural por sí mismos, y acrecientan la infección secundaria.

Un inmunopotenciador o inmunomodulador es cualquier agente que restaura la función de inmunidad deprimida, o acrecienta la función inmune normal, o ambas cosas. La función inmune es definida como el desarrollo y la expresión de inmunidad humoral (mediada por anticuerpos), inmunidad celular (mediada por timocitos), o resistencia mediada por macrófagos o granulocitos. Lógicamente, incluye agentes que actúan directamente sobre las células implicadas en la expresión de respuesta inmune, o sobre mecanismos celulares o moleculares que, por su parte, actúan para modificar la función de células implicadas en respuesta inmune. El aumento de la función inmune puede resultar de la acción de un agente para anular mecanismos supresivos derivados de influencias de reacción negativa endógenas o exógenas para el sistema inmune. Por lo tanto, los inmunopotenciadores tienen diversos mecanismos de acción. A pesar de la diversidad de los lugares de acción de célu-

las y del mecanismo bioquímico de acción de los inmunopotenciadores, sus aplicaciones son esencialmente las mismas; es decir acrecentar la resistencia de los huéspedes.

Aplicaciones de inmunopotenciadores

5

1) La principal función protectora del sistema inmune se refiere a la resistencia a la invasión por agentes patógenos, incluyendo virus, rickettsias de raquitismo, micoplasmas, bacterias, hongos, y parásitos de todo tipo. Por lo tanto, la mejora de la respuesta inmune, particularmente cuando esté deprimida, mejoraría de manera intencionada la resistencia en el caso de infección o infestación por cualquiera de los patógenos anteriores. Un inmunopotenciador sólo o en combinación con una terapia antiinfectiva puede ser aplicada a cualquiera de las enfermedades infecciosas y a todas ellas.

10

15

2) Se piensa que una segunda función protectora del sistema inmune es la resistencia al injerto de tejido ajeno, natural como en la relación fetal-maternal; o no natural como se realiza por un cirujano de trasplante. Se pueden utilizar también inmunopotenciadores para facilitar el rechazo de tejidos fetales o placentarios o para modificar o inducir la tolerancia a injertos.

20

25

3) Una tercera función protectora del sistema inmune se cree que es la resistencia al desarrollo de células malignas como en el cancer. La utilización de inmu-

inmunopotenciadores puede ser empleada para el tratamiento del cancer con el fin de acrecentar el rechazo de tumores e inhibir las recurrencias de tumores después de otras formas de terapia.

4) Una cuarta función protectora implica la capacidad de reconocer el carácter ajeno y de mantener la no reactividad por sí mismo mediante mecanismos supresores positivos. En afecciones autoinmunes y relacionadas, la reactividad inmune se dirige a antígenos propios o resultan evidentes respuestas elevadas exageradas que son auto-destructivas. Se pueden utilizar inmunopotenciadores para restaurar mecanismos supresores normales, inducir tolerancia, o favorecer de otro modo una respuesta inmune normal.

Cada una de las funciones protectoras del sistema inmune pueden ser modificadas por una terapia no específica con inmunopotenciadores sólo o en combinación con otros agentes empleados para mejorar la resistencia o para matar el patógeno invasor. Además, la resistencia específica puede ser aumentada por utilización de inmunopotenciadores en unión con alguna forma de antígeno, tal como en una vacuna que emplee, por ejemplo, virus, células tumorales etc. Esta utilización puede efectuarse para inducir inmunidad a tolerancia específica. Esta última puede ser ilustrada por utilización con un antígeno en enfermedades de alergia o autoinmunes. La utilización de inmunopotenciadores

res puede ser terapéutica o profiláctica; la última, particularmente al envejecer, en donde son más comunes las infecciones, la autoinmunidad y el cancer. La sincronización de la administración y las vías son variables y pueden ser críticas para determinar si resulta una respuesta positiva o negativa. Cualquier agente capaz de aumentar la respuesta inmune puede inhibirla dependiendo de la sincronización y de la dosis; por lo tanto, en ciertas circunstancias un inmunopotenciador podría ser utilizado como un agente inmunosupresivo para uso en alergia, autoinmunidad y transplantes.

La tabla 4 anterior presenta los resultados de una evaluación de un cierto número de estos compuestos objeto de invento como potenciadores de la respuesta inmune. Se utilizaron tres sistemas diferentes de ensayo. El primero implica una medición de la aptitud del compuesto de ensayo para acrecentar la capacidad de linfocitos de ratones para proliferar como respuesta a un mitógeno de plantas (Con A). El segundo implica medir la capacidad de los compuestos de ensayo para acrecentar la proliferación de linfocitos humanos como respuesta a un segundo mitógeno de plantas (PHA). El tercer sistema mide la aptitud de estas sustancias de ensayo para acrecentar la proliferación de macrófagos como respuesta a una linfoquina natural (Factor Mitógeno Macrófago, MMF). Se ha mostrado que esta última

respuesta, la proliferación y activación de macrófagos está implicada en la destrucción de bacterias, virus y células tumorales por esta clase de células sanguíneas blancas.

5 Se ha observado una significativa potenciación de la respuesta inmune por 15.392, 15.410 y 15.418.

10 Finalmente, se ha determinado la actividad de varios de estos agentes, NPT 15.392 y 15.410 como inhibidores del crecimiento de linfocitos anormales. Notablemente, ambas sustancias son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos leucémicos de ratones (una línea de células L-1210) en un cultivo de tejidos. Una inhibición de 50% de las células L-1210 fué efectuada por NPT 15.392 a 28 µg/ml y por NPT 15.410 a 54 µg/ml. La aptitud de inhibir linfocitos leucémicos en concentraciones que estimulan a los
15 linfocitos normales es una propiedad única en su género, que no se sabe que esté presente en ninguna otra clase de sustancias.

20 Los productos del presente invento son miembros de una clase de sustancias, que inhiben específicamente la reproducción de virus RNA y DNA, modulan (potencian) la respuesta inmune e inhiben el crecimiento de linfocitos leucémicos. Basado en experimentos in vitro, que demuestran actividad por un margen de concentraciones de 0,01-150 µg/ml,
25 márgenes de dosis eficaces en mamíferos son 0,05-500 mg/kg.

Se ha observado una carencia de toxicidad en niveles de 1500 mg/kg en ratones para ciertos números de esta serie.

Los inmunopotenciadores del invento pueden ser empleados, por ejemplo, para proporcionar resistencia a la invasión por los virus de la tabla 5.

5

TABLA 5

<u>Virus</u>	<u>Clase</u>	<u>Enfermedad</u>
Arenavirus	RNA	Fiebre de valle reventado
Influenza	RNA	Influenza
Rhinovirus	RNA	Resfriado común
Poliovirus	RNA	Polio
Virus de sarampión	RNA	Rubéola
Virus de enfermedad de Newcastle	RNA	Enfermedad de Newcastle
Rotavirus	RNA	Gastroenteritis en niños
Hepatitis Tipo A	RNA	Hepatitis infecciosa
Virus de rabia	RNA	Rabia
Arbovirus	RNA	Encefalitis
Virus de vacuna	DNA	Viruela
Virus Herpes Simplex	DNA	Llaga fría, Encefalitis, Enfermedad venérea
Herpes Zoster	DNA	Zoster
Varicella Zoster	DNA	Varicela
Adenovirus	DNA	Afecciones respiratorias
Hepatitis Tipo B	DNA	Hepatitis crónica, Hepatitis grave
Virus de fiebre aftosa	DNA	Fiebre aftosa
Virus Machupo		Fiebre hemorrágica

POTENCIACION DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS POR DIP·PACBA

De las sustancias descritas en la tabla 1, son nuevas las NPT 15.392 y NPT 15.446. También son nuevas las sales de DIP·PACBA presentadas en esta tabla, a saber

5 15.428, 15.437, 15.447, 15.432, 15.434, 15.444, 15.418 y 15.410. Las NPT 15.392, NPT 15.417 y NPT 15.426 han mostrado todas ellas que tienen por sí mismas una importante actividad anti-influenza. En un caso (con NPT 15.392) la reacción por adición de sal de DIP·PACBA a NPT 15.392 para

10 formar 15.410 no potencia la actividad anti-influenza. En el caso de NPT 15.417, la reacción por adición de sal de DIP·PACBA para formar 15.418 potencia la actividad anti-influenza. Seguidamente se expone un resumen de la aptitud relativa de sales de DIP·PACBA para potenciar las diferentes

15 actividades biológicas.

Compuesto	Sal de DIP·PACBA	Anti- influenza	Potenciación Anti-leucemia	Inmuno- potencia- ción
15392	15410	Ambos igual- mente activos	Si	Si
15417	15418	Si	-	Si
15435	15437	Si	-	-
15446	15447	Si	-	-
15431	15432	Si	-	-
15433	15434	Si	-	-
15443	15444	Si	-2	-

25

17089

FORMULACIONES

Los compuestos del presente invento pueden ser administrados a un mamífero en una dosis de 1-1.000 mg/kg de peso corporal y se cree que son activos en niveles tan bajos como 0,05 mg/kg. La DL_{50} , determinada en ratones, de NPT 15.410 administrado intraparenteralmente, era de 4.300 mg/kg, mientras que subcutáneamente era de 4.900 mg/kg. El NPT 15.392 ha sido administrado a ratones en dosis de 1.000 mg/kg y no se observó mortalidad relacionada con la droga.

Los compuestos pueden ser administrados a seres humanos en forma de tabletas o cápsulas o, cuando lo permite la solubilidad, en la forma de jarabes o soluciones inyectables o, cuando son insolubles, como suspensiones. Formulaciones farmacéuticas típicas son descritas seguidamente:

Cápsula:

NPT 15.392 50-500 mg.

Avicel pH 101
(celulosa microcristalina) para dar 800 mg.

Suspensión:

Se pueden preparar suspensiones acuosas con un cierto número de agentes de suspensión en los que se han incorporado las sustancias activas de droga. Están incluidas como agentes de suspensión sustancias tales como car-

boximetilcelulosa sódica, alginato sódico, goma tragacanto, Avicel RC-591 (microcelulosa), metilcelulosa, Veegum, goma xantana. Además de un agente de suspensión, pueden añadirse sustancias tales como edulcorantes, aromas, colorantes, agentes de conservación, coloides protectores y dispersantes.

FORMULACION PARA TABLETAS

10	NPT 15392	50-500 mg
	Avicel pH 101	130 mg
	Almidón, modificado	20 mg
	Estearato de magnesio U.S.P.	5,5 mg
	Polivinilpirrolidona	22 mg
15	Acido esteárico U.S.P.	30 mg

20

25

20089

FORMULACION PARA JARABES

	NPT 15392	25-125 mg (o en el nivel máximo de solubilidad)
	Azúcar de maíz	3,25 g
5	Agua destilada	0,05 g
	FD y C Red 40	0,00175 g
	Sacarina sódica	0,00250 g
	Alcohol U.S.P.	0,08 g
	Metil-paraben U.S.P.	0,005 g
10	Propil-paraben U.S.P.	0,001 g
	Glicerina	0,31225 g
	Aroma de cereza	0,00825 g
	Aroma de fruta	0,00825 g
15	Agua destilada c.s. hasta	5 ml

TRATAMIENTO "IN VIVO" DE RATONES CON NPT 15.392 Y NPT
15.410: EFECTO SOBRE LA ESTIMULACION "IN VITRO" DE LA PRO-
LIFERACION DE CELULAS DE BAZO POR CONCAVALINA A

5 La finalidad de este estudio fué la de determi-
nar los efectos de un tratamiento "in vivo" de ratones con
los compuestos NPT 15.392 y 15.410 sobre la actividad sub-
siguiente de células de bazo aisladas de estos animales y
evaluadas "in vitro" en cuanto a su respuesta proliferati-
va al agente mitógeno, Concanavalina A (Con A).

10 Método

Tratamiento "in vivo"

15 Nueve ratones Balb/c machos, de 8-9 semanas de edad, que
pesaban 18-20 g, fueron divididos en tres grupos. Un gru-
po fué tratado dos veces por día (por la mañana
y por la tarde, con una dosis oral de NPT 15.392 a 10 mg/kg.
El segundo grupo fué tratado similarmente con NPT 15.410
a 20 mg/kg. Un tercer grupo, al que se dosificó solución
salina, servía como testigo placebo.

Experimentación "in vitro" de células de bazo:

20 Preparado de células.

25 Al día siguiente, cada grupo fué sacrificado y
se retiraron y reunieron los bazos. Los bazos fueron cor-
tados y las células lavadas en medio RPMI-1640 (Grand Is-
land Biologicals) suplementariamente con 2 mm de glutamina
y antibióticos. La concentración de células de cada prepa-

rado fué determinada mediante un contador Coulter y ajustada a 5×10^6 células/ml con medio RPMI.

Experimento de placa de microvaloración.

5 Se llevarán a cabo experimentos de microvaloración en 0,2 ml de incubaciones que contenían 5×10^5 células y Con A o bien Con A y compuestos en las concentraciones indicadas. Todos los experimentos se realizaron con 6 repeticiones y se compararon con un experimento testigo que solo contenía células. Las placas de experimentación
10 fueron incubadas a 37° en 5% de CO₂ durante 4 días. Durante las 18-20 horas finales de incubación, se añadieron a cada cultivo 0,5 ml de HTdR (10 uCi/ml, 6 ci/milimol). Los cultivos fueron cosechados con una unidad cosechadora muestreadora automática múltiple (MASH), y se determinó
15 el ³HTdR incorporado con un contador de centelleo de líquido Beckman LS 8.000, como una medida de la proliferación de células. Los resultados están tabulados como la relación de la actividad en los cultivos tratados con Con A o con Con A y compuesto a la actividad de los cultivos testigo.
20

El tratamiento "in vivo" con cualquiera de los compuestos 15.392 o 15.410 aumenta la subsiguiente respuesta de las células de bazo, "in vitro" a estimulación por Con A a una concentración de agente mitógeno sub-óptima
25 (5 µg/ml) se observó una relación de estimulación de 120:1

en células de bazo tratadas y aisladas de ratones tratados con 15.392 en comparación con una relación de 40:1 en células de bazo aisladas de ratones tratados con placebo. No se obtienen resultados significativos con tratamiento por ninguno de los compuestos 15.392 o 15.410 cuando las células son estimuladas con una concentración más óptima de Con A (10 µg/ml).

5

Se ensayó también el efecto de un subsiguiente tratamiento "in vitro" de células estimuladas por Con A con NPT 15.392 y 15.410 a 1 µg/ml. Ambos compuestos muestran una señalada aptitud para aumentar la estimulación por Con A, particularmente en la concentración sub-óptima de agente mitógeno (5 µg/ml) y en una menor extensión a 10 µg/ml.

10

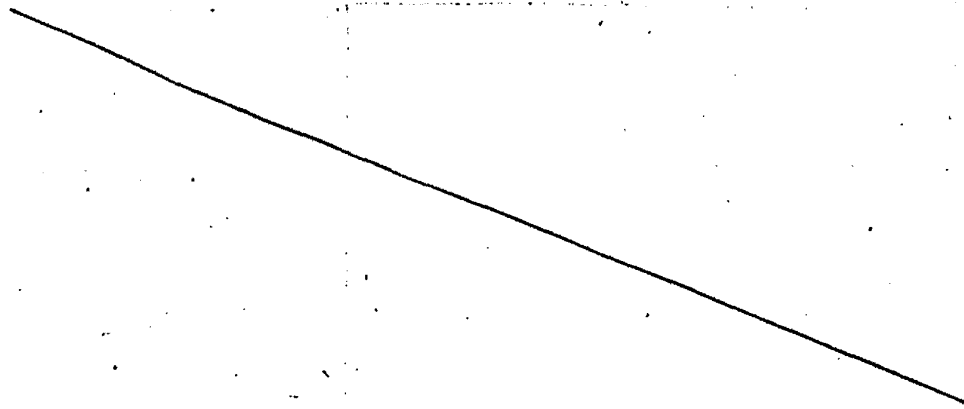
Con 5 µg/l de Con A, la estimulación por NPT 15.392 es 2,8 veces mayor con relación al tratamiento por Con A sólo, mientras que para NPT 15.410 es 3,3 veces mayor.

15

20

25

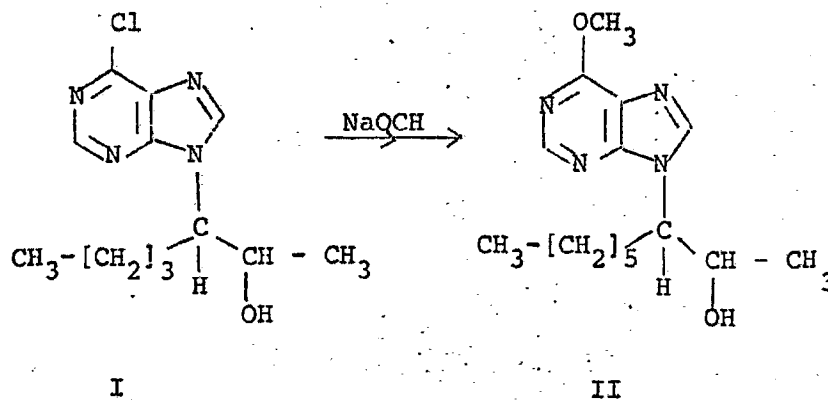
17089



Estos resultados indican un efecto inmunomodulador de estos compuestos sobre células sobre la proliferación de células de bazo. El tratamiento previo de animales con cualquiera de los compuestos que sensibilizan a las células a subsiguiente estimulación mitogénica mientras que se efectúa una exposición de las células "in vitro" a los compuestos después de estimulación mitogénica, aumentará la respuesta proliferativa particularmente en condiciones en que sea baja la respuesta a un agente mitógeno sólo.

EJEMPLO

Síntesis de una eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-6-alcoxi-purina(II)

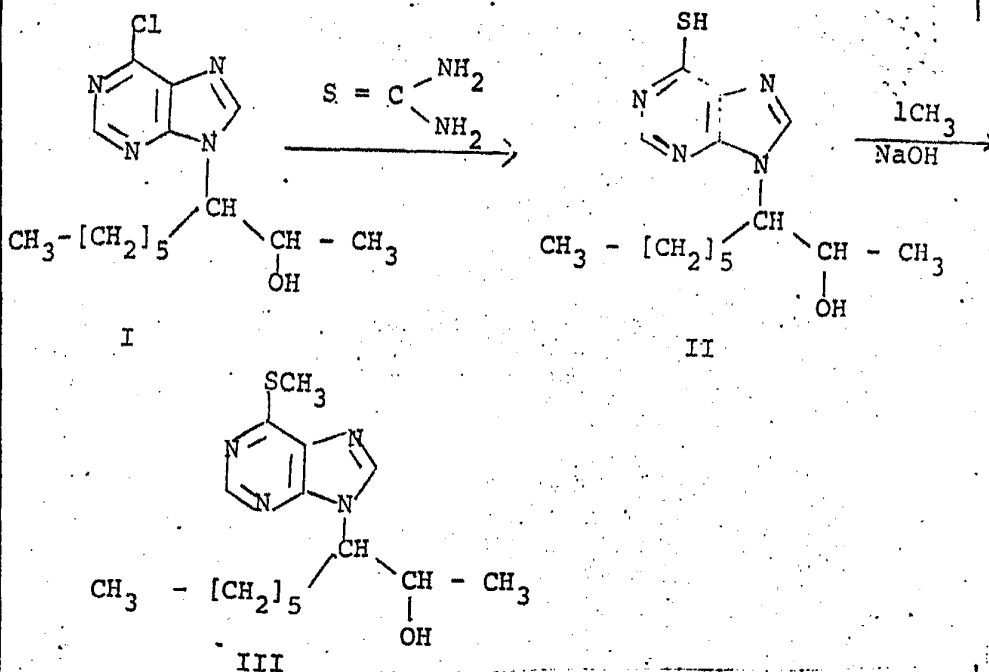


25

20089

El compuesto I (10 milimoles) y una solución de metóxido sódico (11 milimoles) en metanol (50 ml) se pusie
ron a reflujo durante 6 horas. El matraz de reacción fué
enfriado, el pH fué ajustado a 5 con ácido acético glacial
y la mezcla fué evaporada hasta sequedad bajo presión re-
ducida. El residuo fué recogido con una cantidad mínima de
agua fría, filtrado y secado en vacío.

Síntesis de eritro-9-(2-hidroxi-3-
-nonil)-6-metilmercapto-purina (III)



Etapa (1) compuesto I \longrightarrow compuesto II

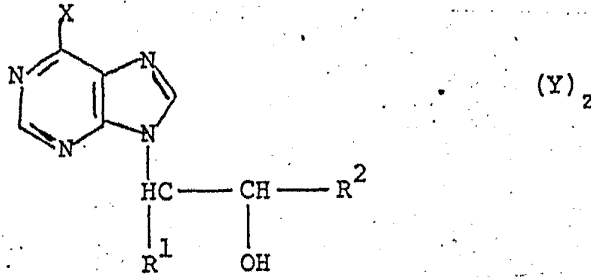
Se pusieron a reflujo durante 1 hora compuesto I (10 milimoles) en etanol (25 ml) y tiourea (10 milimoles) así como acetato sódico anhidro (11 milimoles). Después de enfriar, el producto resultante fué recogido por filtración, fué suspendido en una cantidad mínima de agua fría, y el pH fué ajustado a 5 con ácido acético diluido al 20%. El producto fué lavado con una cantidad mínima de agua fría, fué filtrado, y el precipitado fué secado en vacío.

Etapa (2) compuesto II \longrightarrow compuesto III

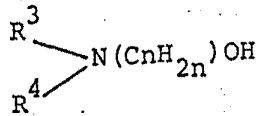
Una solución de compuesto II (10 milimoles) en ClH 2 N (25 ml) fué enfriada a 5°. Se añadió yoduro de metilo (20 milimoles) y la mezcla fué agitada vigorosamente en un matraz apretadamente taponado durante 15 minutos, a 5°. Luego la mezcla fué agitada mecánicamente a temperatura ambiente (25°) durante 3 horas, y el pH fué ajustado a 5 con ácido acético glacial. El precipitado resultante fué recogido por filtración, lavado dos veces con agua fría (15 ml) y secado.

REIVINDICACIONES

5 1ª.- Un procedimiento para preparar un compuesto de la fórmula



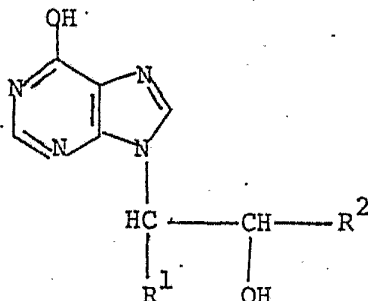
15 en donde X es OH, NH₂, SH, OR o SR (donde R es alcohol de 1 a 4 átomos de carbono o bencilo), R¹ es H o alcohol de 1 a 8 átomos de carbono, R² es H o metilo, Y es la sal de una amina de la fórmula



25 en donde R³ y R⁴ son alcohol inferior, n es un número entero de 2 a 4 y en donde z es un número de 1 a 10 con ácido p-acetamidobenzoico, que comprende hacer reaccionar un

compuesto de la fórmula:

5



10

con 1 a 10 moles de la sal Y.

2^a.- Un procedimiento según la reivindicación 1^a, en donde R¹ es H o n-alcoholo de 1 a 8 átomos de carbono y R³ y R⁴ son alcoholo de 1 a 4 átomos de carbono.

15

3^a.- Un procedimiento según la reivindicación 2^a, en donde R¹ es H o n-alcoholo de 1 a 7 átomos de carbono.

4^a.- Un procedimiento según la reivindicación 3^a, en donde R¹ es H o n-alcoholo de 1 a 6 átomos de carbono.

20

5^a.- Un procedimiento según la reivindicación 4^a, en donde R¹ es n-hexilo.

6^a.- Un procedimiento según la reivindicación 1^a, en donde X es OH, NH₂ o SH.

25

7^a.- Un procedimiento según la reivindicación 6^a, en donde X es OH.

8ª.- Un procedimiento según la reivindicación 6ª, en donde X es NH_2 .

9ª.- Un procedimiento según la reivindicación 6ª, en donde X es SH.

5 10ª.- Un procedimiento según la reivindicación 6ª, en donde R^2 es H.

11ª.- Un procedimiento según la reivindicación 10ª, en donde X es OH.

10 12ª.- Un procedimiento según la reivindicación 10ª, en donde X es NH_2 .

13ª.- Un procedimiento según la reivindicación 10ª, en donde X es SH.

14ª.- Un procedimiento según la reivindicación 6ª, en donde R^2 es metilo.

15 15ª.- Un procedimiento según la reivindicación 14ª, en donde X es OH.

16ª.- Un procedimiento según la reivindicación 14ª, en donde X es NH_2 .

20 17ª.- Un procedimiento según la reivindicación 14ª, en donde X es SH.

18ª.- Un procedimiento según la reivindicación 2ª, en donde X es OH, NH_2 o SH e Y es la sal de dimetilaminoisopropanol y ácido p-acetamidobenzoico.

25 19ª.- Un procedimiento según la reivindicación 18ª, en donde X es OH.

20^a.- Un procedimiento según la reivindicación 18^a, en donde R² es hidrógeno.

21^a.- Un procedimiento según la reivindicación 18^a, en donde R¹ es n-hexilo.

5 22^a.- Un procedimiento según la reivindicación 18^a, en donde R¹ es metilo.

23^a.- Un procedimiento según la reivindicación 18^a, en donde R² es metilo.

10 24^a.- Un procedimiento según la reivindicación 23^a, en donde R¹ es n-hexilo.

25^a.- Un procedimiento según la reivindicación 23^a, en donde R¹ es metilo.

26^a.- Un procedimiento según la reivindicación 24^a, en donde X es OH, NH₂ o SH y R¹ es hidrógeno.

15 27^a.- Un procedimiento según la reivindicación 1^a, en donde X es OH, R¹ es n-hexilo y R² es metilo.

28^a.- Un procedimiento según la reivindicación 27^a, en donde z es 3.

20 29^a.- Un procedimiento según la reivindicación 28^a, en donde Y es la sal de dimetilaminoisopropanol con ácido p-acetamidobenzoico.

25 30^a.- Un procedimiento según la reivindicación 27^a, en donde Y es la sal de dimetilaminoisopropanol con ácido p-acetamidobenzoico.

31ª.- UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR 9-(HIDROXIAL
COHIL)-PURINAS.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-
cede y para los fines que se han especificado.

5

Esta Memoria consta de ochenta y ocho hojas escri-
tas a máquina por una sola cara.

Madrid. 14. SET. 1979

P. A.

Alberto de Elzaburu
Por Poderes