



395861

MEMORIA DESCRIPTIVA
de una Patente de Invención a nombre de:
BOEHRINGER MANNHEIM G.m.b.H., de naciona-
lidad alemana, domiciliada en 6800
Mannheim-Waldhof, Sandhofer Strasse 112-
132 (Alemania); por: "PROCEDIMIENTO PARA
LA PREPARACION DE ESTERES DE NUCLEOSIDODI-
FOSFATO".

-----ooo000ooo-----

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>C07</u> <u>A61</u>
SUBCLASE <u>F</u> <u>K</u>

El invento concierne a un procedimiento para la
preparación de ésteres de nucleosidodifosfato por reacción
de un nucleosidofosfato con dicitclohexilcarbodiimida en pre-
sencia de un éster de ácido fosfórico.

5 Ya es sabido preparar ésteres de nucleosidodifos-
fato por reacción del nucleosidofosfato con dicitclohexilcar-
bodiimida en presencia de un éster de ácido fosfórico en pi-
ridina o formamida en calidad de disolvente. Este procedimien-
to posee la desventaja de que hace necesaria una duración de
10 reacción de 7 días, proporciona numerosos subproductos y apar-
ta sólo rendimientos insatisfactorios hasta de aproximadamente



395861

45%. De acuerdo con otra propuesta, se parte de la nucleosido-
5'-fosforamida en forma de sal de dicitclohexilguanidinio y se
condensa esta última por calentamiento durante 16 horas en
orto-clorofenol a 100°C con un éster de ácido fosfórico. Con
5 este procedimiento se acorta desde luego la duración de la
reacción, pero los rendimientos son igual de insatisfactorios
que en el procedimiento antes citado.

Además de este procedimiento químico se describió
ya también la preparación enzimática de diferentes ésteres
10 de nucleosidodifosfato por reacción de los correspondientes
nucleosidotrifosfatos con ésteres de ácido fosfórico en presen-
cia de enzimas adecuadas. Este procedimiento es inapropiado
para una preparación técnica de los productos deseados.

Por lo tanto, es misión del invento proporcionar
15 un procedimiento para la preparación química de ésteres de
nucleósidodifosfato que no tenga las desventajas arriba cita-
das, y conduzca con buenos rendimientos sin formación de can-
tidades esenciales de subproductos perturbadores, en el espa-
cio de corto tiempo, a los deseados compuestos.

20 El procedimiento de acuerdo con el invento para la
preparación de un éster de nucleosidodifosfato por reacción
de un nucleosidomonofosfato con un éster de ácido fosfórico
en presencia de dicitclohexilcarbodiimida consiste en que se
reune una solución metanólica de un ácido nucleósidomonofosfó-
25 rico, que contiene dicitclohexilcarbodiimida y eventualmente
un agente favorecedor de la disolución, lentamente con una
solución metanólica de un éster de ácido fosfórico, que tiene



971

395861

un valor de pH entre 1, y 6,5, preferiblemente de 4 a 5. La reacción tiene lugar preferiblemente a la temperatura ambiente o a temperatura ligeramente elevada y conduce en el espacio de algunas horas a rendimientos hasta de 90% y superiores.

5 Es especialmente sorprendente el hecho de que bajo las condiciones del procedimiento de acuerdo con el invento los ésteres de nucleósido-5-fosfato con el disolvente no se formen o solo se formen en muy pequeñas cantidades, dado que, J. Moffat y H.G. Khorana en J. Am. Chem. Soc. 83, 649 (1961)
10 han descrito bajo condiciones similares la formación prácticamente cuantitativa del correspondiente éster metílico. Es sorprendente además el hecho de que no sólo tenga lugar apenas formación de ésteres con el disolvente, sino que tampoco se formen apenas dinucleosidopirofosfatos.

15 El ácido nucleosidomonofosfórico puede derivarse de un nucleosido natural o sintético. Ejemplos de nucleosidos naturales apropiados son citidina, uridina, timidina, 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, pseudouridina, adenosina, guanosina, inosina, así como los correspondientes 2'-desoxi-
20 compuestos. Los nucleosidos sintéticos susceptibles de utilizarse constituyen la mayor parte de las veces derivados de los nucleosidos naturales arriba citados.

En calidad de segundo componente se utiliza en el procedimiento de acuerdo con el invento un éster de ácido fosfórico. El ácido fosfórico puede estar esterificado en este
25 caso con cualquier apropiado compuesto orgánico que contenga grupos hidroxilo, con la condición de que este éster de ácido



395861

fosfórico sea suficientemente soluble en el disolvente utilizado de acuerdo con el invento. Ejemplos de apropiados compuestos orgánicos que contienen grupos hidroxilo, que pueden ser empleados en forma de sus ésteres de ácido fosfórico, son alcoholes y aminoalcoholes monovalentes y polivalentes tales como por ejemplo etanolamina, colina, azúcares, tales como por ejemplo glucosa, maunosa, galactosa, ribosa, gliceraldehido así como las correspondientes cetosas y aminoazúcares. Ésteres de ácido fosfórico preferidos para el procedimiento del invento son colinfosfato, ácido etanolaminofosfórico, glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato, galactosa-1-fosfato y maunosa-1-fosfato, glucosamino-1-fosfato, galactosamino-1-fosfato, etc., maunosa-amino-1-fosfato y correspondientes compuestos N-acetilicos.

En calidad de disolvente se utiliza metanol. El metanol puede ser reemplazado parcialmente por alcanoles con hasta 4 átomos de carbono o dialcoholcetonas inferiores con hasta 3 átomos de carbono por cada cadena alcohólica, o dimetilformamida. Sin embargo el rendimiento es empeorado en general por esta razón.

Se obtienen resultados especialmente buenos en presencia de un agente favorecedor de la disolución. Agentes favorecedores de la disolución apropiados son por ejemplo piperidina, ciclohexilamino y anilina, así como preferiblemente morfolina.

En calidad de ácidos para el ajuste del valor del pH dentro del margen necesario entre 1 y 6,5 son apropiados en principio ácidos tanto orgánicos como también inorgánicos, que



395861

son solubles en el disolvente utilizado. Se prefieren los ácidos halohídridos, especialmente el ácido clorhídrico. A causa de la tolerancia al agua del procedimiento de acuerdo con el invento, los ácidos especialmente también los ácidos halohídricos, pueden ser empleados en forma acuosa, por ejemplo en forma de ácido clorhídrico concentrado. Acidos apropiados con los que no conducen a la precipitación de un participante en la reacción o no reaccionan de modo irreversible con éste (por ejemplo ácido sulfúrico, ácido nítrico).

Los ésteres de ácido fosfórico pueden ser utilizados en forma de sus sales, en forma de las sales de metal alcalino y metal alcalino-térreo comerciales. Se han mostrado como especialmente apropiadas las sales de calcio. Se supone que los iones calcio desarrollan en este caso propiedades favorecedoras de la disolución. Sin embargo se han mostrado también como apropiadas sales de sodio, potasio, litio, estroncio, magnesio y bario y sales de aminas orgánicas. Las sales de calcio pueden ser utilizadas también como sales mixtas, por ejemplo en forma de sales mixtas con ácidos halohídricos, tales como por ejemplo cloruro de colinfosfato- y calcio. En este hecho ha de ser vista una ventaja especial del procedimiento de acuerdo con el invento, dado que muchos de los reactivos a emplear se pueden obtener en el comercio en forma de sus sales de calcio, parcialmente como sales de cloruro de calcio y en esta forma, sin secado previo pueden ser utilizados directamente.

Tal como ya se ha indicado, es esencial que la solución del éster de ácido fosfórico tenga un valor de pH ácido.



Los mejores resultados se obtienen con valores de pH entre 4 y 5. Según los materiales de partida utilizados pueden ser ventajosos también valores de pH más bajos. Por debajo de pH 4 aumenta sin embargo la tendencia a la formación del éster metílico.

5

La temperatura de reacción no es de por sí crítica, y la reacción se puede llevar a cabo a temperaturas entre 0 y aproximadamente 80°C. Se prefieren temperaturas entre 20 y 60°C. Una característica esencial del procedimiento de acuerdo con el invento es la lenta adición de la solución ácida de éster de ácido fosfórico a la solución de ácido nucleosidofosfórico y dicitclohexilcarbodiimida en metanol. Preferiblemente esta adición tiene lugar por introducción gota a gota de la solución de éster de ácido fosfórico en una solución de ácido nucleosidofosfórico bien agitada.

10

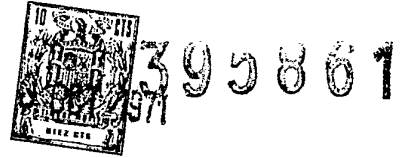
15

La purificación y el tratamiento de los productos obtenidos son sencillos, dado que éstos productos ya resultan en forma relativamente pura y en general contienen sólo vestigios de impurezas. En muchos casos el producto ya se separa por cristalización directamente en el transcurso de la reacción, por ejemplo en forma de la sal cálcica. La precipitación puede ser ayudada por adición de un disolvente adicional que disminuye la solubilidad del producto, por ejemplo isopropanol.

20

25

Una ventaja especial del procedimiento de acuerdo con el invento consiste en su sencillez. Se puede llevar a cabo como procedimiento de un único recipiente en un tiempo re-



lativamente corto con aparatos imaginablemente sencillos. Los productos pueden ser recuperados y purificados con mucha facilidad. Se utilizan sólo disolventes sencillos y baratos, y a causa de una cierta tolerancia para el agua estos disolventes no necesitan ser secados de modo especial. De esta manera desaparece también el consumo de tiempo, en otros casos igualmente grande, para eliminar el agua desde el medio de reacción mediante destilación azeotrópica, tratamiento con tamices moleculares, etc. Ya se hizo mención de la ventaja de que los productos de partida se pueden emplear la mayor parte de las veces en forma de las sales usuales en el comercio.

Los productos que se pueden obtener de acuerdo con el procedimiento del invento son fisiológicamente interesantes y por lo tanto encuentran utilización tanto en calidad de medicamentos como también en la investigación. Numerosos de los compuestos susceptibles de obtenerse desempeñan un gran papel en la historia celular fisiológica, por ejemplo en la biosíntesis de fosfátidos, de estructuras de paredes celulares y similares. Así, por ejemplo, la biosíntesis de fosfátidos de bases tales como lecitina, cefalina y esfingomielina tiene lugar por activación de la base, y en el caso de los restantes compuestos con radicales menos básicos, tales como serina, inosita, cardiolipina, por activación del diglicérido. La activación consiste aquí en todos los casos en la formación del correspondiente compuesto de citidindifosfato, que luego puede transferir adicionalmente el radical activado. En una serie de enfermedades con participación de fosfátidos, los fosfolípidos aparecen



1971395861

en cantidad disminuida, por ejemplo en las "enfermedades de glico-
lípidos", esfingomielinas (Morbus Niemann-Bieck) etc. La citi-
dindifosfatocolina que se puede obtener de acuerdo con el pro-
cedimiento del invento fue administrada por ejemplo satisfacto-
riamente, como precursor de la lecitina, en lesiones cerebra-
les y condujo a notables mejoras de los síntomas clínicos. El
grado de supervivencia en el caso de daños cerebrales pudo
ser aumentado considerablemente por tratamiento con esta sustan-
cia.

Los siguientes ejemplos explican el invento con más
detalle.

EJEMPLO 1

Uridindifosfatoqlucosa

10 g de uridin-5'-monofosfato (U-5'-MF) en forma de
ácido libre (aproximadamente 30 milimoles) son llevados a di-
solución en 500 ml de metanol puro con adición de 7,5 ml de mor-
folina, y después de adición de 10 g de dicitclohexilcarbodiimi-
da son calentados a 50°C. A esta solución se añaden gota a gota
con lentitud 90 milimoles de glucosa-1-fosfato, sal de morfolina,
disuelta en 500 ml de metanol y se ajusta a pH 4 con ácido clor-
hídrico concentrado. Después de un tiempo de reacción de 12 a
15 horas a 50°C se añaden bajo buena agitación 500 ml de isopro-
panol, se separa por centrifugación el precipitado separado,
se disuelve en 250 ml de agua, se neutraliza y se vierte sobre
una columna de IMAC-A-17 (contenido, 500 ml, forma de formiato),
y se eluye con un gradiente lineal de formiato de amonio 0-0,5 N,



80000071395861

pH = 4. Las fracciones con UDF-glucosa que salen de la columna con formiato de amonio aproximadamente 0,4 N, son inmediatamente desalificadas sobre una columna de carbón de 2 litros. La elución desde el carbón tiene lugar con una mezcla de isopropanol: H₂O: sosa cáustica = 50:50:0,5. Los aluatos son llevados a pH 7,2 con lejía de sosa, la solución es concentrada en vacío y la sal sódica de UDF-glucosa es precipitada con un volumen 10 veces mayor de metanol. Rendimiento: 8,5 hasta 9 g (aproximadamente 50% de la teoría referido al U-5'-MF empleado).

10 Análogamente, con galactosa-1-fosfato, sal de morfolina, se obtiene la correspondiente UDF-galactosa.

EJEMPLO 2

Adenosindifosfato

15 15 g de galactosa-1-fosfato, sal de morfolina, son disueltos en 500 ml de metanol y por adición de ácido clorhídrico concentrado se ajusta a 4 el valor de pH de la solución. Esta solución es añadida gota a gota con lentitud a 200 ml de una solución en metanol caliente a 50°C, que contiene 5 g de adenosin-5'-monofosfato (A-5'-MF), ácido libre, 3,5 ml de morfolina y 5 g de diciclohexilcarbodiimida. Después de un tiempo de reacción de 15 horas a 50°C y con un valor de pH 4-4 se añaden bajo buena agitación 250 ml de isopropanol. El precipitado separado es centrifugado, es disuelto en 200 ml de agua destilada, se ajusta a 7 el valor de pH y a continuación se
20
25 vierte sobre una columna intercambiadora de aniones (conteniendo 500 ml; tipo Dowex 1X2, forma de formiato). El producto es



395861

eluido con formiato de sodio 0,7 N y es tratado ulteriormente sobre carbón igual que en el Ejemplo 1. El rendimiento de ADF-galactosa, sal sódica, asciende a 4,5 g (aproximadamente 50% de la teoría, referido al A-5'-MF-empleado).

EJEMPLO 3

5 Citidindifosfato-etanolamina

14,5 g de ácido etanolaminofosfórico, aproximadamente 100 milimoles, y 15 g de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) son disueltos en aproximadamente 55 ml de agua destilada, son acidificados con aproximadamente 5 ml de ácido clorhídrico concentrado y son completados con metanol hasta 500 ml. Esta solución es incorporada gota a gota con lentitud en una solución en metanol (250 ml) caliente a 50°C, que contiene 11 g de citidin-5'-monofosfato (C-5'-MF), ácido libre, 8 ml de morfolina y 11 g de dicitclohexilcarbodiimida. Después de un tiempo de reacción de aproximadamente 15 horas a 50°C se añaden 300 ml de isopropanol, se separa por filtración el precipitado, se disuelve en agua, se neutraliza y se cromatografía sobre una columna intercambiadora de aniones (tipo Dowex 1X2, forma de formiato, mallas 50-100, 1000 ml de contenido). Después de un lavado previo se eluye con ácido fórmico 0,02 M la CDF-etanolamina. Las fracciones que contienen CDF-etanolamina son concentradas, son neutralizadas con lejía de sosa y finalmente son cristalizadas por adición de etanol. El producto cristalizado es filtrado con succión, lavado con etanol y secado.

25 Rendimiento: aproximadamente 12 g (70% de la teoría referido al C-5'-MF empleado).



395861

EJEMPLO 4

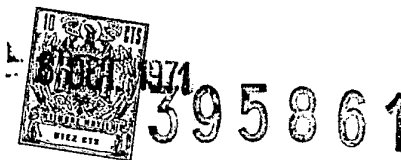
2 g de ácido citidin-fosfórico son llevados a diso-
lución en 100 ml de metanol puro con adición de 1,5 ml de
morfolina y son calentados a aproximadamente 50°C después de
5 adición de 2 g de dicitclohexilcarbodiimida.

A la anterior solución de reacción se añade gota a
gota con lentitud una solución de 5 g de cloruro de colinfos-
fato y calcio en 175 litros de metanol, que contiene 2,0 ml
de ácido clorhídrico al 36%. Después de un tiempo de reacción
10 de 12 a 15 horas a 50°C se añaden bajo buena agitación 250 ml
de isopropanol. El precipitado separado es centrifugado, es
disuelto en 200 ml de agua destilada y es vertido sobre una
columna de cromatografía con 250 ml de intercambiador de anio-
nes Dowex 1X2 en forma de formiato. La columna es lavada con
15 500 ml de agua destilada y es eluida con ácido fórmico 0,05 N.
Las fracciones que contienen citidindifosfatocolina son con-
centradas hasta sequedad, son disueltas en un poco de agua,
son neutralizadas con lejía de sosa y son cristalizadas por
adición de etanol.

20 Rendimiento: 3,2 g de citidindifosfatocolina-Na-4H₂O
(90% de la teoría).

EJEMPLO 5

5 g de guanidin-5-monofosfato, en forma de ácido
libre, son disueltos en 100 ml de H₂O destilada y 5 ml de
25 morfolina y son concentrados hasta aproximadamente 15 ml. Al
concentrado oleoso se añaden 100 ml de metanol, 2 ml de mor-



folina y 8 g de diciclohexilcarbodiimida (DCC). Bajo ligera
agitación se añade gota a gota a la mezcla de reacción a 50-55°C,
con lentitud, una solución de 15 g de glucosa-1-fosfato, sal de
morfolina, en 500 ml de metanol, ajustado a pH 4 con HCl con-
5 centrado. Después de terminación de la adición de G-1-F se
ajusta a 4,5 el valor del pH de la solución de reacción con
HCl concentrado. Después de 10 a 15 horas más a pH 4,5 está
terminada la reacción. La solución de reacción es concentrada
en vacío hasta aproximadamente 200 ml y la guanosindifosfato-
10 glucosa formada es precipitada por adición de 400 ml de iso-
propanol. El precipitado es disuelto en H₂O, es neutralizado y,
tal como se describe en el Ejemplo 1, es purificado sobre una
columna de IMAC-A 17, es desalificado en una columna de carbón
y es precipitado con metanol. Rendimiento: 3,5 g (40% de la teo-
15 ría) de GDF-glucosa-Na₂*

-----N O T A-----

Se reivindica como nuevo y de propia invención:

1.- Procedimiento para la preparación de ésteres de
nucleósidodifosfato por reacción de un nucleosidomonofosfato
20 con un éster de ácido fosfórico en presencia de diciclohexilcar-
bodiimida, caracterizado porque una solución metanólica de
ácido nucleosidomonofosfórico y diciclohexilcarbodiimida, que
eventualmente contiene un agente favorecedor de la disolución,
es reunida lentamente con una solución metanólica de un éster
25 de ácido fosfórico, que tiene un valor de pH entre 1 y 6,5.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized, cursive script that appears to be the initials 'R' and 'H' intertwined.



3795861

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se trabaja a una temperatura entre 0 y 80°C.

3.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque en calidad de agente favorecedor de la disolución se utiliza morfolina.

4.- Procedimiento según una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque el valor del pH es ajustado con un ácido halohídrico concentrado que contiene H_2O .

5.- Procedimiento según una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque el éster de ácido fosfórico es empleado en forma de una sal de metal alcalino o metal alcalino-térreo.

6.- Procedimiento según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se utiliza la sal de calcio.

7.- Procedimiento según una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque se utiliza colinfosfato.

8.- PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ESTERES DE NUCLEOSIDODIFOSFATO.

Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria Descriptiva, que consta de trece hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 18 OCT. 1971

J. Grand

(h)