

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS DOCTORAL

**Síntesis y estudio de la actividad citostática de N-Glicosil -  
Halometil - 1, 2, 3 - Triazoles**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**María del Rosario Alonso Fernández**

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
DE MADRID

FACULTAD DE  
CIENCIAS QUIMICAS

t1  
5114  
ALO



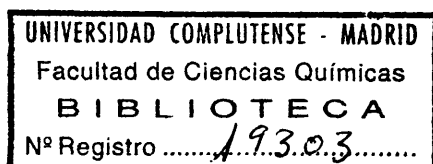
**SINTESIS Y ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD  
CITOSTATICA DE  
N-GLICOSIL - HALOMETIL - 1, 2, 3 - TRIAZOLES**

**MEMORIA**

que para optar al grado de  
**Doctor en Ciencias Químicas**

presenta

**M.<sup>a</sup> del Rosario Alonso Fernández**



Madrid, Junio de 1978

A Guillermo García-Muñoz

Este trabajo ha sido realizado en la Sección de Citobiología del Instituto de Química Médica del C.S.I.C.

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Gregorio Alonso Cortiguera, jefe de la Sección de Citobiología, por la dirección de este trabajo y su constante apoyo, al Dr. Federico Gómez de las Heras por su dirección y participación en la parte química, y al Prof. D. Ramón Madroñero Peláez, director del Instituto, por las facilidades concedidas para la realización de esta tesis.

Quiero dar las gracias a los componentes del Departamento de Análisis; y en especial a mis compañeros de Sección E. Bayo y J.R. Fernández por la ayuda recibida.

También doy las gracias por su ayuda económica a los Laboratorios Alter, S.A. de Madrid.

I N D I C E

I N T R O D U C C I O N .....	1
P A R T E    T E O R I C A .....	5
I.- COMPUESTOS SELECCIONADOS. JUSTIFICACION .....	6
II.- REACCIONES DE CICLOADICION DIPOLAR-1,3 DE AZIDAS DE GLICOSILO .....	9
1.- Reacciones de cicloadición dipolar-1,3. Genera <u>l</u> lidades .....	9
2.- Reacciones de cicloadición de azidas de glico- silo .....	16
III.- SINTESIS DE HALOMETIL-1,2,3-TRIAZOLES NO GLICOSI DICOS .....	25
1.- Obtención de 1-bencil-halometil-1,2,3-triazo <u>l</u> les .....	25
a) Por cicloadición de azida de bencilo a ha <u>l</u> luros de propargilo .....	25
b) Por halogenación de 1-bencil-4-hidroxime- til-1,2,3-triazoles .....	28
2.- Obtención de <u>y</u> -triazoles .....	37
a) Por cicloadición de trimetilsililazida a halometilacetilenos .....	38
b) Por halogenación de hidroximetil- <u>y</u> -triazo <u>l</u> les .....	39
c) Por hidrogenolisis de 1-bencil-1,2,3-tria <u>z</u> zoles .....	40
IV.- SINTESIS DE HALOMETIL-1-GLICOSIL-1,2,3-TRIAZOLES.	43
1.- Obtención de 1-glicosil-halometil-1,2,3-triazo <u>l</u> zoles por cicloadición de azidas de glicosilo	

y haluros de propargilo .....	44
2.- Obtención de 1-glicosil-bis(halometil)-1,2,3-triazoles por cicloadición de azidas de glicosilo a 1,4-dihalobutinos .....	51
3.- Obtención de 1-glicosil-halometil-1,2,3-triazoles por halogenación de 1-glicosil-hidroximetil-1,2,3-triazoles .....	56
a) Reacciones de cicloadición de azidas de glicosilo a hidroximetilacetilenos .....	57
b) Reacciones de halogenación de los 1-glicosil-hidroximetil-1,2,3-triazoles .....	61
TABLAS I y II .....	66
TABLA III .....	67
TABLA IV .....	70
TABLA V .....	72
TABLA VI .....	74
V. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CITOSTATICA .....	75
1.- Ensayos sobre cultivos celulares .....	75
2.- Sistemas microbianos .....	78
3.- Sistemas de tumores espontáneos .....	79
4.- Sistemas de tumores inducidos .....	80
5.- Sistemas de tumores trasplantables .....	80
VI.- RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD .....	83
P A R T E     E X P E R I M E N T A L .....	85
I.- PREPARACION Y ORIGEN DE LOS PRODUCTOS DE PARTIDA .	86
II.- SINTESIS DE DERIVADOS NO GLICOSIDICOS DE 1H-1,2,3-TRIAZOL Y v-TRIAZOL .....	97

1.- 4(5)-Hidroximetil- <u>y</u> -triazol .....	97
2.- 4,5-Bis(hidroximetil)- <u>y</u> -triazol .....	97
3.- 1-Bencil-4-clorometil-1,2,3-triazol .....	98
4.- 1-Bencil-4-bromometil-1,2,3-triazol .....	99
5.- 1-Bencil-4-iodometil-1,2,3-triazol .....	100
6.- 1-Bencil-4-fluorometil-1,2,3-triazol .....	101
III.- SINTESIS DE DERIVADOS GLICOSIDICOS DE 1H-1,2,3- TRIAZOL .....	103
Procedimiento general de obtención de nucleosidos por cicloadición dipolar-1,3 de acetilenos a azi- das de glicosilo .....	103
1.- 4- y 5-Clorometil-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol .....	103
2.- 4- y 5-Bromometil-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol .....	104
3.- 4- y 5-Hidroximetil-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- - $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol .....	106
4.- 4,5-Bis(hidroximetil)-1-(2,3,4,6-tetra-O-ace- til- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol .....	107
5.- 4,5-Bis(clorometil)-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- - $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol .....	107
6.- 4,5-Bis(bromometil)-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- - $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol .....	109
7.- 4-Iodometil-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D- glucopiranosil)-1,2,3-triazol .....	110
8.- 4- y 5-Clorometil-1-(2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-	

ribopiranosil)-1,2,3-triazol; y 4-clorometil-1-(2,3,5-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribofuranosil)-1,2,3-triazol .....	112
9.- 4-Bromometil-1-(2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribo- piranosil)-1,2,3-triazol .....	113
10.- 4- y 5-Hidroximetil-1-(2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ - D-ribopiranosil)-1,2,3-triazol .....	115
11.- 4-Iodometil-1-(2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribopi- ranosil)-1,2,3-triazol .....	116
12.- 1-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ - D-glucopiranosil)-4- y 5-clorometil-1,2,3- triazol .....	117
13.- 1-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ - D-glucopiranosil)-4- y 5-hidroximetil-1,2,3- triazol .....	118
14.- 4,5-Bis(hidroximetil)-1-(2-acetamido-2-desoxi- 3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3- -triazol .....	119
15.- 1-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ - D-glucopiranosil)-4-bromometil-1,2,3-triazol.	120
16.- 4-Clorometil-1-(2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribo- furanosil)-1,2,3-triazol .....	121
17.- 4-Bromometil-1-(2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribo- furanosil)-1,2,3-triazol .....	122
18.- 4,5-Bis(clorometil)-1-(2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ - D-ribofuranosil)-1,2,3-triazol .....	123

IV.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CITOSTATICA "IN VITRO" ..	125
IV.A.- MATERIALES Y METODOS .....	125
1.- Origen de los productos utilizados ...	125
2.- Preparación del medio de cultivo .....	125
3.- Preparación de reactivos .....	126
4.- Mantenimiento de la línea celular .....	127
5.- Método de ensayo .....	127
IV.B.- RESULTADOS .....	131
TABLA VII .....	132
TABLA VIII .....	133
A P E N D I C E .....	134
ACTIVIDAD CITOSTATICA "IN VIVO" .....	135
C O N C L U S I O N E S .....	140
B I B L I O G R A F I A .....	146

I N T R O D U C C I O N

Dentro de los fármacos antitumorales de uso clínico, los agentes alquilantes, cuya aplicación data de 1946<sup>1</sup>, destacan por su utilidad en el control de determinadas situaciones neoplásicas. Estos agentes junto con los antimetabolitos actúan fundamentalmente sobre los ácidos nucleicos, ya sea alterando su estructura al intervenir en todas las fases del ciclo celular (agentes alquilantes) o bien interfiriendo alguna etapa de su biosíntesis (antimetabolitos) al delimitar su acción a fases concretas del ciclo.

En base a su estructura existen cinco tipos principales de agentes alquilantes: mostazas nitrogenadas, etil eniminas, alcanos sulfonatos, epóxidos y N-alkil-N-nitroso derivados. Químicamente se trata de compuestos electrófilos, cuya estructura contiene un grupo alquilo  $RCH_2-$ , en el que el radical R desempeña el papel de parte vectora, mientras que su unión a los centros nucleófilos biológicos  $R'-H$  se ha de realizar a través de un átomo de carbono saturado  $-CH_2-$ . Aunque las estructuras de los diversos tipos de agentes alquilantes difieren notablemente y a su vez estos pueden actuar por más de un mecanismo<sup>1a</sup>, en primera aproximación podemos considerar que todos ellos ejercen su acción mediante la formación previa de un ión carbonio  $-CH_2^+$ . Este carbocatión resulta muy reactivo frente a los centros nucleofílicos cargados negativamente tales como grupos carboxilo y fosfóricos, grupos tiólicos e hidroxílicos, ionizados todos ellos a pH fisiológico y grupos amino en for-

ma no disociada, que forman parte de muchas moléculas biológicas importantes, como ácidos nucleicos, enzimas, proteínas estructurales, lípidos y aminoácidos. Es evidente, por tanto, que los agentes alquilantes tienen la posibilidad de reaccionar con moléculas muy diversas dentro de la célula. No obstante, estudios del efecto de estos agentes a dosis mínimas han puesto de manifiesto que el DNA es la molécula más sensible a la alquilación (principalmente a nivel del N-7 de la guanina) y esta alteración es la que les debe conferir fundamentalmente el carácter antitumoral.

Sin embargo, esta acción citotóxica tan potente y de amplio espectro, adolece, en general de falta de especificidad para el tejido neoplásico y, debido a ésto, la quimioterapia se enfrenta en este campo con el problema de lograr una actividad más selectiva.

En un principio, la elevada actividad citostática de los agentes alquilantes hizo concebir esperanzas acerca de la posibilidad de encontrar un producto terapéuticamente útil contra el cáncer. Sin embargo un estudio muy completo de Schmidt y col.<sup>2</sup>, sobre los agentes alquilantes, publicado en 1965, afirmaba su falta de selectividad y hacía concebir pocas esperanzas sobre la obtención de un agente alquilante específico. Estudios posteriores han hecho reconsiderar este punto de vista<sup>3,4</sup> pesimista y han estimulado de nuevo<sup>2</sup> la investigación en este campo. De hecho algunos agentes alquilantes difieren ampliamente en sus efectos so

bre distintos tumores, como ejemplos se pueden citar la actividad selectiva de la ciclofosfamida y el merophan en el tratamiento del linfoma de Burkitt<sup>5,6</sup> o la especificidad de 5-aziridino-2,4-dinitrobenzamida sobre el tumor de Walker<sup>7</sup>.

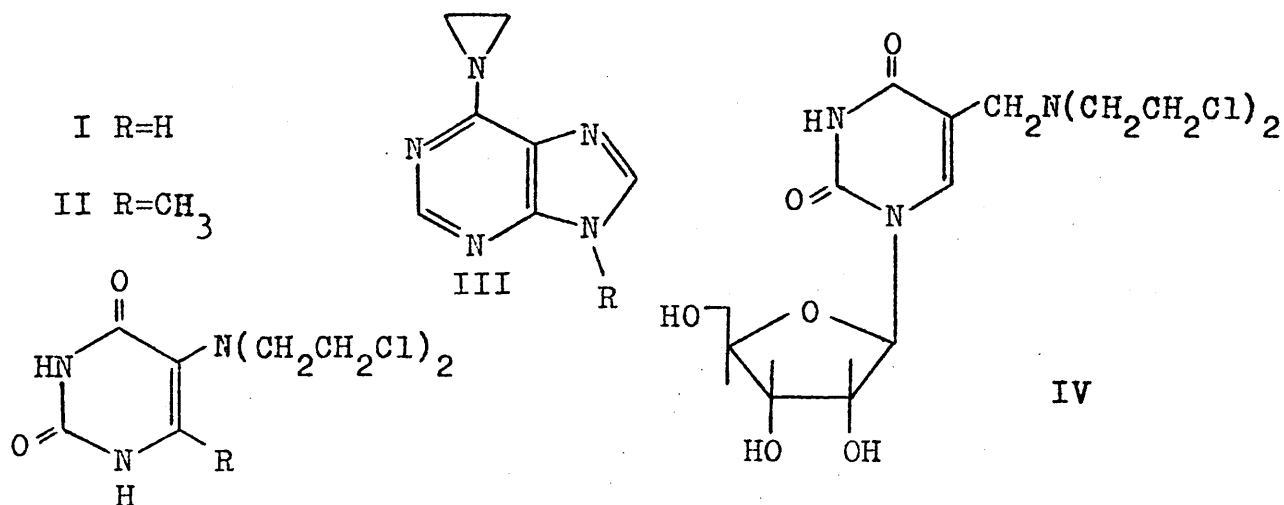
En esta memoria se recogen los resultados relativos a la síntesis y establecimiento de la estructura de una serie de nucleosidos de halometil-1,2,3-triazoles. También se da cuenta de los resultados de las actividades antitumorales "in vitro" e "in vivo" de los productos sintetizados y la relación existente entre la estructura de estos compuestos y su actividad biológica.

Este trabajo es parte de un plan más amplio que se viene desarrollando en el Instituto de Química Médica sobre la síntesis, evaluación de la actividad antitumoral y estudio del mecanismo de acción de distintos tipos de nucleosidos alquilantes.

P A R T E   T E O R I C A

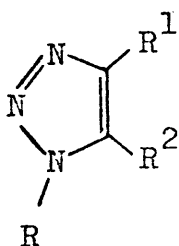
## I.- COMPUESTOS SELECCIONADOS. JUSTIFICACION

Una de las hipótesis que ha conducido a mejores resultados en el diseño racional de agentes alquilantes consiste en unir el resto alquilante a una estructura semejante o idéntica a las que la célula utiliza normalmente para su crecimiento y su mantenimiento. Como estructuras transportadoras se han utilizado aminoácidos naturales<sup>8,9</sup>, hidratos de carbono<sup>10,11</sup>, esteroides<sup>12</sup> y componentes de los ácidos nucleicos, tanto bases<sup>13,14</sup>, como nucleosidos<sup>15,16,17,18,19</sup> y nucleotidos<sup>17</sup>. Algunos derivados alquilantes de los componentes de los ácidos nucleicos presentan actividad anti-neoplásica. Así, el 5-(di-2-Cloroetil)-aminouracilo (mostaza de uracilo) (I) y su derivado 6-metilico (Dopan) (II) son efectivos contra tumores del sistema hematopoyético<sup>20,21</sup>, los 9-alkil y 9-ribofuranosil derivados de 6-(1-aziridinil)-purinas (III) presentan actividad contra adenocarcinoma 755<sup>15</sup>, y la 5-bis-(2-cloroetil)-aminometil uridina (IV) actúa contra la leucemia<sup>16</sup>.



Los agentes alquilantes que primero se descubrieron fueron las mostazas nitrogenadas, por ello fueron los compuestos más estudiados en principio y, por la misma razón los primeros agentes alquilantes llevaban un grupo mostaza nitrogenada como centro activo. Más tarde se comprobó que existían otros tipos de compuestos con capacidad alquilante, tales como las aziridinas, epóxidos, alcanosulfonatos o nitrosoureas que también mostraron citotoxicidad frente a una amplia gama de células en división rápida. Sin embargo, existen otros grupos alquilantes eficaces que se han utilizado poco como centros activos en drogas antineoplásicas. Dentro de este grupo se encuentran los haluros de tipo bencílico o alílico.

En la presente memoria, se ha estudiado la síntesis y actividad citostática de los nucleosidos alquilantes de fórmula general V en los que el centro alquilante, un halo



V

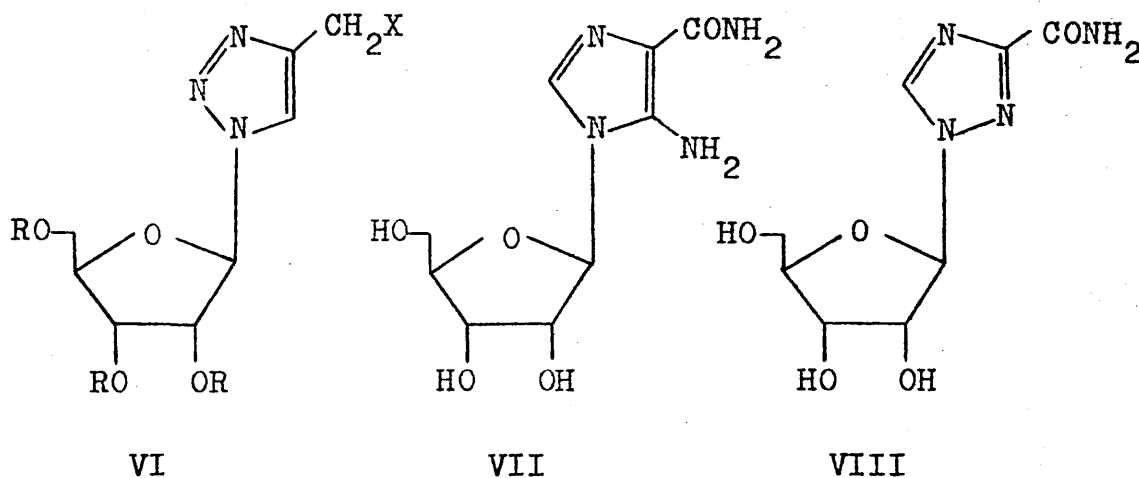
R = glicosilo, bencilo, H  
 R<sup>1</sup> = H, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>X  
 R<sup>2</sup> = H, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>X  
 X = halógeno

metil-1,2,3-triazol, es un haluro de tipo bencílico en el que el anillo bencénico se ha sustituido por uno heterocíclico de 1,2,3-triazol. Estas estructuras alquilantes re-

cuerdan las de las mostazas nitrogenadas en que ambas presentan la misma secuencia de átomos N-C-C-X (X = halógeno).

En los compuestos cuya síntesis se pretende, el resto alquilante  $-\text{CH}_2\text{X}$  se halla unido a una estructura nucleosídica formada por las bases de triazol y distintos azúcares: D-glucosa, D-2-glucosamina y D-ribose. Es de resaltar la gran semejanza estructural de los nucleosidos alquilantes de 1,2,3-triazol (VI) con el 5-amino-1- $\beta$ -D-ribofuranosilimidazol-4-carboxamida (VII) que es un intermediario clave en la biosíntesis de purinas<sup>22a</sup>, o con la ribavirina<sup>22b</sup> (virazol) (VIII) que es un nucleosido de 1,2,4-triazol empleado en clínica como agente antivirásico<sup>22c,d</sup>. Esto hace que nuestros compuestos al poseer un grupo vector tipo antimetabolito puedan desarrollar además una acción de este tipo, bloqueando por este mecanismo una determinada vía metabólica.

X = halógeno



## II.- REACCIONES DE CICLOADICION DIPOLAR-1,3 DE AZIDAS DE GLICOSILO

### 1.- Reacciones de cicloadición dipolar-1,3. Generalidades.

Debido a que los halometil-1-glicosil-1,2,3-triazoles y otros derivados de 1H-1,2,3-triazoles, cuya síntesis y propiedades se describen en esta memoria, fueron preparados por reacción de cicloadición de azidas de glicosilo, azida de bencilo y azida de trimetilsililo a derivados acetilénicos, hemos creído conveniente comenzar nuestro trabajo haciendo una breve exposición del estado actual de las cicloadiciones dipolares-1,3, concretándonos al caso particular de las reacciones de azidas con derivados acetilénicos.

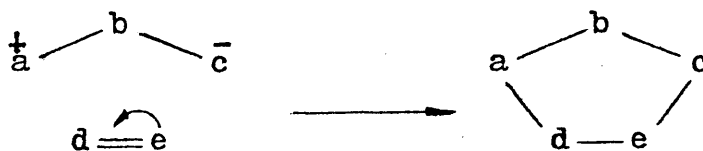
Se entiende por reacción de cicloadición aquélla en que se forma un ciclo a partir de dos o más productos de moléculas no saturadas sin que se originen, por eliminación, fragmentos pequeños en el proceso. Para que una reacción que conduce a la formación de un ciclo pueda clasificarse como tal, debe cumplir una serie de condiciones postuladas por Huisgen<sup>23a</sup>.

Las reacciones de cicloadición pueden clasificarse por el número de enlaces  $\sigma$  que se forman y subdividirse según el tamaño del anillo resultante y el número de átomos que contribuye a la formación del ciclo. Las reac-

ciones que nos ocupan, en las que se forman dos nuevos enlaces  $\sigma$ , pertenecen al subgrupo  $3 + 2 \rightarrow 5$ , puesto que son tres y dos el número de átomos de los productos de partida que conducen a un ciclo de cinco átomos.

Junto a la clasificación por el número de átomos de cada producto inicial que origina el ciclo, existe otra que se basa en el número de electrones que intervienen y en su naturaleza  $\sigma$  ó  $\pi$ <sup>24</sup>. En el caso de las cicloadiciones dipolares-1,3, sería  $4\pi + 2\pi$ , perteneciendo los cuatro electrones del dipolo-1,3 a tres orbitales  $\pi$  paralelos y los dos electrones al dipolarófilo.

Un dipolo-1,3<sup>23b</sup> es un compuesto que se representa mediante estructuras resonantes zwitteriónicas y que reacciona con compuestos de enlaces múltiples dando reacciones de cicloadición dipolar-1,3. Puede definirse<sup>23c</sup> como un sistema de tres elementos a-b-c en el que el átomo a posee un sextete electrónico y el átomo c un par de electrones sin compartir. La adición de este sistema a un dipolarófilo d=e, portador de un enlace múltiple, da lugar a la formación de un ciclo, tal como se representa a continuación:



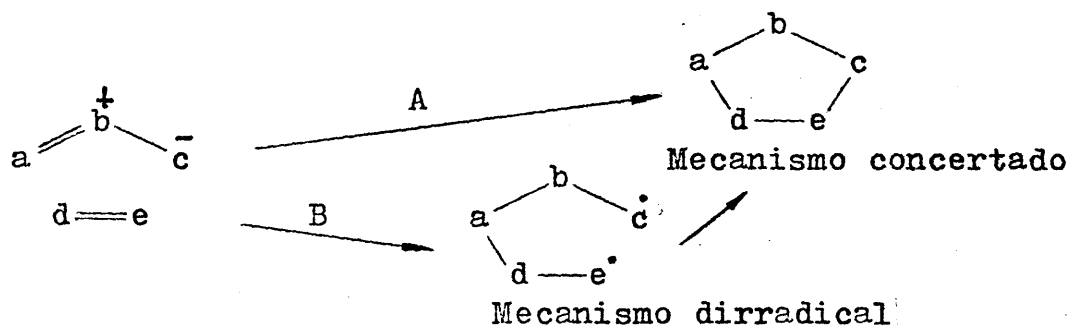
En su aspecto mecanístico las cicloadiciones dipolares-1,3 presentan una serie de características comunes entre las que pueden citarse las siguientes:

a) La velocidad de reacción no se ve afectada de forma notoria por la constante dieléctrica del disolvente empleado en la reacción.

b) Posee entalpías de activación bajas (5-10 Kcal/mol) y entropías de activación elevadas y negativas (-25 a -45 e.u.).

c) Cuando el dipolarófilo es una olefina se mantiene su estereoquímica.

El problema fundamental en cuanto al mecanismo es decidir si la reacción transcurre por un mecanismo concertado o por un mecanismo en dos pasos<sup>25,26,27,28</sup>.



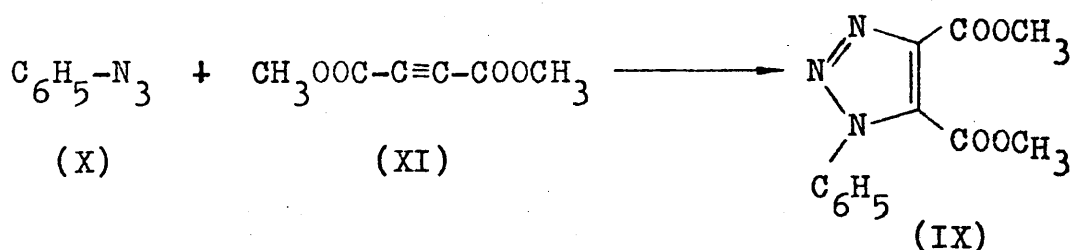
Por otra parte, hemos de destacar que el estudio de las reacciones de cicloadición se ha visto enormemente estimulado desde los trabajos de Hoffman y Woodward<sup>29</sup>, relativos a la conservación de la simetría de los orbitales en reacciones concertadas.

Finalmente, hemos de reconocer que hasta hace po-

co tiempo la regioselectividad de las reacciones de cicloa  
dición dipolares-1,3, ha sido uno de los problemas más di-  
fíciles de resolver. Recientemente Houk y col.<sup>30</sup> han propues  
to una solución para este problema. Estos autores utilizan  
el método de los orbitales frontera para racionalizar el  
efecto de los sustituyentes sobre las velocidades y la re-  
gioselectividad de las cicloadiciones dipolares-1,3.

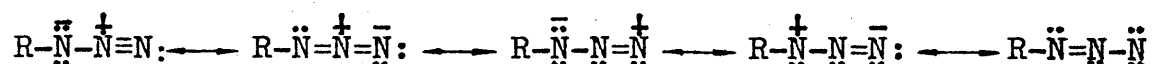
A continuación, y brevemente, nos referiremos al  
estado actual del conocimiento sobre las reacciones de ci-  
cloadición dipolar-1,3 de azidas de glicosilo.

La reacción de cicloadición de azidas orgánicas a  
acetilenos fue descubierta, en 1893, por Michael<sup>31</sup> al pre-  
parar 1-fenil-4,5-dicarboximetil-1,2,3-triazol (IX), por  
reacción de azida de fenilo (X) con el éster metílico del  
ácido acetilendicarboxílico (XI), poniendo así a punto un  
valioso método para la síntesis de 1,2,3-triazoles.



La representación de las azidas como híbridos de  
resonancia se debe, principalmente, a la necesidad de ex-  
plicar el bajo momento dipolar que poseen. Por otra parte,  
los estudios de Rayos X han establecido que las longitudes

de los enlaces N-N son intermedias entre la de enlace sencillo y doble y, doble y triple, respectivamente. Por tanto, la estructura de las azidas corresponde a un híbrido de resonancia entre las siguientes formas canónicas:



La hibridación  $sp$  de los enlaces  $\sigma$  del nitrógeno central conduce a una geometría lineal (dipolo-1,3 tipo propargil-alenilo) de la molécula en su estado elemental de más baja energía. Para que los átomos terminales del di polo-1,3 puedan ponerse en contacto con el enlace  $\pi$  del dipolarófilo en el transcurso de la cicloadición, se requiere una distorsión en la geometría lineal de la azida. El cálculo de orbitales moleculares muestra que tal distorsión es posible sin un gran consumo energético, cuyo valor es aproximadamente de unas 5 Kcal/mol.

Aunque en principio y en base a algunos experimentos realizados con azidas pueda parecer, como se ha llegado a afirmar, que el átomo de nitrógeno terminal es el cen tro electrófilo y el átomo de nitrógeno unido al radical orgánico es el nucleófilo, no puede tomarse esta afirmación en un sentido estricto, ya que, en general, resulta muy di fícil predecir el curso de la adición de azidas a derivados olefínicos o acetilénicos asimétricos. Ello es debido, como ya se dijo anteriormente, a que no tiene sentido asig

nar en un dipolo-1,3 un centro nucleófilo y electrófilo fijos. Este problema ha sido tratado mediante la teoría de OM<sup>28,29,30</sup>.

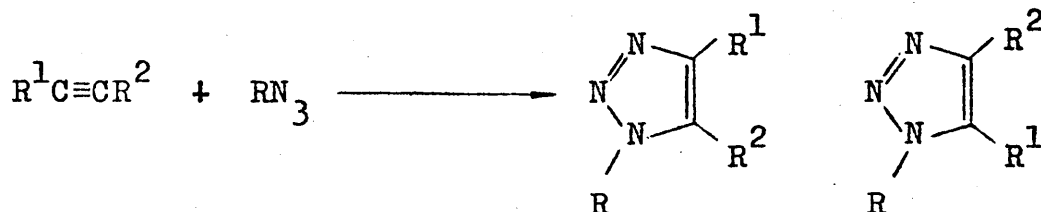
Las azidas orgánicas se han hecho reaccionar con diferentes dipolarófilos: alquenos, acetilenos, enaminas y éteres enólicos.

Seguidamente expondremos, de manera breve, las características más notables de las reacciones de cicloadición dipolar-1,3 entre azidas orgánicas y acetilenos para sintetizar derivados de 1,2,3-triazol.

La cicloadición térmica de azidas a acetilenos, es la ruta más versátil de síntesis de 1H-1,2,3-triazoles a causa de la gran variedad de sustituyentes que pueden tener los compuestos acetilénicos y las azidas. El mecanismo concertado de estas adiciones ha sido estudiado por L'abbé<sup>32</sup>, Sheradsky<sup>33</sup> y Huisgen<sup>28</sup>. Se han medido las velocidades de adición de la azida de fenilo a diferentes acetilenos<sup>34</sup>; las velocidades de formación de los triazoles aromáticos no son apreciablemente diferentes de las velocidades de cicloadición a las olefinas correspondientes; ésto indica que la energía del estado de transición no disminuye significativamente por la formación incipiente de un sistema aromático.

La reacción de cicloadición de azidas a acetilenos asimétricos puede conducir a dos triazoles isómeros (esquema I). El producto mayoritario suele ser el isómero

menos impedido estéricamente: en la adición a fenilacetileno, por ejemplo, el 4-fenil-triazol predomina frecuentemente en la mezcla de productos<sup>35,36,37</sup>



Esquema I

En general, la adición de acetilenos asimétricos tiende a dar, principalmente, isómeros en la posición-4 para los grupos atractores de electrones, e isómeros en la posición-5 para los grupos donadores de electrones<sup>38,39,40</sup>. Por ejemplo, la cicloadición de azidas a inaminas o etoxiacetilenos da lugar al triazol que tiene el grupo amino o etoxilo en posición-5; sin embargo, la cicloadición a ácido propiólico y propiolato de metilo conduce preferentemente al isómero sustituido en posición-4<sup>36</sup>

Un grupo muy voluminoso, como el trimetilsililo, tiende a ocupar la posición-4. La adición de azida de fenilo a feniltrimetilsililo conduce, casi exclusivamente, a 4-trimetilsilitriazol<sup>41</sup>. Esto puede ser de utilidad debido a la fácil eliminación del grupo trimetilsililo.

Otra forma de conseguir la adición regioespecífi-

ca a acetilenos terminales es utilizando el derivado de Grignard o el acetiluro en lugar de acetileno. Este tipo de reacciones, que transcurren en condiciones suaves conducen a triazoles 5-sustituídos; los sustituyentes adicionales pueden incorporarse en la posición-4 a través del intermedio organometálico.

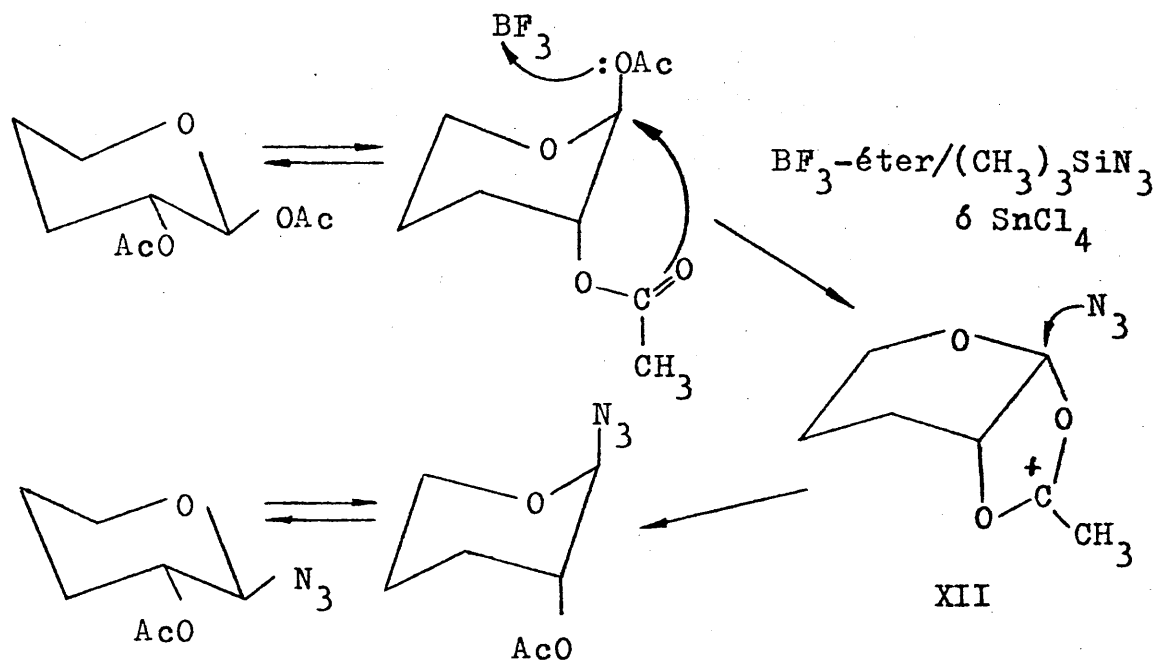
## 2.- Reacciones de cicloadición de azidas de glicosilo.

El procedimiento más general y de mejores resultados para la obtención de azidas orgánicas, es aquél que supone la reacción de un derivado halogenado adecuado con una azida metálica (azida de sodio o plata), en un proceso de sustitución nucleófila bimolecular que transcurre con inversión de la configuración del átomo de carbono en que se efectúa la sustitución.

Siguiendo este procedimiento Bertho<sup>42</sup> sintetizó por primera vez una serie de azidas de glicosilo haciendo reaccionar los correspondientes haluros de glicosilo con azidas metálicas<sup>43</sup>. También se preparan de forma similar las azidas de los aminoazúcares<sup>44</sup>, o las azidas de furanosilo, tales como la azida de tri-O-benzoil- $\alpha$ -D-xilofuranosilo<sup>45</sup> y la azida de 2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosilo<sup>46</sup>.

Un método de obtención mucho más favorable es el que transcurre mediante la azida de trimetilsililo, utilizado por Birkofer<sup>47</sup>. La azida de trimetilsililo reacciona,

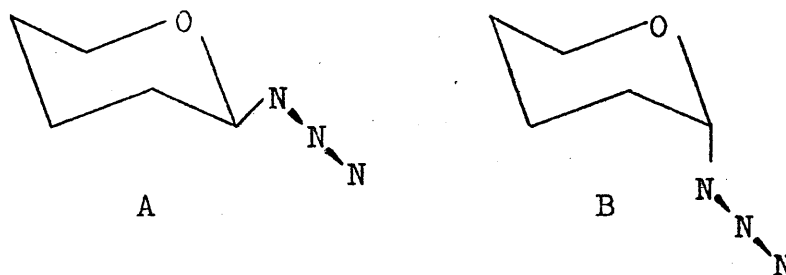
con facilidad, con cloruro o bromuro de glicopiranosilo acetilado para dar la azida de glicosilo correspondiente. Paulsen y col.<sup>48</sup> han modificado este procedimiento, y en vez de utilizar el derivado halogenado, parten de un derivado acetilado. Según este método, la reacción de tetra-O-acetil-aldopentopiranosas y penta-O-acetil-aldohexopiranosas con azida de trimetilsililo en presencia de trifluoruro de boro o tetracloruro de estaño, da lugar a las correspondientes azidas de glicosilo. Mediante este método, sólo se obtiene un anómero, aquél en el que el grupo azido está en posición trans respecto del grupo acetoxilo en C-2. El hecho de que el compuesto trans-1-OAc/2-OAc siempre conduce al producto trans-1-N<sub>3</sub>/2-OAc, permite suponer que durante la reacción se forma un producto intermedio, el ión acetoxonio (XII)<sup>49</sup>, que se abre en forma trans por la azida (esquema II). En la reacción de compuestos cis-1-OAc/2-OAc,



como en el caso de la tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-xilopiranososa o tetra-O-acetil- $\beta$ -D-arabinopiranososa, es posible que en primer lugar se produzca una anomerización al compuesto trans, catalizada por el trifluoruro de boro a tetracloruro de estaño. Después de esta anomerización, la reacción prosigue de la forma ya señalada. En otro caso debería producirse una sustitución nucleófila directa en el C-1 con inversión de la configuración. Los rendimientos de azidas de glicosilos son más reducidos en las reacciones con compuestos en los que la configuración de los sustituyentes en C-1 y C-2 es cis, que en aquéllos en los que dicha configuración es trans.

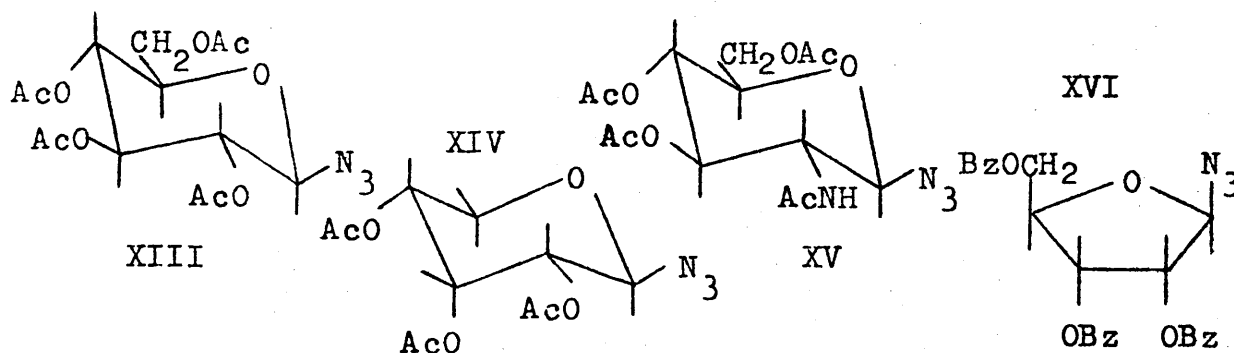
La obtención de azidas de glicosilo a partir de haluros de glicosilo y azida sódica, según Bertho<sup>42</sup>, conduce también, generalmente, a compuestos trans-1-N<sub>3</sub>/2-OAc<sup>50,51,52</sup>

El problema conformacional de las azidas de glicopiranosilo ha sido estudiado por Paulsen y col.<sup>48</sup>, quienes han llegado a la conclusión de que las conformaciones preferidas en estas azidas son las A y B.

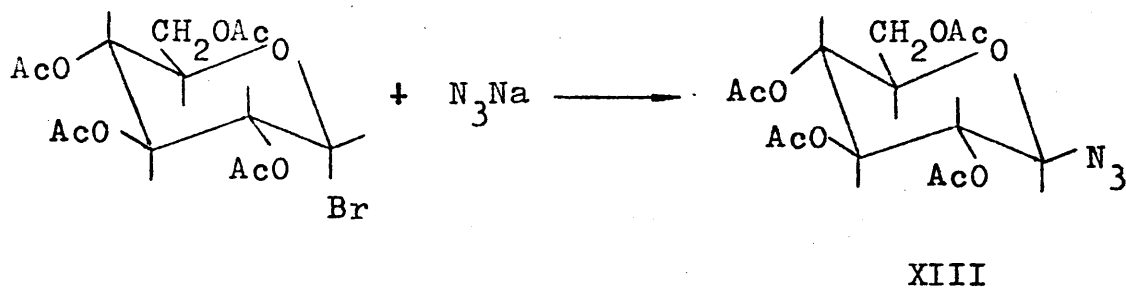


En nuestro trabajo hemos utilizado los siguientes

azidoazúcares: azida de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (XIII), azida de 2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosilo (XIV), azida de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (XV) y azida de 2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosilo (XVI).

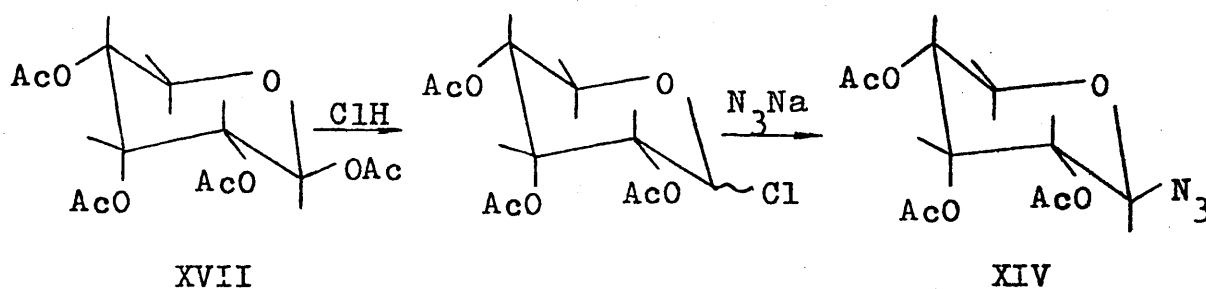


Las azidas XIII<sup>53</sup> y XV<sup>54</sup> se preparan, con excelentes rendimientos, a partir del bromuro de 1,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo y cloruro de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo y azida sódica en N,N-dimetilformamida, según se indica en el esquema siguiente para el derivado de glucosa.



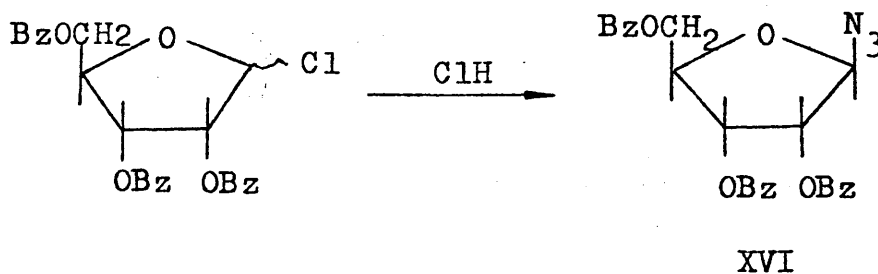
La azida XIV se obtuvo por dos procedimientos distintos. En el primer procedimiento la 1,2,3,4-tetra-O-ace-

til- $\beta$ -D-ribopiranososa (XVII) obtenida por un procedimiento análogo al de Zinner<sup>55</sup> y Kissman<sup>56</sup>, se transforma en el cloruro que a su vez reacciona con azida sódica en N,N-dimetilformamida para dar lugar a la azida de 2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosilo (XIV). Esta azida se ha sinteti-



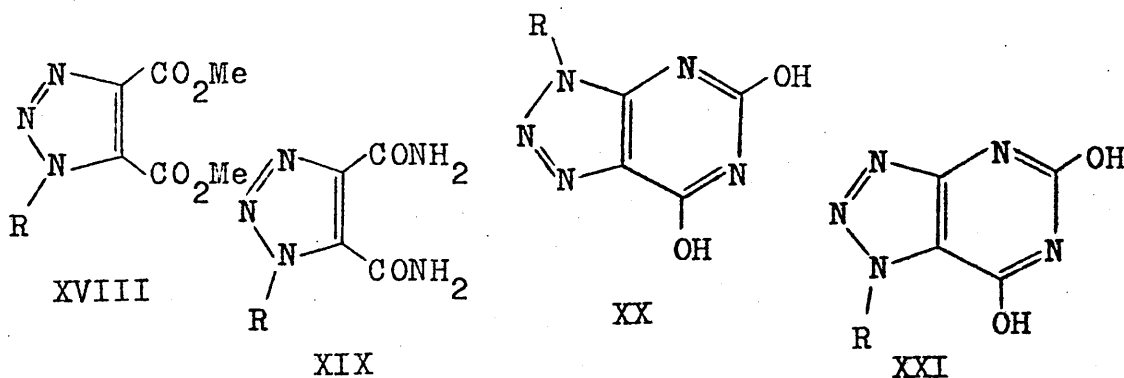
zado también por reacción de la 1,2,3,4-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-ribopiranososa (XVII) con azida de trimetilsililo en presencia de tetracloruro de estaño, siguiendo un procedimiento similar al de Paulsen<sup>48</sup>.

Por lo que respecta a la preparación de la azida de 2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosilo (XVI), se llevó a cabo por reacción de cloruro de 2,3,5-tri-O-benzoil-D-ribofuranosilo con azida sódica, siguiendo el procedimiento descrito por Carrington<sup>57</sup>. La configuración  $\beta$  de esta azida quedó demostrada por Baddiley<sup>58</sup> cuando la sintetizó por primera vez.



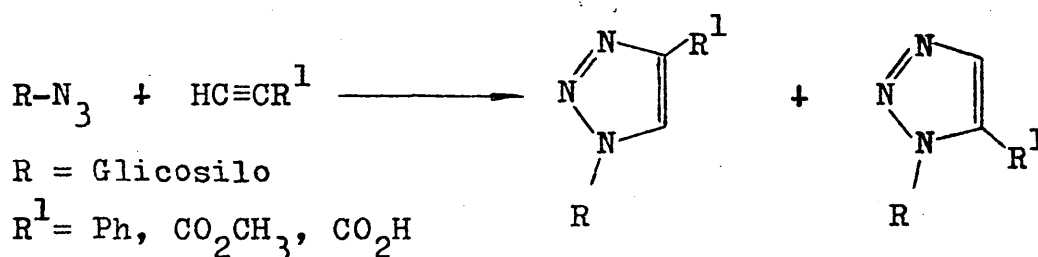
Las azidas de glicosilo han sido empleadas anteriormente como productos de partida para la síntesis de nucleosidos de 1,2,3-triazoles. Micheel y Baum<sup>59</sup> fueron los primeros en utilizar este método para sintetizar 4-fenil-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-gucopiranosil)-1,2,3-triazol, y el nucleosido desacetilado correspondiente, a partir de azida de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo y fenilacetileno.

El descubrimiento de que las bases de 8-azapurina, especialmente 8-azaguanina, actúan sobre distintos sistemas biológicos<sup>60</sup> ha estimulado grandemente la síntesis de nucleosidos de 1,2,3-triazol como intermedios hacia la síntesis de dichos derivados. Los azidoazúcares reaccionan con dimetilacetilendicarboxilato para dar N-glicosiltriazoles (XVIII, R = O-acetilglicosilo). Estos con amoníaco conducen a dicarboxamidas (XIX, R = glicosilo), que con hipobromito potásico se convierten en mezclas de 7- y 9-glicosilderivados de 8-azaxantina (XX y XXI, R = glicosilo)<sup>61</sup>.



En nuestro laboratorio, se han realizado una serie de trabajos sobre síntesis de N-glicosil derivados hetero-

cíclicos entre los que se encuentran algunos derivados de triazol, por reacción de cicloadición dipolar-1,3. Así, por ejemplo, las azidas de glicosilo se han hecho reaccionar con bencino para dar lugar a nucleosidos de benzotriazol<sup>62</sup>. Las azidas de glicosilo también han reaccionado con distintos acetilenos como fenilacetileno<sup>63</sup> (esquema III), propiolato de metilo y ácido propiólico<sup>36</sup> (esquema III).

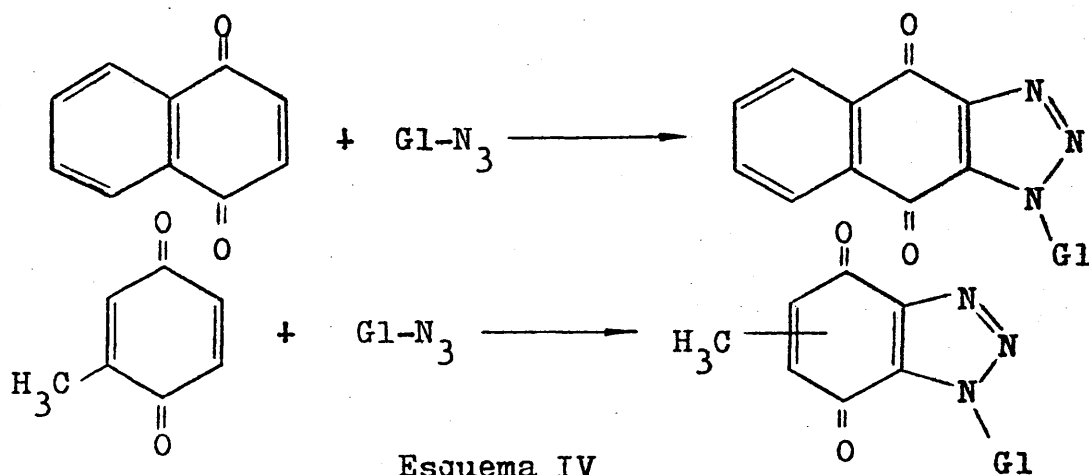


Esquema III

Posteriormente<sup>64</sup>, se ha realizado un estudio de las reacciones de azidas de glicosilo con diferentes nitro-olefinas  $\alpha$  -  $\beta$ -insaturadas ( $\beta$ -nitroestireno,  $\beta$ -bromo- $\beta$ -nitroestireno y  $\beta$ -nitroacrilato de n-butilo). Dependiendo de las condiciones de reacción se obtienen diferentes productos de condensación: N-glicosil-1,2,3-triazoles, N-glicosil-nitro-1,2,3-triazoles y 2-(glicosilamino)-nitroetilenos.

Por otra parte, y debido a la actividad anticancerosa de ciertos derivados quinónicos<sup>65</sup>, las azidas de glicosilo se han empleado para la síntesis de glicosil derivados de quinonas heterocíclicas mediante su reacción de cicloadición dipolar-1,3 a 2-metil-1,4-benzoquinona ó 1,4-naftoquinona<sup>66</sup> (esquema IV). Algunos de estos compuestos mues

tran una actividad citostática significativa frente a cultivos celulares.



Harmon y col.<sup>51,67</sup> llevaron a cabo la primera cicloadición dipolar-1,3 entre diferentes azidas de per-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo y N,N-dialquilamino-, etoxi- y etiltio- acetilenos. De estos estudios se desprende la importancia de la naturaleza del sustituyente del acetileno sobre el curso de la reacción. Por su parte, El Khadem y col. también han sintetizado diversos glicosil-1,2,3-triazoles por cicloadición de diversas azidas de glicosilo a fenilacetileno<sup>68</sup>.

Para la síntesis de nucleosidos de 1,2,3-triazol también se han empleado otros procedimientos. El más importante de ellos es el de glicosidación. Este método permite obtener, además de los nucleosidos N-1 sustituidos que se obtenían por el método de cicloadición de azidas de glicosilo, los nucleosidos sustituidos en N-2. Utilizando el mé

todo de fusión se han preparado diversos 1- y 2-ribofuranosil-1,2,3-triazoles<sup>69a</sup>, que se han empleado como bactericidas. Mediante el método de Hg(CN)<sub>2</sub>-nitrometano<sup>69b</sup> también se han preparado diversos derivados de 1-ribofuranosil-1,2,3-triazoles. Por otra parte, Witkowski y col.<sup>69c</sup> y Lehmkuhl y col.<sup>69d</sup> sintetizan 2-glicosil-1,2,3-triazoles y 1-glicosil-1,2,3-triazoles a partir del azúcar acilado correspondiente y v-triazoles (en su mayoría sustituidos en la posición-4) mediante el método de la fusión catalizada por ácido<sup>69e</sup>.

### III.- SINTESIS DE HALOMETIL-1,2,3-TRIAZOLES NO GLICOSIDICOS

La obtención de los derivados triazólicos alquilantes cuya síntesis y actividad citostática se describe en esta memoria, se planeó en dos etapas. La primera sería la preparación de una serie de derivados triazólicos sencillos, o compuestos modelo sobre los que se ensayarían las síntesis. Puesto que estos compuestos tendrían ya el resto activo halometil-1,2,3-triazol, también podrían indicar su posible actividad citostática. La comparación de las actividades de estos compuestos con las de los análogos glicosídicos que se sintetizarían posteriormente permitiría establecer relaciones estructura-actividad.

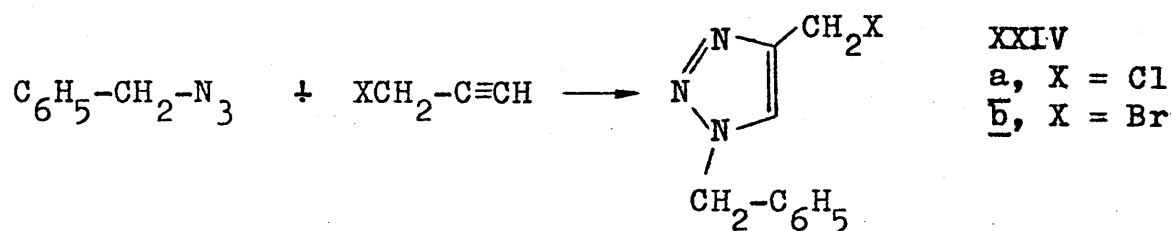
Los triazoles no glicosídicos cuya síntesis se pretende son los 1-bencil-halometil-1,2,3-triazoles y los halometil-1,2,3-triazoles no sustituidos. La obtención de estos últimos compuestos permitiría su glicosidación posterior y la posible obtención de N-1 y N-2 glicosil derivados.

#### 1.- Obtención de 1-bencil-halometil-1,2,3-triazoles.

Los triazoles alquilantes, cuya síntesis se describe a continuación, se obtienen mediante dos procedimientos distintos que tienen en común a) el empleo de azida de bencilo como producto de partida y, b) la reacción de cicloadición dipolar-1,3 a distintos acetilenos.

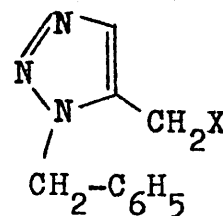
a) Por cicloadición de azida de bencilo a haluros de propargilo.

El primer procedimiento consiste en la cicloadición dipolar-1,3 de azida de bencilo a cloruro o bromuro de propargilo para dar lugar a los 1-bencil-4-halometil-1,2,3-triazoles (XXIV).



Debido a la reactividad frente a nucleófilos de haluros de propargilo y del halometiltriazol resultante (XXIV), la cicloadición se lleva a cabo en ausencia de humedad, calentando los dos reactivos en benceno anhidro. Debido a la asimetría del dipolarófilo (acetileno), en esta reacción podrían obtenerse dos productos, el 4-halometílico (XXIV) y el 5-halometílico (XXV).

La determinación de la estructura de los compuestos XXIV como los isómeros estéricamente menos impedidos, 1-bencil-4-halometil-1,2,3-triazoles, se realizó en base a sus datos analíticos y espectroscópicos. Los análisis elementales indicaron la formación del aducto correspondiente y la desaparición de la banda de azida a  $2200 \text{ cm}^{-1}$  en el espec-



XXV

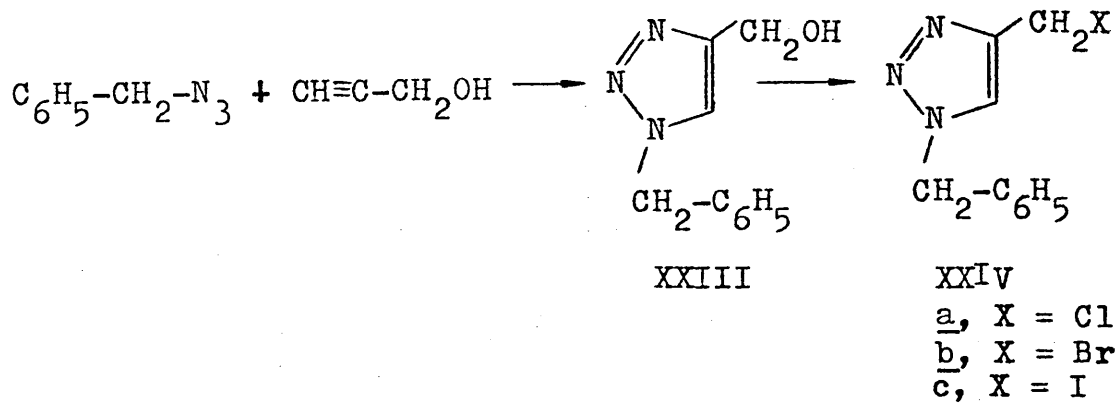
tro de i.r., indica que dicho aducto se había formado sobre el grupo azida.

La posición del sustituyente halometílico se determinó estudiando el desplazamiento en distintos disolventes (deuteriocloroformo y hexadeuteriodimetilsulfóxido) del protón triazólico H-4 ó H-5. En un estudio<sup>70</sup> sobre los desplazamientos químicos de los protones H-4 y H-5 de 1-metil-1,2,3-triazol y del H-5 del 4-bromo-1-metil-1,2,3-triazol, se ha puesto de manifiesto que el protón contiguo al átomo de nitrógeno sustituido es el más sensible a los efectos del cambio de disolvente y a la naturaleza del sustituyente. En la Tabla I, se incluyen los valores de los desplazamientos químicos de los protones H-5 de los 4-halometiltriazoles XXIV y de los protones H-4 y H-5 del 1-metil-1,2,3-triazol. También se incluyen los valores de  $\Delta\delta = \delta_{\text{DMSO}} - \delta_{\text{CDCl}_3}$  de estos protones. Como se ve en la Tabla I los desplazamientos químicos del protón triazólico de los compuestos XXIV son mucho más parecidos a los desplazamientos químicos en los mismos disolventes del protón H-5 del 1-metil-1,2,3-triazol que a los desplazamientos químicos del H-4. Por otra parte, los valores  $\Delta\delta$  del protón triazólico de los compuestos XXIV son del mismo signo y análoga magnitud a los valores  $\Delta\delta$  del protón H-5 del 1-metil-1,2,3-triazol. El valor algo mayor de  $\Delta\delta$  en los compuestos XXIV que en el 1-metil-1,2,3-triazol confirma la asignación hecha, ya que, como se ha mencionado más arriba, el desplaza

miento químico es muy sensible no sólo al cambio del disolvente sino también a la naturaleza del sustituyente que, en este caso, ha pasado de ser H en posición-4 a ser  $\text{CH}_2\text{X}$ . Esta asignación coincide con la de los 1-glicosil-halometil-1,2,3-triazoles cuya síntesis se describe más adelante. La determinación de las estructuras de estos glicosil derivados pudo hacerse con bastante seguridad, ya que en algunos casos se pudieron obtener los dos isómeros 4-halometílico y 5-halometílico.

b) Por halogenación de 1-bencil-4-hidroximetil-1,2,3-triazoles.

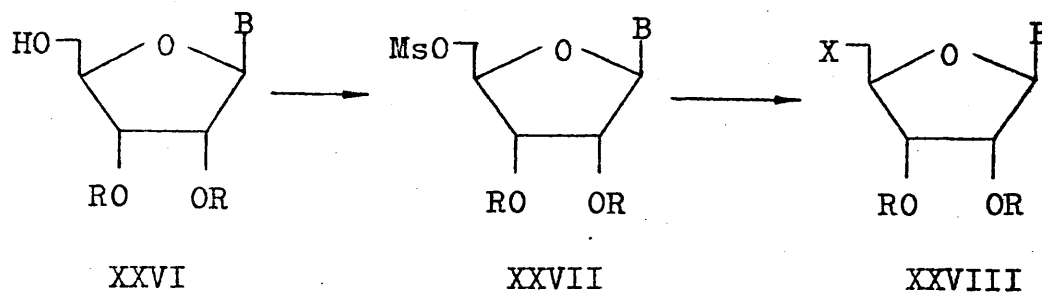
El segundo procedimiento de obtención de los 1-bencil-halometil-1,2,3-triazoles consta de dos pasos: el primero de ellos es la cicloadición de azida de bencilo a alcohol propargílico para dar el 1-bencil-4-hidroximetil-1,2,3-triazol (XXIII) conocido<sup>71</sup>. El segundo paso consiste en la halogenación de este hidroximetil derivado para dar los halometil derivados XXIV. Esta halogenación puede realizarse mediante diferentes procedimientos. Sin embargo, dichos métodos tienen que tener en cuenta dos limitaciones importantes. La primera de ellas es la natura-



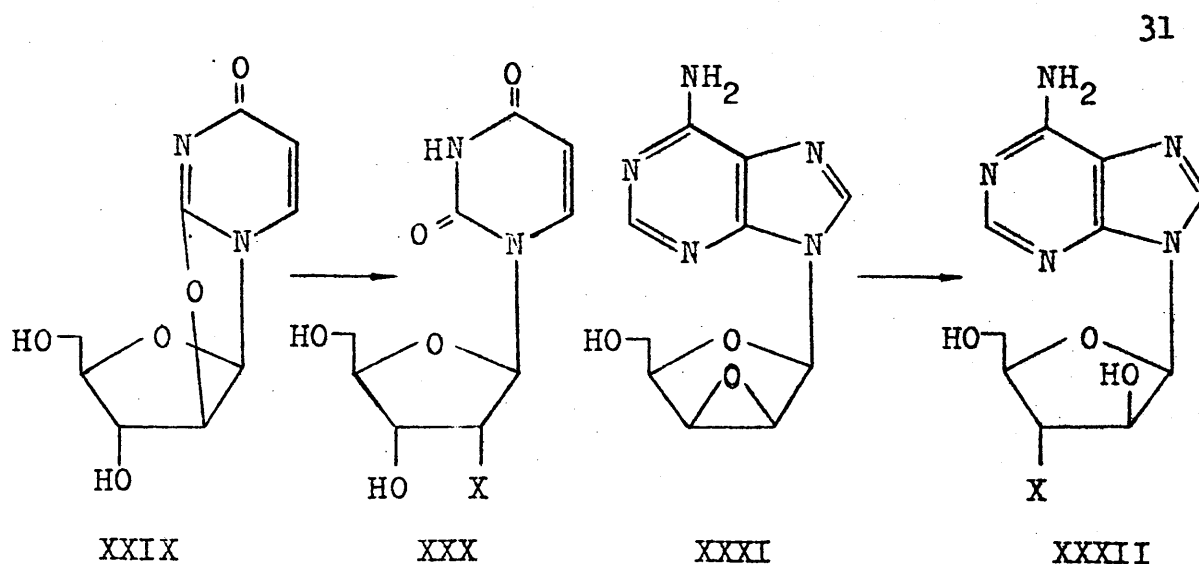
leza bencílica del grupo halometilo resultante, lo que le hace muy sensible a la presencia de nucleófilos. Esta limitación exige la ausencia de bases o de nucleófilos fuertes en el medio de reacción, y en los procesos de aislamiento y purificación. La segunda limitación es que, puesto que estos son estudios sobre compuestos modelo, el método que se aplique ha de ser válido para la obtención de los nucleosidos que se describen más adelante. La presencia de un resto de azúcar en estos últimos compuestos, que puede descomponerse a temperaturas elevadas o perder los grupos protectores en medios ácidos o básicos fuertes, exige también que las transformaciones se realicen en condiciones suaves y a pH próximo a la neutralidad. Debido a que las condiciones restrictivas para realizar la halogenación sobre nucleosidos son algo más severas de las que serían suficientes para la halogenación de los bencil derivados, la discusión que sigue sobre halogenación de grupos hidroximetilo se refiere a nucleosidos, ya que las condiciones de halogenación de éstos últimos son suficientes para la halogenación de los bencil triazoles y, lo contrario, pudiera no ser cierto.

La sustitución de un grupo hidroxilo por un átomo de halógeno, en el resto de azúcar de nucleosidos, es una transformación que se ha realizado mediante diversos procedimientos. El más utilizado para la halogenación de la posición 5' consiste en la esterificación de dicho

grupo hidroxilo (XXVI) para dar un ester p-toluensulfónico o metanosulfónico (XXVII), seguido de la reacción del nucleosido, protegido, con haluros alcalinos para dar los 5'-halonucleosidos (XXVIII)<sup>72,73</sup>. Otros procedimientos, tales como el de Vismeyer-Haak, que utilizan cloruro de tionilo y DMF<sup>74</sup>, o sus modificaciones que utilizan otros disolventes tales como hexametilfosforoamida<sup>75</sup>, realizan la halogenación directamente, pero requieren condiciones de reacción enérgicas o procesos de aislamiento y purificación poco recomendables por incluir tratamientos enérgicos con nucleófilos<sup>74,75</sup> (p. ej., agua).



La halogenación de los átomos de carbono secundarios del anillo de azúcar se ha realizado, también, por desplazamiento de p-toluensulfonatos o de metanosulfonatos con haluros alcalinos<sup>76,77</sup>, y por apertura de epóxidos (XXXI)<sup>78,79,80</sup> o de ciclonucleosidos (XXIX)<sup>81</sup> con iones haluro.



La halogenación de los grupos OH unidos directamente a la base requiere condiciones mucho más enérgicas<sup>83,84,8</sup> que en principio no parecen recomendables dada la reactividad de los compuestos cuya síntesis se pretende.

En los últimos quince años, se han desarrollado una serie de métodos generales de halogenación de entre los que destacan, el desarrollado por M.J. Robins<sup>86</sup> que utiliza haluros de pivaloilo como agentes halogenantes; el desarrollado por J.G. Moffatt<sup>87</sup>, que utiliza haluros de 2-aciloxiisobutirilo y, por último, el que emplea trifenilfosfina o trifenilfosfito en combinación con una fuente de halógeno. Por su accesibilidad, suavidad y versatilidad, hemos elegido este último método para la halogenación de los hidroximetil-1,2,3-triazoles preparados en la etapa anterior.

La halogenación mediante este procedimiento, puede realizarse con diferentes combinaciones de compuesto de fósforo, fuente de halógeno y disolvente. Por ejemplo, los derivados de fósforo son compuestos trivalentes





1-bencil-4-hidroximetil-1,2,3-triazol (XXIII), reacciona con trifenilfosfina-tetracloruro de carbono en acetonitrilo anhidro para dar el 4-clorometiltriazol (XXIVa) idéntico al obtenido en el apartado anterior. Análogamente, por reacción de XXIII con trifenilfosfito-bromo, en 1,2-dimetoxietano, se obtiene el 4-bromometiltriazol (XXIVb) idéntico al descrito anteriormente. Por último, por reacción de XXIII con trifenilfosfito-iodo en 1,2-dimetoxietano se obtiene el 1-bencil-4-iodometil-1,2,3-triazol (XXIVc) con buen rendimiento.

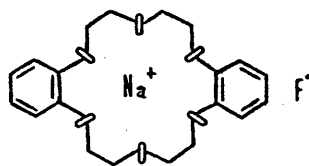
Las estructuras de estos compuestos se determinaron en base a sus datos analíticos, que indicaron la sustitución del grupo hidroxilo por un átomo de halógeno, y, espectroscópicos, especialmente r.m.n. (Tabla II) de acuerdo con el criterio mencionado en el apartado anterior<sup>90</sup>

La obtención del 1-bencil-4-fluorometil-1,2,3-triazol, también puede realizarse mediante reactivos halogenantes de fósforo análogos a los descritos, por ejemplo, el difeniltrifluorofosforano  $(C_6H_5)_2PF_3$ <sup>102,103</sup>. Esta transformación puede realizarse además, mediante otros reactivos como dietil-2-cloro-1,1,2-trifluoroetilamina<sup>102</sup>,  $Et_2NCF_2CFClH$ . Dicha fluoración, puede llevarse a cabo por reacción de un fluoruro metálico con un derivado halogenado mediante intercambio de halógeno, como se describe en la obra de R.D. Chambers "Fluorine in Organic Chemistry"<sup>102a</sup>. Sin embargo, estas reacciones suelen necesitar prolongados

calentamientos a temperaturas superiores a 100°C, lo que las hace poco aconsejables para la fluoración de nucleosidos.

En 1967, Pedersen<sup>104</sup> descubrió la utilidad de unos compuestos que él denominó "crown ethers" (éteres corona) para complejar cationes dejando, de esta forma, a sus aniones respectivos libres. Dichos aniones, al no estar enmascarados por cationes que los solvatan, tienen una nucleofilia y, en casos, una basicidad mucho mayor, lo que aumenta su reactividad. Estos aniones activos, no solvatados, pueden reaccionar mediante sustitución nucleófila con distintos compuestos, entre ellos, haluros de alquilo y, más concretamente, los 4-halometil-1,2,3-triazoles (XXIV) descritos anteriormente para dar lugar a los correspondientes 4-fluorometil-1,2,3-triazoles (XXIVd). Los éteres corona<sup>104a</sup> son poliéteres cíclicos compuestos por una serie de unidades  $(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n$  que se repiten hasta cerrar un ciclo. Para que estos compuestos ejerzan su actividad complejante de cationes, no es imprescindible que el heteroátomo sea oxígeno, ya que también puede ser S, N y P.

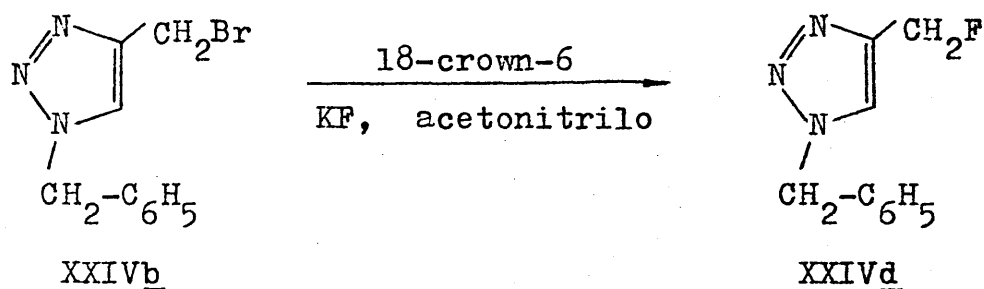
Los complejos pueden ser de varios tipos<sup>104a</sup>. Por ejemplo, el complejo entre el catión sodio y dibenzo-18-crown-6, se representa en la figura. En general, el fenómeno de la forma



ción del complejo es un proceso del tipo ácido de Lewis-base de Lewis. Los heteroátomos básicos rodean al catión y, entre ellos se establece una interacción electrostática que es aproximadamente igual entre cada heteroátomo y el metal.

En general, estas reacciones<sup>105</sup> transcurren en condiciones suaves y pueden realizarse en el seno de acetonitrilo, que además de disolver al KF no afecta a los grupos halometílicos de los nucleosidos alquilantes de partida.

Según este esquema de reacción, el tratamiento del 4-bromometil-triazol (XXIVb) con fluoruro potásico anhidro<sup>105</sup> y 18-crown-6 en el seno de acetonitrilo anhidro, da lugar a la formación del 4-fluorometil-triazol (XXIVd).



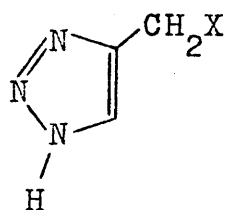
La estructura de este compuesto, que resultó ser inactivo frente a células HeLa, se determinó siguiendo los criterios mencionados anteriormente, a partir de sus datos analíticos y espectroscópicos. No obstante, hay que resaltar que en el espectro de r.m.n., la señal corres

pondiente a los protones del grupo  $\text{CH}_2\text{F}$ , que en los compuestos anteriores aparece como un singlete, en este caso aparece desdoblada formando un doblete, por acoplamiento con el átomo de fluor, cuya constante es  $J_{\text{CH}_2\text{F}} = 50 \text{ Hz}$ . Análogamente, el protón H-5 triazólico también aparece como un doblete por un acoplamiento de tipo alílico con el átomo de fluor. Sin embargo, en este caso, la constante es mucho menor:  $J_{\text{H-5, F}} = 2 \text{ Hz}$ .

## 2.- Obtención de $\gamma$ -triazoles.

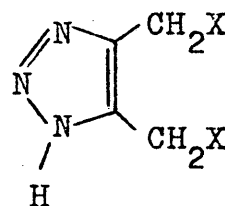
La síntesis de derivados triazólicos no sustituidos en los átomos de nitrógeno era el segundo objetivo dentro de este apartado de síntesis de derivados no glicosídicos.

Los compuestos concretos cuya síntesis se pretendía son los de fórmulas XXXVI y XXXVII



XXXVI

X = Cl, Br, I



XXXVII

La obtención de estos compuestos se considera importante ya que permitiría establecer relaciones estructura-actividad más completas al poderlos comparar con los 1-glicosil- y los 1-bencil derivados. Por otra parte, los

compuestos XXXVI y XXXVII podían a su vez ser glicosidados dando lugar a N-1 y N-2 glicosil derivados, lo que permitiría de nuevo, establecer relaciones estructura-actividad entre los dos tipos de sustituciones N-1 y N-2.

Una búsqueda bibliográfica demostró que ninguno de los compuestos de fórmulas XXXVI y XXXVII había sido descrito a pesar de la sencillez de su estructura. La síntesis de estos compuestos se planteó según tres aproximaciones distintas.

a) Por cicloadición de trimetilsililazida a halometilacetenos.

El primer procedimiento, consiste en la cicloadición de trimetilsililazida a halometilacetenos. Dicha azida<sup>47</sup> es un reactivo de gran importancia para la síntesis de triazoles no sustituidos sobre nitrógeno, ya que es un producto comercial estable y puede usarse en sustitución del ácido hidrazóico, evitándose de esta manera los riesgos de dicho ácido. El producto de las cicloadiciones de azida de trimetilsililo a los acetilenos es un N-trimetilsilil-triazol, preferentemente el derivado N-2 sustituido. El grupo trimetilsililo se elimina fácilmente, generando el triazol no sustituido, por tratamiento con disolventes prácticos (p. ej. metanol). Las condiciones experimentales de reacción suelen implicar un calentamiento a temperaturas elevadas de la mezcla de reacción.

La reacción, en tubo cerrado, de una mezcla

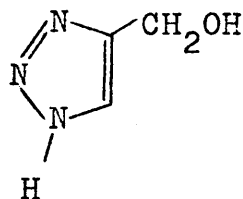
equimolecular de azida de trimetilsililo y bromuro de propargilo para dar 4(5)-bromometil-v-triazol se llevó a cabo en diferentes condiciones experimentales. La temperatura de calefacción osciló entre 90 y 160°C durante 13 a 18 horas. El empleo de temperaturas superiores a 110°C produce la carbonización de la mezcla de reacción. Cuando la reacción se realiza a 90°C se obtienen sirupes espesos muy poco solubles, que por tratamiento con metanol, con el fin de romper el enlace N-Si, no variaron. El estudio de estas sustancias, mediante las espectroscopías de r.m.n. e i.r., indicó que podía tratarse de sustancias poliméricas.

La reacción de la trimetilsililazida con cloruro de propargilo en condiciones análogas condujo a similares resultados.

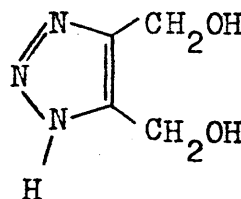
b) Por halogenación de hidroximetil-v-triazoles.

El segundo procedimiento consiste en la halogenación de hidroximetil-v-triazoles, obtenidos previamente por cicloadición de azida a hidroximetilacetalenos.

El primer paso de este proceso fue la síntesis de los hidroximetil-v-triazoles XXXVIII y XXXIX. Estos compuestos se obtuvieron calentando a reflujo una mezcla equi



XXXVIII



XXXIX

molecular de trimetilsililazida y alcohol propargílico o 1,4-di-hidroxi-butino. Los rendimientos de estos productos, que se obtuvieron por separación cromatográfica, fueron muy bajos. La estructura del compuesto XXXVIII se determinó mediante sus espectros de r.m.n. y de masas, ya que en su análisis elemental los datos correspondientes a los porcentajes calculados no fueron totalmente concordantes con los porcentajes teóricos de los elementos. La estructura de XXXIX se determinó en base a sus datos analíticos y espectroscópicos de r.m.n. y masas.

De estos dos hidroximetil-v-triazoles se intentó la bromación del derivado XXXIX, que era el más estable. La bromación se intentó mediante el procedimiento empleado anteriormente, es decir, fosfito de trifenilo y bromo en 1,2-dimetoxietano y, también mediante tribromuro de fósforo en acetona anhidra<sup>106</sup> a temperatura ambiente durante la noche. En ambos procedimientos desaparece el producto de partida formándose un producto nuevo en forma de jarabe rojizo que al ser cromatografiado se descompone con gran facilidad. Por ello, el producto formado en las reacciones de bromación no pudo ser identificado.

También se intentó la cloración de XXXIX con tetracloruro de carbono y trifenilfosfina en acetonitrilo<sup>90</sup> y condujo a resultados análogos a los obtenidos en la bromación.

c) Por hidrogenólisis de 1-bencil-1,2,3-triazoles.

El tercer procedimiento para la obtención de y-triazoles es la eliminación del grupo bencilo de los halometil-1-bencil-1,2,3-triazoles. La eliminación del grupo bencilo puede realizarse por varios procedimientos, por ejemplo, por reducción con sodio o amoníaco líquido<sup>107a</sup>, por reducción catalítica<sup>107b</sup>, calentando en piperidina<sup>107c</sup> y por oxidación con ácido crómico<sup>107d</sup>.

Es conocido que los ésteres, éteres y aminas bencílicos pueden ser hidrogenolizados dando lugar a tolueno y un ácido, alcohol o amina, cuando el compuesto bencílico se hace reaccionar en atmósfera de hidrógeno y en presencia de un catalizador.<sup>107b</sup> De todos estos procedimientos el único que puede utilizarse, debido a la labilidad del grupo halometílico, es la hidrogenolisis del grupo bencílico.

Por ello se pensó que los bencil-1,2,3-triazoles preparados en el apartado anterior podrían utilizarse como productos de partida para la preparación de halometil-y-triazoles. Esta aproximación ya se ha utilizado para síntesis del y-triazol<sup>108</sup>. Sin embargo, en nuestro caso tenía el inconveniente de que los átomos de halógeno son de naturaleza bencílica, lo que hace que también pudieran hidrogenolizarse antes, o al mismo tiempo que los grupos N-bencílicos.

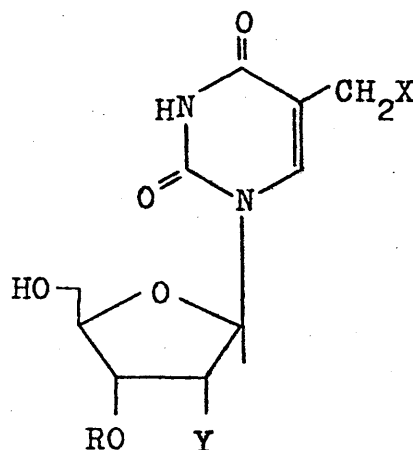
La hidrogenolisis se intentó, sin éxito, en distintas condiciones experimentales. Como catalizadores se emplearon óxido de platino y paladio, como disolventes

acetato de etilo, ácido acético y etanol. Los tiempos de reacción oscilaron de uno a tres días; las temperaturas desde la ambiente hasta 100°C y las presiones de hidrógeno desde la atmosférica hasta 5 atm. En las condiciones ensayadas, los 1-bencil-4-clorometil-1,2,3-triazol (XXIV<sub>a</sub>) y 1-bencil-4-bromometil-1,2,3-triazol (XXIV<sub>b</sub>), se recuperaron inalterados, no observándose ninguna reacción del producto inicial.

## IV.- SINTESIS DE HALOMETIL-1-GLICOSIL-1,2,3-TRIAZOLES

Se ha descrito la síntesis de algunos derivados halometílicos de las bases de ácidos nucleicos<sup>13</sup>, pero sólo se conocen algunos ejemplos halometílicos de nucleosidos<sup>16,18</sup>. Estos últimos derivados se han preparado a partir de timidina (XL), haciéndola reaccionar con NBS para dar XLI o a partir del derivado XLII haciéndole reaccionar con HBr para dar XLIII.

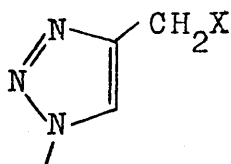
- XL      X = H, Y = H, R = OAc  
 XLI     X = Br, Y = H, R = OAc  
 XLII    X = OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, Y = OBz, R = Bz  
 XLIII   X = Br, Y = OBz, R = Bz



Los nucleosidos alquilantes halometil-1-glicosil-1,2,3-triazoles, cuya síntesis se describe a continuación, se obtienen utilizando dos procedimientos distintos.

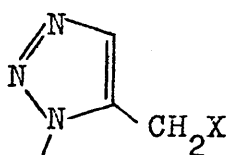
El primer procedimiento consiste en la cicloadición dipolar-1,3 de las azidas de glicosilo: 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (XIII), azida de 2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosilo (XIV), azida de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (XV) y azida de 2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosilo (XVI) con halometilacetilenos. Cuando dichos halometilacetilenos son cloru

ro o bromuro de propargilo, se obtienen los 4- y 5-halometil-1-glicosil triazoles XLIV y XLV (X = Cl, Br) respectivamente. Cuando dichos halometil acetilenos son 1,4-dicloro- ó 1,4-dibromobutino, se obtienen los 4,5-bis(clorometil)- ó 4,5-bis(bromometil)-1,2,3-triazoles XLVI (X = Cl, Br).



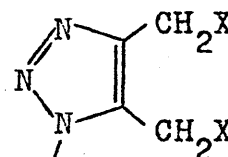
Glicosilo

XLIV



Glicosilo

XLV



Glicosilo

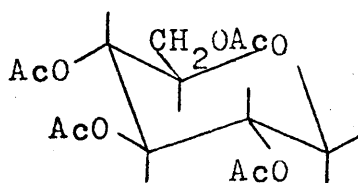
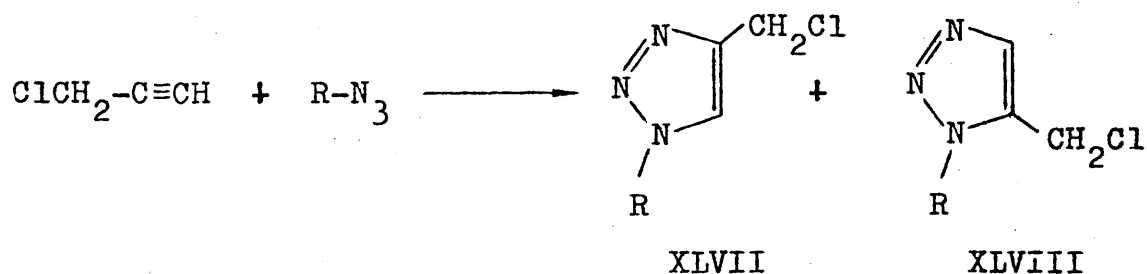
XLVI

El segundo procedimiento de obtención de los nucleosidos alquilantes XLIV, XLV y XLVI consta de dos pasos. El primero de ellos es la cicloadición dipolar-1,3 de una de las azidas de glicosilo, antes mencionadas, XIII, XIV, XV y XVI con alcohol propargílico para dar los 4- y 5-hidroximetil-1,2,3-triazoles XLIV y XLV (X = OH), o con 1,4-dihidroxi-butino para dar 4,5-bis(hidroximetil)-1,2,3-triazoles XLVI (X = OH). El segundo paso consiste en la halogenación de estos hidroximetil derivados mediante reactivos halogenantes de trifenilfosfina y trifenilfosfito para dar los halometil derivados XLIV, XLV y XLVI (X = Cl, Br, I).

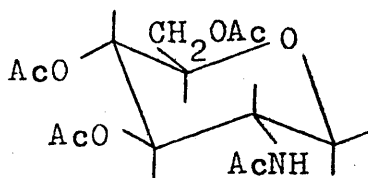
- 1.- Obtención de 1-glicosil-halometil-1,2,3-triazoles por cicloadición de azidas de glicosilo y haluros de propargilo.

Se ha estudiado la síntesis de nucleosidos alquilantes con un solo grupo halometilo, llevándose a cabo las reacciones de cicloadición dipolar-1,3 de las azidas de glicosilo: azida de 2,3,4,6-tetra-0-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (XIII), azida de 2,3,4-tri-0-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosilo (XIV), azida de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-0-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (XV) y azida de 2,3,5-tri-0-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosilo (XVI) con cloruro de propargilo. Debido a la facilidad con que este cloruro se hidroliza, estas reacciones se han llevado a cabo en ausencia de humedad, calentando los dos reactivos en el seno de tolueno anhidro. A causa de la asimetría del dipolarófilo, se obtienen los dos productos XLVII y XLVIII que cabía esperar. No obstante, el 4-clorometil derivado XLVII, menos impedido estéricamente, predomina sobre su isómero, el 5-clorometil derivado XLVIII. En el caso de la cicloadición de la 2,3,5-tri-0-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosil azida (XVI) únicamente se obtuvo el isómero 4-clorometílico XLVIIe. La cicloadición de la azida de tri-0-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosilo (XIV), condujo después de separación cromatográfica a dos bandas. De una de ellas se aisló el 4-clorometil derivado XLVIIc, de la otra, que resultó ser homogénea en varias mezclas de disolventes, se aisló una mezcla de dos productos isómeros. El estudio del espectro de r.m.n. de esta mezcla reveló que dichos productos podrían ser, 5-clorometil-1-(2,3,4-tri-0-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosil)-1,2,3-triazol (XLVIIIc) y 4-clo

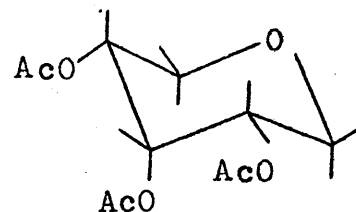
rometil-1-(2,3,5-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribofuranosil)-1,2,3-triazol (XLVIId). Este último producto se forma por contracción del anillo de piranosa a furanosa, ya sea sobre la azida o sobre el nucleosido resultante. En la bibliografía existen algunos antecedentes de este tipo de contracciones<sup>109</sup> que normalmente están catalizadas por ácido. En nuestro caso pueden formarse trazas de ácido mediante hidrólisis parcial del haluro de propargilo.



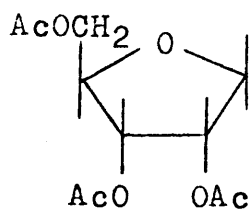
R = a



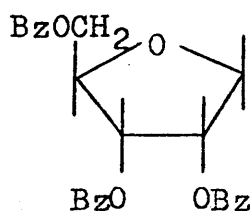
R = b



R = c



R = d



R = e



$-\text{CH}_2\text{X}$ . A pesar de la reducida nucleofilia de dicho grupo amida, la gran reactividad del grupo  $-\text{CH}_2\text{X}$  que es de tipo propargílico, o bien bencílico, si ya se ha formado el triazol, unido a la elevada temperatura de la reacción (reflujo de tolueno) puede favorecer dicho ataque.

La separación y purificación de los productos obtenidos en todas las reacciones descritas en esta memoria, se realizó mediante cromatografía de capa fina preparativa.

Los procesos de aislamiento y purificación de todos los halometil-1,2,3-triazoles descritos, han de llevarse a cabo con rapidez y en ausencia de humedad, ya que debido a su carácter bencílico, se descomponen fácilmente. De hecho, el paso del tiempo y la presencia de humedad produce oscurecimiento y descomposición de estos productos. Esta alteración se ha comprobado experimentalmente en el caso de XLIXa, ya que al registrar un espectro de r.m.n. en DMSO seco, se obtiene el espectro correspondiente a un producto único puro. Sin embargo, al añadir una gota de agua a esta disolución y volver a registrar el espectro se observa, además de las bandas correspondientes a XLIXa la aparición de otros conjuntos de señales.

Las estructuras de los productos obtenidos se determinaron a partir de sus datos analíticos y espectroscópicos. Los análisis elementales indicaron la formación del aducto correspondiente y la desaparición de la banda

de azida a  $2200\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de i.r. indicó que la azida había reaccionado para dar el triazol.

Los aspectos a determinar en la estructura de estos productos son: la posición del sustituyente halometílico en 4 ó 5 del anillo de triazol y la conformación y configuración del resto de azúcar.

La posición del sustituyente halometílico se determinó estudiando el desplazamiento químico, en distintos disolventes, del protón H-4 ó H-5 del triazol como se indicó anteriormente<sup>70</sup> para los 1-bencil-1,2,3-triazoles. En las Tablas III, IV, V y VI se incluyen los valores de los desplazamientos químicos de los protones H-4 y H-5 de los productos XLVII, XLVIII, XLIX y L, registrados en deuterio cloroformo y en dimetilsulfóxido- $d_6$ . También se incluyen los valores  $\Delta\delta$  ( $\Delta\delta = \delta_{\text{DMSO}} - \delta_{\text{CDCl}_3}$ ).

Como se ve en dichas Tablas,<sup>3</sup> en aquellos casos en que se dispuso de los dos isómeros, se registraron sus espectros en los dos disolventes mencionados, y se asignó la estructura de 1-glicosil-4-halometil-1,2,3-triazol a aquellos compuestos en los que el valor  $\Delta\delta$  fue más elevado ( $\Delta\delta \approx 0,6\text{ ppm}$ ); ya que este hecho es una prueba evidente de una mayor influencia de la naturaleza del disolvente sobre el desplazamiento químico del protón triazólico (H-5 en este caso). Lógicamente a los otros compuestos con valores  $\Delta\delta < 0,2\text{ ppm}$  se les asignó la estructura de 5-halometil derivados. Cuando sólo se obtuvo uno de los dos isómeros,

como en el caso de los derivados de triacetilribopiranososa, tribenzoilribofuranosa y tetraacetilglucosamina, se hizo siguiendo el mismo criterio. En estos casos el valor  $\Delta\delta \approx 0,66-0,70$  ppm del desplazamiento del protón triazólico, indicó que dicho protón era contiguo al nitrógeno sustituido y, por tanto, que se trataba de los 1-glicosil-4-halometil-1,2,3-triazoles XLVIIe, XLIXc y XLIXe.

Esta asignación también puede realizarse a partir de los espectros de r.m.n. de una pareja de isómeros 4- ó 5-halometílicos en un solo disolvente, ya que el protón H-5 triazólico de los derivados 4-halometílicos resuena siempre a campo más bajo que el protón H-4 del correspondiente isómero 5-halometílico.

La conformación de silla C-1 de los N-glicopiranosidos se determinó mediante la espectroscopía de r.m.n. a partir de sus constantes de acoplamiento. Así, en los casos de los derivados de glucosa y glucosamina, los elevados valores de las constantes de acoplamiento de los protones del resto de azúcar  $J = 9-10$  Hz, indica que dichos protones ocupan posiciones axiales, que sólo son compatibles con una conformación C-1. Por otra parte, en los derivados de ribopiranososa, el elevado valor de la suma total de acoplamientos del protón H-4 ( $J_{3',4'} + J_{4',5'ax.} + J_{4',5'ec.} \approx 19$  Hz) es sólo compatible con una disposición axial de dicho protón y, por tanto, con una conformación C-1.

La configuración anómera de todos los N-glicopi-

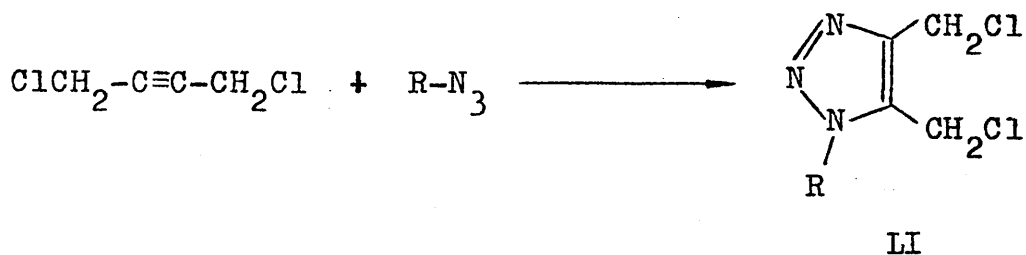
ranosil-1,2,3-triazoles también se determinó mediante la espectroscopía de r.m.n., a partir de las constantes de acoplamiento  $J_{1',2'} = 8,5-10$  Hz que indican, una vez fijada la configuración C-1 de estos azúcares de la serie D, que dichos nucleosidos alquilantes tienen configuración anómera  $\beta$ . La configuración anomérica de XLVII<sub>e</sub> y XLIX<sub>e</sub> no pudo establecerse definitivamente mediante r.m.n., puesto que el valor de las constantes de acoplamiento  $J_{1',2'} = 3$  Hz para XLVII<sub>e</sub> y para XLIX<sub>e</sub> está comprendido en un intervalo de valores que puede corresponder tanto a anómeros  $\alpha$  como  $\beta$  en D-ribofuranosil derivados<sup>72</sup>. Sin embargo, dichas configuraciones se asignaron como  $\beta$ , iguales a la de la azida de partida, porque en una reacción de cicloadición no es de esperar que se produzcan anomerizaciones. De hecho, en otras reacciones de cicloadición realizadas en el nuestro<sup>36,63,64,66</sup> y en otros laboratorios<sup>51,67</sup> nunca se ha observado anomerización.

Los espectros u.v. de los 4-halometil y de los 5-halometil derivados son análogos y no pueden emplearse para la distinción entre ambos tipos de compuestos.

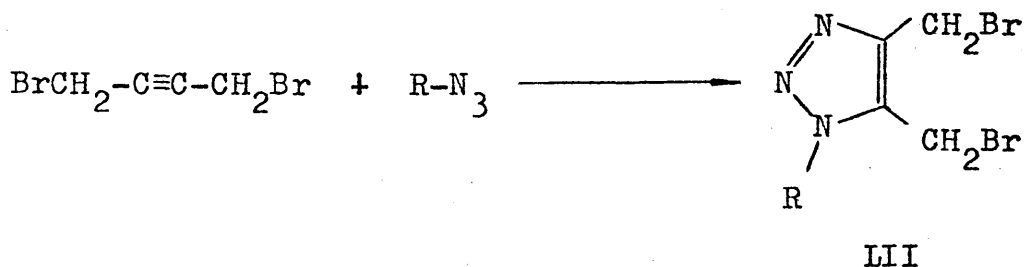
## 2.- Obtención de 1-Glicosil-bis(halometil)-1,2,3-triazoles por cicloadición de azidas de glicosilo a 1,4-dihalobutinos.

Siguiendo un proceso análogo al descrito anteriormente se ha estudiado la reacción de cicloadición entre

las azidas de glicosilo XIII, XV y XVI con 1,4-diclorobutino y 1,4-dibromobutino, que dieron lugar a los triazoles LI y LII respectivamente. Debido a la simetría del dipolarófilo, en estas reacciones sólo se obtiene un producto de cicloadición. Las reacciones de cicloadición se han llevado a cabo calentando los reactivos en el seno de tolueno anhidro. Los procesos de separación y purificación se han llevado a cabo con rapidez y en ausencia de humedad.



a, R = 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosilo  
e, R = 2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosilo



a, R = 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosilo

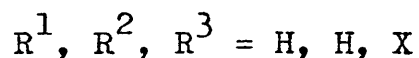
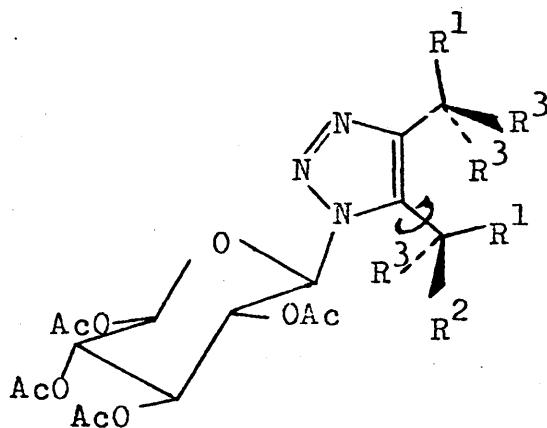
Análogamente a lo que se había observado en el apartado anterior, la reacción de la azida de tetraacetilglucosamina con 1,4-dihalobutinos condujo a la formación de productos alquitranosos intratables.

Las estructuras de los productos II y III se han determinado en base a sus datos analíticos y espectroscópicos de r.m.n. Los análisis elementales indicaron que se ha bía formado un aducto y la desaparición, en el espectro de i.r., de la banda característica de azida a  $2200\text{ cm}^{-1}$  indi có que la azida había reaccionado.

La conformación de los derivados de glucosa IIa y IIIa se determinó mediante la espectroscopía de r.m.n. Los valores de las constantes de acoplamiento de los protones del anillo de pirano del azúcar  $J \simeq 9-10\text{ Hz}$ , indicaron que dichos protones ocupaban posiciones axiales sólo compatibles con una conformación C-1. La configuración anomérica  $\beta$  se determinó a partir de las constante  $J_{1',2'} = 8,5-9\text{ Hz}$ , cuyo elevado valor sólo es compatible con una disposición axial en H-1'. El valor de la constante de acoplamiento  $J_{1',2'} = 2,5\text{ Hz}$  de IIe no permitió la asignación inequívoca del carácter anomérico de este nucleosido, ya que dicho va lor puede corresponder tanto a anómeros  $\alpha$  como a anómeros  $\beta$  en D-ribofuranosilderivados<sup>110</sup>. Sin embargo, la configuración se asignó como  $\beta$  igual a la azida de partida por las razones antes mencionadas.

A pesar de la gran similitud de los dos grupos ha lometílicos en posiciones 4 y 5, sus señales respectivas en los espectros de r.m.n. pudieron ser identificadas. De las dos señales de estos grupos halometílicos, la que aparece a campo más bajo fue asignada al grupo  $\text{CH}_2\text{X}$  en posi-

ción 5, porque dicha señal en los compuestos LIIa y LIIIa no aparece como un singlete sino como un sistema AB. La no equivalencia magnética de los dos protones del grupo halometílico en 5 se debe, posiblemente, a varios factores entre los que cabe citar una cierta restricción de la libertad de rotación en torno al enlace C-5-CH<sub>2</sub>X producida por la presencia del grupo CH<sub>2</sub>X en C-4 y la del azúcar. El he-



cho de que la diferencia de desplazamientos químicos de estos protones sea mayor en el bromoderivado que en el cloro derivado, parece apoyar la importancia de este efecto estérico. En segundo lugar, la simetría del azúcar hace que el entorno de cada uno de estos protones sea diferente y, por tanto, también contribuye a que los desplazamientos químicos sean diferentes. Los desplazamientos químicos de los protones del grupo halometílico de los compuestos monosustituídos XLVII, XLVIII, XLIX y L siguen una pauta semejante.

Es decir, registrados en un mismo disolvente, el grupo halometílico en posición 5 aparece a campo más bajo que el situado en posición 4. No obstante existe una excepción, la de los compuestos XLIX<sub>a</sub> y La cuando sus espectros se registran en DMSO-d<sub>6</sub>.

Con el fin de ensayar la actividad biológica de los nucleosidos desprotegidos, se pensó desacetilar algunos de los compuestos con mayores actividades citostáticas. Los métodos habituales en la química de nucleosidos<sup>111</sup> para la eliminación de grupos acilo consiste en el tratamiento del nucleosido protegido con metóxido o etóxido sódico en metanol o etanol respectivamente, o bien con una disolución de amoníaco en metanol. Debido a la inestabilidad del grupo halometilo frente a nucleófilos, era de esperar que dichos reactivos de desacetilación condujesen, no sólo a la eliminación de los grupos protectores, sino también a la transformación del resto alquilante. No obstante, se hizo reaccionar el reactivo menos nucleófilo, amoníaco/metanol con 4,5-bis(clorometil)-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol (LII<sub>a</sub>) cuyos grupo clorometilo son menos reactivos que los grupos bromometilo y iodometilo. Esta reacción condujo a un producto siruposo, cuyo análisis elemental fue sistemáticamente incorrecto. La purificación de este jarabe se realizó por cromatografía en distintos sistemas de disolventes.

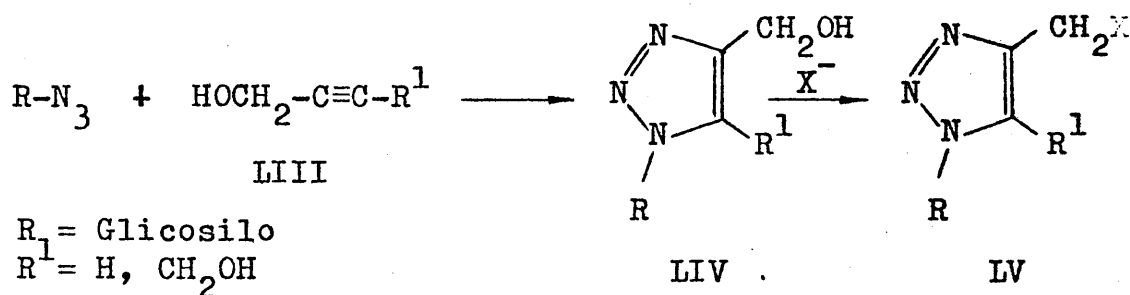
Como método de desacetilación alternativo se em-

pleó también el descrito recientemente por Kuhn y Von Wartburg<sup>112</sup>. Este método consiste en calentar a reflujo, en ausencia de humedad, una disolución del nucleosido a desacetilar en metanol y en presencia de cloruro de zinc anhidro. Esta reacción condujo a un producto siruposo cromatográficamente idéntico al obtenido anteriormente, pero que tampoco pudo obtenerse analíticamente puro.

3.- Obtención de 1-glicosil-halometil-1,2,3-triazoles por halogenación de 1-glicosil-hidroximetil-1,2,3-triazoles.

Un segundo procedimiento que también se ha empleado para la obtención de nucleosidos alquilantes del tipo halometil-1,2,3-triazólico consiste en la halogenación de hidroximetil-1,2,3-triazoles LIV. En este procedimiento se obtiene un intermedio nucleosídico, por cicloadición de azidas de glicosilo a hidroximetilacetilenos LIII, que puede ser halogenado fácilmente para dar los diferentes tipos de halometil-1,2,3-triazoles LV (R = Glicosilo, X = Cl, Br, I). Este procedimiento, a pesar de requerir dos pasos desde la azida hasta el nucleosido alquilante, en algunos casos produce mayores rendimientos globales de halometil-1,2,3-triazol que el procedimiento descrito anteriormente. Esto se debe a que el primer paso de obtención de los hidroximetil derivados LIV suele producir buenos rendimientos debido a la estabilidad de los hidroximetil-1,2,3-triazoles en las

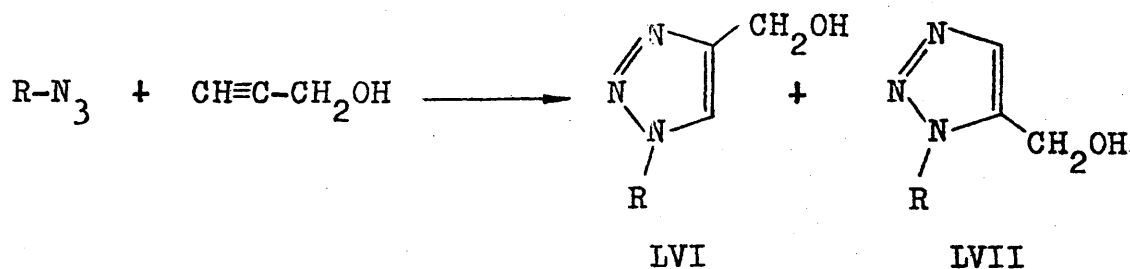
condiciones de reacción. A su vez, el segundo paso, que se realiza en condiciones suaves, suele dar rendimientos cuantitativos, aunque durante el proceso de aislamiento y purificación parte del halometil-1,2,3-triazol resultante se descompone. La obtención de los hidroximetil-1,2,3-triazoles también es interesante desde el punto de vista biológico ya que, debido a que no son agentes alquilantes aportan un nuevo elemento de juicio a la hora de establecer relaciones estructura-actividad.



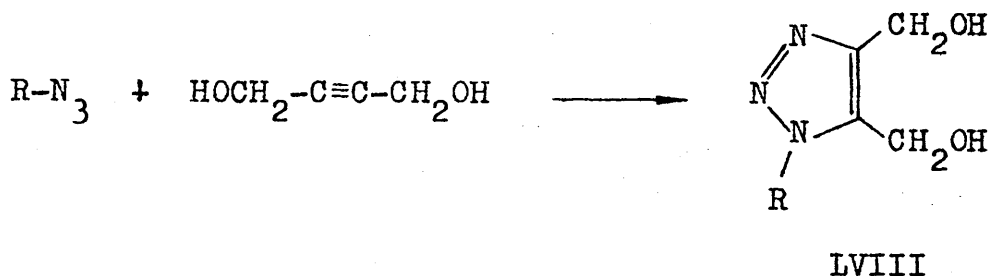
a) Reacciones de cicloadición de azidas de glicosilo a hidroximetilacetilenos.

Bajo condiciones experimentales análogas a las descritas anteriormente, es decir, calentamiento de los reaccionantes en el seno de un disolvente inerte tal como tolueno, se ha llevado a cabo la cicloadición de las azidas de glicosilo XIII, XIV y XV con alcohol propargílico para dar los 4- y 5-hidroximetil-1,2,3-triazol derivados isómeros LVI y LVII. Las azidas XIII y XV también han reaccionado con 1,4-dihidroxibutino para dar los 1-glicosil-4,5-bis(hidroximetil)-1,2,3-triazoles LVIII. Estas reac-

ciones dan, en general, buenos rendimientos de los productos respectivos.



- a, R = 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β -D-glucopiranosilo  
b, R = 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-β -D-glucopiranosilo  
c, R = 2,3,4-tri-O-acetil-β -D-ribopiranosilo



- a, R = 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β -D-glucopiranosilo  
b, R = 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-β -D-glucopiranosilo

Las reacciones con alcohol propargílico condujeron en todos los casos a una mezcla de los dos isómeros posibles LVI y LVII en los que predomina ligeramente el isómero 4-hidroximetílico LVI. En los casos de las reacciones de la tetraacetilglucopiranosil azida XIII y la triacetilribopiranosil azida XIV, los dos compuestos se obtuvieron como una mezcla cromatográficamente homogénea en

diversas mezclas de disolventes. La pureza de los componentes de la mezcla y sus estructuras respectivas se determinaron a partir de los datos analíticos y espectroscópicos de dicha mezcla.

Analogamente a lo que sucede en algunas de las reacciones descritas, la cicloadición de la azida XIV con 1,4-dihidroxibutino conduce a una mezcla alquitranosa de la que no puede aislarse ningún producto puro. No se ha podido determinar porqué estas reacciones conducen, en algunos casos, a productos definidos y, en otros, a mezclas alquitranosas poliméricas.

Las estructuras de los productos obtenidos se determinaron a partir de sus datos analíticos y espectroscópicos. La posición del grupo hidroximetilo, sobre las posiciones 4 ó 5 del anillo de triazol, se determinó estudiando la diferencia de desplazamientos químicos del protón triazólico H-4 ó H-5 en deuteriocloroformo o en dimetilsulfóxido hexadeuterado, como se ha mencionado anteriormente<sup>70</sup>. En las Tablas III, IV y V se incluyen los parámetros magnéticos de los compuestos LVI y LVII. A partir de los datos  $\Delta\delta = \delta_{\text{DMSO}} - \delta_{\text{CDCl}_3}$  del protón triazólico, puede verse que los isómeros 4-hidroximetílicos (LVI) presentan valores  $\Delta\delta = 0,51$  ppm (LVIa), 0,16 (LVIb), 0,45 (LVIc) mayores que los 5-hidroximetílicos (LVII) en los que  $\Delta\delta = 0,12$  ppm (LVIIa), 0,07 (LVIIb), 0,16 (LVIIc) como era de esperar, debido a que en los primeros el protón triazólico

es contiguo al nitrógeno sustituido. En los casos en que los compuestos LVI y LVII se obtuvieron como una mezcla homogénea, la asignación de las señales de cada compuesto en el espectro de r.m.n. se realizó fácilmente teniendo en cuenta las intensidades respectivas, ya que la proporción LVI/LVII fue aproximadamente 2/1.

La conformación de silla C-1 de todos los glicosil-hidroximetil-1,2,3-triazoles LVI, LVII y LVIII, se determinó a partir de las constantes de acoplamiento de los protones del resto de azúcar (Tablas III, IV y V). Los valores de dichas constantes para los derivados de glucosa LVIa, LVIIa y LVIIIa, y glucosamina LVIb, LVIIb y LVIIIb,  $J = 9-10$  Hz, indican que dichos protones ocupan posiciones axiales que sólo son compatibles con una conformación C-1. Por otra parte, en los derivados de ribopiranososa, el elevado valor de la suma total de acoplamientos del protón H-4' ( $J_{3',4'} + J_{4',5'ax.} + J_{4',5'ec.} \approx 19$  Hz) es sólo compatible con una disposición axial de dicho protón y, por tanto, con una conformación C-1.

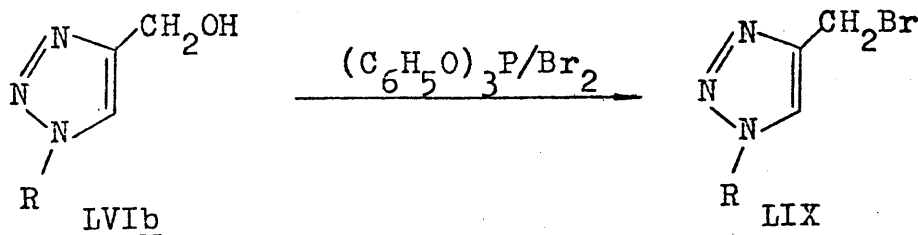
La configuración anómera de los N-glicopiranosil-1,2,3-triazoles se determinó también mediante la espectroscopía de r.m.n. Las constantes de acoplamiento  $J_{1',2'} = 8,5-10$  Hz de los nucleosidos obtenidos, indican, una vez fijada la conformación C-1 de los restos de azúcar de la serie D, que dichos nucleosidos alquilantes tienen una configuración anomérica  $\beta$ . Las reacciones descritas constitu

yen nuevos ejemplos en los que la cicloadición transcurre sin que se produzca anomerización, ya que la configuración del carbono anómero de las azidas de partida y de los nucleosidos resultantes es la misma.

b) Reacciones de halogenación de los 1-glicosil-hidroximetil-1,2,3-triazoles.

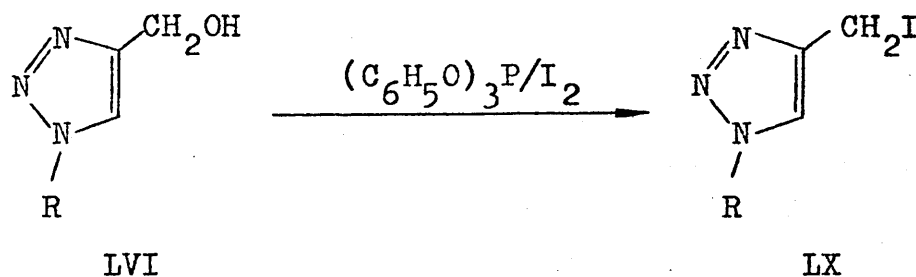
Ya se han discutido, en el capítulo correspondiente a la halogenación de 1-bencil-4-hidroximetil-1,2,3-triazoles, las características, aplicaciones y mecanismos de dichos métodos de halogenación. Los reactivos y condiciones de reacción son los mismos que allí se describieron. Las cloraciones se realizan con trifenilfosfina-tetracloruro de carbono, las bromaciones con fosfito de trifenilo-bromo y las iodaciones con fosfito de trifenilo-iodo. Debido a la nula actividad citostática de los fluorometilderivados, que se debe a su escasa capacidad alquilante, no se prepararon nucleosidos con grupos fluorometilo.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, se hizo reaccionar 1-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-4-hidroximetil-1,2,3-triazol (LVIb) con fosfito de trifenilo y bromo en disolución de 1,2-dimetoxietano para dar el 4-bromometil derivado LIX. Este com-



puesto no pudo ser obtenido directamente por cicloadición de la azida XV y bromuro de propargilo, ya que dicha reacción, que debe realizarse a temperatura elevada, produce la formación de mezclas alquitranosas.

Analogamente, la reacción de los alcoholes LVI<sub>a</sub> y LVI<sub>c</sub> con fosfito de trifenilo y iodo, en disolución de 1,2-dimetoxietano, condujo a los 4-iodometil derivados LX<sub>a</sub> y LX<sub>c</sub>, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, los glicosil-hidroximetil-1,2,3-triazoles en los que el grupo glicosilo es tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosilo ó tri-O-acetil-β-D-ribopiranosilo, se obtuvieron como una mezcla de los dos isómeros 4- y 5-hidroximetílicos que no pudo separarse en sus componentes individuales. La halogenación

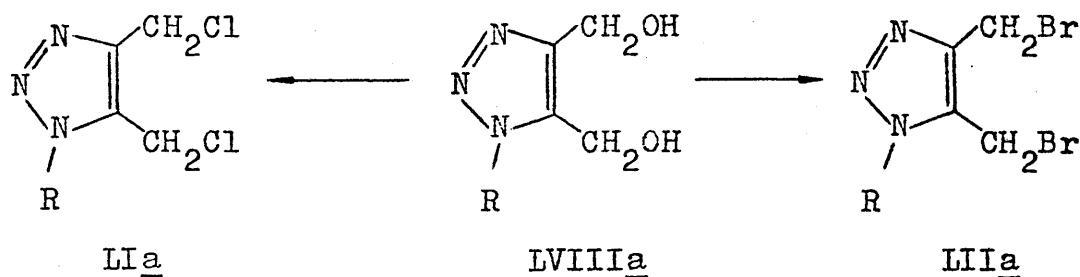


- a, R = 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosilo  
c, R = 2,3,4-tri-O-acetil-β-D-ribopiranosilo

se hizo sobre dicha mezcla con la esperanza de que los dos derivados halogenados isómeros pudiesen ser separados por cromatografía o por otro medio. Sin embargo, de estas reacciones de iodación se obtuvieron: el isómero 4-iodometílico y distintos productos de descomposición de naturaleza

polimérica, según se desprende de su espectro de r.m.n. El rendimiento de este compuesto, referido al contenido de isómero 4-hidroximetílico de la mezcla de partida, fue bueno ( $>80\%$ ). Esto parece indicar que los productos de descomposición se forman a partir del isómero 5-hidroximetílico o de su producto de iodación.

Estos procedimientos de halogenación también se han empleado para preparar halometil-triazoles obtenidos por cicloadición de azidas de glicosilo a halometilacetilenos. Así, por ejemplo, el 4,5-bis(hidroximetil)-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol (LVIIIa) reacciona con tetracloruro de carbono y trifenilfosfina en acetonitrilo anhidro para dar el 4,5-bis(clorometil)-derivado LIIa, y con bromo y fosfito de trifenilo en 1,2-dimetoxietano para dar el 4,5-bis(bromometil)-derivado LIIIa.



Los rendimientos de este segundo método fueron inferiores a los del primero debido, principalmente, al bajo rendimiento del primer paso de la reacción, es decir, la síntesis del dihidroximetil derivado LVIIIa.

Como en ocasiones anteriores, la obtención de

halometil-triazoles derivados de tetraacetil-glucosamina presenta dificultades. Los intentos de iodación de 1-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-4-hidroximetil-1,2,3-triazol (LVI<sub>b</sub>) con fosfito de trifenilo y iodo, no condujeron al derivado 4-iodometílico LX<sub>b</sub> esperado. También fueron infructuosos los intentos de bromación con fosfito de trifenilo y bromo de 4,5-bis(hidroximetil) derivado LVIII<sub>b</sub>. La razón de estos hechos, como en casos anteriores, se atribuye a la presencia del NH amídico del resto de azúcar que puede reaccionar con los grupos halometilo de la misma o de otras moléculas.

Las estructuras de los productos resultantes se determinaron a partir de sus datos analíticos, que indicaron la sustitución de los grupos hidroxilo por átomos de halógeno y, a partir de sus datos espectroscópicos. Los espectros de r.m.n. de los halometil-1,2,3-triazoles son muy similares a los de los hidroximetil-1,2,3-triazoles de partida. Las únicas diferencias apreciables se observan en los desplazamientos químicos de los protones H-4 ó H-5 triazólicos de los compuestos hidroximetílicos LVI y LVII con respecto a idénticos protones de los compuestos halometílicos XLIX, L, LIX y LX (Tablas III, IV y V). También se observa que las resonancias de los grupos CH<sub>2</sub>X de los compuestos hidroximetílicos LVI, LVII y LVIII, aparecen, normalmente, a campo más bajo que las de los correspondientes compuestos halometílicos (Tablas III, IV y V).

Aunque en principio, no era de esperar que se produjese ninguna otra transformación que la esperada de sustitución de un grupo hidroxilo por uno de halógeno, y la similitud de los espectros de r.m.n. de ambos productos inicial y final así parecía indicarlo, la conformación y configuración del resto de azúcar se determinaron a partir de las constantes de acoplamiento de sus protones siguiendo un procedimiento análogo al descrito en casos anteriores (Tablas III, IV y V). Análogamente, la posición del grupo halometílico sobre la posición 4 ó 5 del anillo de triazol también se determinó a partir de los datos  $\Delta\delta = \delta_{\text{DMSO}} - \delta_{\text{CDCl}_3}$  que fueron mayores para los derivados 4-halometílicos que para los 5-halometílicos.

TABLA I. Valores de  $\Delta\delta$  comparativos<sup>70</sup> de 1-metil-1,2,3-triazol (A) y 4-bromo-1-metil-1,2,3-triazol (B).

Desplazamientos químicos ( $\delta$ )

Compuesto	Disolv.	H-4	$\Delta\delta$	H-5	$\Delta\delta$
A	DMSO	7,72	-0,02	8,08	0,49
A	$\text{CDCl}_3$	7,74		7,59	
B	DMSO			8,31	0,71
B	$\text{CDCl}_3$			7,60	

TABLA II. Parámetros magnéticos de 1-bencil-1,2,3-triazoles. Registrados a 100 MHz.

Desplazamientos químicos ( $\delta$ )

Compuesto	Disolv.	$\text{CH}_2\text{X}$	H-5	$\Delta\delta$	$\text{CH}_2\text{N}$	$\text{C}_6\text{H}_5$
XXIV <sub>a</sub>	DMSO	4,77	8,17	0,79	5,56	7,28
XXIV <sub>a</sub>	$\text{CDCl}_3$	4,57	7,38		5,41	7,25
XXIV <sub>b</sub>	DMSO	4,71	8,19	0,79	5,56	7,30
XXIV <sub>b</sub>	$\text{CDCl}_3$	4,51	7,40		5,47	7,31
XXIV <sub>c</sub>	DMSO	4,42	8,07	0,68	5,50	7,26
XXIV <sub>c</sub>	$\text{CDCl}_3$	4,41	7,39		5,45	7,30
XXIV <sub>d</sub>	DMSO	5,30	8,30	0,81	5,61	7,28
XXIV <sub>d</sub>	$\text{CDCl}_3$	5,42	7,49		5,48	7,29

TABLA III. Parámetros magnéticos de 1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazoles

Registrados a 100 MHz

Desplazamientos químicos ( $\delta$ )

Compuesto	Disolv.	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'	H-4	H-5	$\Delta\delta$	CH <sub>2</sub> (4)	CH <sub>2</sub> (5)	OAc			
XLVIIa	DMSO	6,32	5,42-5,74	5,16	5,16	4,34	4,10	8,45	8,45		4,81	1,78	1,96	1,98	2,02	
XLVIIa	CDCl <sub>3</sub>	5,88	5,30-5,54	5,22	5,22	4,03	4,07-4,42	7,82	7,82	0,63	4,68	1,86	2,01	2,06	2,06	
XLVIIIa	DMSO	6,36	5,68	5,53	5,18	4,38	4,00-4,28	7,85				5,01	1,78	1,96	1,98	2,02
XLVIIIa	CDCl <sub>3</sub>	5,94	5,72	5,43	5,24	4,00	4,26	7,67	0,18		4,75	1,77	2,02	2,05	2,07	
XLIXa	DMSO	6,30	5,51-5,74	5,16	5,16	4,34	4,02-4,16	8,43	8,43		4,70	1,76	1,94	1,98	2,00	
XLIXa	CDCl <sub>3</sub>	5,85	5,32-5,52	5,20	5,20	3,98	4,04-4,40	7,78	7,78	0,65	4,54	1,85	2,00	2,04	2,06	
L <sub>a</sub>	DMSO	6,00	5,44-5,76	5,14	5,14	4,34	4,14	7,64			4,68	1,79	1,96	2,00	2,02	
L <sub>a</sub>	CDCl <sub>3</sub>	5,96	5,79	5,46	5,29	4,03	4,27	7,67	-0,03		4,61	1,85	2,02	2,06	2,07	
LIa	CDCl <sub>3</sub>	5,93	5,76	5,44	5,25	4,03	4,26				4,72	4,81	1,87	2,02	2,06	2,08
LIIa	DMSO	6,33	5,70	5,50	5,16	4,36	4,14				4,78	4,96	1,79	1,96	1,98	2,02
LIIa	CDCl <sub>3</sub>	5,90	5,76	5,44	5,26	4,02	4,25				4,58	4,82	1,88	2,02	2,06	2,08
LXa	DMSO	6,27	5,37-5,68	5,20	5,20	4,32	4,08	8,34	8,34		4,53	1,78	1,94	2,00	2,02	
LXa	CDCl <sub>3</sub>	6,20	5,25-5,48	5,18	5,18	3,98	4,04-4,39	7,74	7,74	0,60	4,42	1,87	2,02	2,06	2,08	

Continúa en la pág. siguiente...

TABLA III (cont.). Parámetros magnéticos de 1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)1,2,3-triazoles  
 Registrados a 100 MHz

Desplazamientos químicos ( $\delta$ )

Compuesto	Disolv.	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'	H-4	H-5	$\Delta\delta$	CH <sub>2</sub> (4)	CH <sub>2</sub> (5)	OAc
LVI <sub>a</sub>	DMSO	6,32	5,44-5,77	5,20	4,40	4,15	4,28	4,54	1,80	1,79	2,10	2,03	
LVI <sub>a</sub>	COCl <sub>3</sub>	6,00	5,14	5,80	4,02	4,21	7,77	0,51	4,76	1,78	2,00	2,02	2,06
LVII <sub>a</sub>	DMSO	6,30	5,44-5,79	5,16	4,30	4,15	7,70		4,70	1,80	1,79	2,10	2,03
LVII <sub>a</sub>	COCl <sub>3</sub>	5,88	5,14	5,80	4,02	4,24	7,58	0,12	4,82	1,78	2,00	2,02	2,06
LVIII <sub>a</sub>	DMSO	6,23	5,78	5,48	5,10	3,98-4,46		4,54	4,66	1,79	1,95	1,99	2,02

Continúa en la pág. siguiente...

TABLA III (cont.). Constantes de acoplamiento (Hz)

Compuesto	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'}$	$J_{4',5'}$
XLVII <sub>a</sub>	9	--	9,5	9,5
XLVIII <sub>a</sub>	9	9	9	9
XLIX <sub>a</sub>	8,5	10	9,5	9,5
L <sub>a</sub>	9	9	9	9
LI <sub>a</sub>	9	9	9,5	9,5
LII <sub>a</sub>	8,5	9	9	9
LX <sub>a</sub>	9	9,5	9,5	9,5
LVI <sub>a</sub>	9	--	--	--
LVII <sub>a</sub>	9	--	--	--
LVIII <sub>a</sub>	8,5	9	9	9

TABLA IV. Parámetros magnéticos de 1-(2,3,4-tri-O-acetil-β-D-ribopiranosil)-1,2,3-triazoles  
 Registrados a 100 MHz

		Desplazamientos químicos (δ)												
Compuesto	Disolv.	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-4	H-5	Δδ	CH <sub>2</sub> (4)	CH <sub>2</sub> (5)	OAc		
XLVIIc	DMSO	6,13	5,63	5,71	5,18	3,96		8,45		4,84	1,82	2,00	2,18	
XLVIIc	CDCl <sub>3</sub>	6,04	5,37	5,79	5,19	3,85-4,17		7,89	0,56	4,69	1,89	2,06	2,22	
XLVIIId	DMSO	6,31	--	--	--	--		8,46		5,11		1,98	2,11 (6H)	
XLVIIId	CDCl <sub>3</sub>	6,11	--	--	--	--		7,82	0,64	4,73		2,08	2,13 (6H)	
XLVIIIc	DMSO	6,16	--	--	--	--	7,95				4,90	1,87	2,04	2,18
XLVIIIc	CDCl <sub>3</sub>	6,07	--	--	--	--	7,74		0,21		4,76	1,94	2,08	2,23
XLIXc	DMSO	6,11	5,62	5,70	5,18	3,98		8,42		4,72		1,80	1,99	2,17
XLIXc	CDCl <sub>3</sub>	6,01	5,33	5,78	5,15	3,83-4,11		7,74	0,68	4,52		1,86	2,03	2,19
LVIc	DMSO	6,02	5,73	5,56	5,12	3,95		8,15		4,50		1,81	1,99	2,16
LVIc	CDCl <sub>3</sub>	5,98		5,75	5,15	3,81-4,12		7,70	0,45	4,71		1,83	2,00	2,16
LVIIc	DMSO	6,02	5,73	5,56	5,12	3,95	7,63				4,64	1,84	1,99	2,13
LVIIc	CDCl <sub>3</sub>	6,09	5,70	5,82	5,24	3,81-4,12	7,54		0,09		4,77	1,85	2,02	2,17
LXc	DMSO	6,11	5,59	5,71	5,19	3,89-4,13		8,40		4,60		1,74	2,02	2,20
LXc	CDCl <sub>3</sub>	6,02	5,33	5,79	5,17	3,84-4,12		7,72	0,68	4,45		1,89	2,05	2,22

Continúa en la página siguiente...

TABLA IV (cont.). Constantes de acoplamiento (Hz)

Compuesto	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'}$	$J_{4',5'}$
XLVII <u>c</u>	9	2,5	2,5	6
XLVII <u>d</u>	3	---	---	
XLVIII <u>c</u>	9	---	---	---
XLIX <u>c</u>	9	3	3	---
LVI <u>c</u>	9	3	3	---
LVII <u>c</u>	9	3	3	---
LX <u>c</u>	9	3	3	---

TABLA V. Parámetros magnéticos de 1-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazoles  
 Registrados a 100 MHz

Desplazamientos químicos ( $\delta$ )

Compuesto	Disolv.	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'	H-4	H-5	$\Delta\delta$	CH <sub>2</sub> (4)	CH <sub>2</sub> (5)	OAC			
XLVII <sub>b</sub>	DMSO	6,06	4,51	5,31	5,05	3,96-4,26			8,32		4,76	1,51	1,87	1,92	1,93	
XLVII <sub>b</sub>	CDCl <sub>3</sub>	6,03	4,47	5,48	5,25	4,01	4,24		7,95	0,37	4,73	1,79	2,09	(9H)		
XLVIII <sub>b</sub>	DMSO	6,14	4,52	5,40	5,08	3,99-4,31	7,78					5,00	1,56	1,94	1,98	2,01
XLVIII <sub>b</sub>	CDCl <sub>3</sub>	6,45	4,47	5,79	5,21	4,04-4,24	7,66			0,12		4,77	1,77	2,06	(9H)	
LIX	DMSO	6,06	4,54	5,32	5,05	3,96-4,32			8,30		4,70	1,58	1,94	2,00	(6H)	
LIX	CDCl <sub>3</sub>	6,00	4,52	5,46	5,18	4,00	4,20		7,86	0,44	4,52	1,76	2,04	(9H)		
LVI <sub>b</sub>	DMSO	6,05	4,59	5,32	5,05	3,93-4,17			8,04		4,47	1,58	1,93	1,97	(6H)	
LVI <sub>b</sub>	CDCl <sub>3</sub>	6,08	4,60	5,48	5,21	3,95-4,31			7,88	0,16	4,73	1,71	2,05	(9H)		
LVII <sub>b</sub>	DMSO	6,06	4,44	5,34	5,02	3,97-4,22	7,54					4,66	1,56	1,93	2,00	(6H)
LVII <sub>b</sub>	CDCl <sub>3</sub>	6,27	4,73	5,60	5,24	4,05-4,38	7,61			0,07		4,84	1,74	2,08	(9H)	
LVIII <sub>b</sub>	DMSO	6,28	4,97	5,55	5,24	4,09-4,38					4,66	4,79				
LVIII <sub>b</sub>	CDCl <sub>3</sub>	6,40	5,09	5,78	5,43	4,03-4,55					4,91	5,04				

Continúa en la página siguiente...

TABLA V(cont.). Constantes de acoplamiento (Hz)

Compuesto	$J_{1',2'}$	$J_{2',3'}$	$J_{3',4'}$	$J_{2',NH}$
XLVII <u>b</u>	10	9,5	8	10
XLVIII <u>b</u>	10	9,5	9	9
LIX <u>b</u>	10	10	9	10
LVI <u>b</u>	10	9,5	10	9
LVII <u>b</u>	10	10	8,5	9,5
LVIII <u>b</u>	9,5	10	9	10

TABLA VI. Parámetros magnéticos de 1-(2,3,5-tri-0-benzoil-β-D-ribofuranosil)-1,2,3-triazoles  
 Registrados a 100 MHz

Compuesto	Disolv.	Desplazamientos químicos (δ)							Constantes de acoplamiento (Hz)				
		H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-5	Δδ	CH <sub>2</sub> (4)	CH <sub>2</sub> (5)	J <sub>1,2'</sub>	J <sub>2,3'</sub>	J <sub>3,4'</sub>
XLVII <sub>e</sub>	DMSO	6,74	6,26	6,11	4,91	4,62	8,47		4,83		3	5	5
XLVIII <sub>e</sub>	CDCl <sub>3</sub>	6,43	6,24	6,10	4,48-4,94		7,81	0,66	4,56				
XLIX <sub>e</sub>	DMSO	6,76	6,28	6,13	4,16-4,68		8,50		4,75		3	5	5
XLIX <sub>e</sub>	CDCl <sub>3</sub>	6,41	6,22	6,09	4,54-4,94		7,80	0,70	4,43				
LIX <sub>e</sub>	DMSO	6,74	6,41	6,21	5,00	4,62			4,92	5,18	2,5	5	6,5
LIX <sub>e</sub>	CDCl <sub>3</sub>	6,41	6,55	6,23	4,43-4,99				4,63	4,78			

Constantes de acoplamiento (Hz)

Compuesto	J <sub>1,2'</sub>	J <sub>2,3'</sub>	J <sub>3,4'</sub>
XLVII <sub>e</sub>	3	5	5
XLIX <sub>e</sub>	3	5	5
LIX <sub>e</sub>	2,5	5	6,5

## V.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CITOSTATICA

Se dispone en la actualidad de una gran variedad de modelos experimentales para la detección de agentes antineoplásicos, que incluyen procedimientos tanto "in vitro" como "in vivo". Entre los primeros destacaremos la técnica de cultivos celulares, como la más usual y diversos sistemas microbianos cuyo fundamento es mucho menos sólido.

De los procedimientos "in vivo" indicaremos, en primer lugar, la aplicación de tumores espontáneos obtenidos en animales experimentales de laboratorio y los sistemas de tumores inducidos por diversos agentes, pero es de resaltar, que la mayoría de los compuestos antitumorales, que en la actualidad tienen uso clínico, fueron descubiertos como consecuencia de su actividad frente a tumores tras-plantables de ratas o ratones.

La única razón para el empleo de ensayos "in vitro" es su facilidad de realización y su utilidad en la selección de sustancias potencialmente activas, pero en todos los casos estos resultados deben ratificarse con la información complementaria que aporta su estudio sobre sistemas tumorales "in vivo".

### 1.- Ensayos sobre cultivos celulares.

Las ventajas de las técnicas de cultivos celulares aplicadas a la valoración de agentes citostáticos potencia

les han quedado plenamente demostradas en los extensos trabajos de Eagle y Foley<sup>113</sup>.

En este sistema se pueden llevar a cabo tres tipos diferentes de pruebas: a) Estudio del efecto de compuestos de potencial antineoplásico desconocido frente a cultivos de células derivadas de tumores "no humanos". b) Observación de este mismo tipo de compuestos frente a líneas celulares de tumores humanos. c) Determinación de la actividad de agentes de potencial antitumoral conocido frente a tumores humanos procedentes de biopsias.

Los dos primeros tipos de pruebas son fácilmente reproducibles y permiten la realización de estudios cuantitativos, ya que los requerimientos nutricionales de las líneas celulares establecidas se conocen perfectamente y permiten su cultivo prolongado.

En cuanto a los estudios del tercer tipo son más difíciles de realizar, pues solamente en casos aislados se logra el crecimiento de algunos tumores durante unos días ó a lo más una generación. Esto conlleva la imposibilidad de repetición de pruebas que complementen los datos obtenidos en la primera.

El problema central de todos los estudios en cultivos celulares radica en la valoración de los efectos observados. Para ello hay que establecer un control adecuado y desarrollar un método de medida de la actividad citostática de los compuestos ensayados. Entre los métodos más usua

les consideraremos los siguientes:

a) En el caso de cultivos estacionarios en monocapa se puede hacer una medida directa del desarrollo de la capa celular mediante recuento de las células vivas<sup>114</sup>.

b) Un segundo método descrito por Miyamura<sup>115</sup> consiste en hacer crecer las células en una placa de agar, donde son expuestas a los agentes en estudio contenidos en cilindros de porcelana. Después de un tiempo determinado de incubación, se desecha el contenido de los cilindros y se impregna la placa con azul de metileno, permaneciendo azules las zonas donde ha habido inhibición mientras se de coloran las zonas en que ha proseguido el crecimiento celular.

Existen otros métodos en los que la viabilidad de los cultivos se determina mediante el uso de colorantes, como el descrito por Fujikawa<sup>116</sup> que emplea colorantes como el agente de Feulgen, rojo neutro, azul tripan y rojo congo.

c) Otra posibilidad de valoración de la proliferación celular es mediante medida de la transmisión de la luz a través del medio donde crecen las células<sup>117</sup> que juntamente con los datos aportados por la observación de fenómenos citológicos (originados por el compuesto en estudio), tales como: incremento de desechos celulares, cambios nucleares y citolisis, proporcionan una estimación bastante exacta de la actividad citostática<sup>118</sup>.

d) Oyama y Eagle<sup>119</sup> han descrito un sistema de valoración del crecimiento celular en el que utilizan un reactivo de fenol (Folin-Ciocalteaux) para medir colorimetricamente el contenido total en proteínas del cultivo celular. Basados en la suposición de que la cantidad total de proteínas permanece constante a lo largo del ciclo celular, expresan el resultado en número de células mediante aplicación de un factor de corrección.

Las líneas celulares más usuales empleadas en estos estudios son las "HeLa", que procedentes de un carcinoma de útero humano fueron aisladas por Gey y col. en 1952<sup>120</sup>, y las KB que provienen de un carcinoma humano de nasofaringe<sup>121</sup>. Estas últimas son las utilizadas por el "Cancer Chemotherapy National Service Center (U.S.A.)" en su programa de "screening" de agentes antineoplásicos.

Con estas técnicas de cultivos celulares se pretende obtener una primera estimación de actividad citostática que sirva de base en la selección de compuestos para pruebas posteriores "in vivo".

A pesar del carácter orientativo de este tipo de ensayo, es de resaltar que en muchos casos se ha logrado una buena correlación entre citotoxicidad "in vitro" y actividad citostática "in vivo" en sistemas de tumores transplantables.

## 2.- Sistemas microbianos.

Se basan en la suposición de que un compuesto que inhibe el crecimiento bacteriano presente una actividad semejante en células cancerosas, en el supuesto de que puede interferir alguna ruta metabólica similar<sup>122</sup> en ambos tipos de células (procariótica y eucariótica). Sin embargo existen las suficientes diferencias entre una bacteria y una célula humana, en cuanto a composición de membrana, ribosomas, organización del material genético, etc., como para que un posible citostático (por ej. un inhibidor específico de biosíntesis de proteínas por ribosomas 80 S) muestre la misma actividad en el sistema microbiano (ribosomas 70 S). Por ello es bastante improbable que estos sistemas reemplacen a los anteriores<sup>123</sup>.

### 3.- Sistemas de tumores espontáneos.

Los tumores aparecidos espontáneamente en animales susceptibles fue inicialmente el sistema elegido para el estudio de la actividad citostática. No obstante el empleo de estos sistemas se ha restringido, ultimamente, debido a una serie de factores:

En primer lugar el tiempo impredecible de aparición de los tumores, su baja incidencia aún en razas muy susceptibles y, en consecuencia el elevado número de animales necesarios.

Por otra parte el problema que supone la elección de tumores adecuados, junto a las dificultades que surgen

para hacer un diagnóstico y una medida de la regresión en aquellos casos en que no se encuentren en sitios fácilmente accesibles.

Por todos estos inconvenientes su uso en la actualidad es muy limitado y, prácticamente sólo se recurre a ellos para estudios sobre tumores de mama.

#### 4.- Sistemas de tumores inducidos.

En una variedad de animales, se pueden inducir tumores en diferentes zonas, por agentes físicos, químicos o virales. El método químico<sup>124</sup> es el más frecuentemente utilizado y de hecho una vez inducido el tumor por el carcinógeno no se distinguen prácticamente, en su desarrollo, de uno espontáneo.

Las principales desventajas que conlleva el uso de tumores inducidos estriban en la incomodidad que implica el manejo de un número considerablemente alto de animales (dada su baja incidencia) para utilizar en un solo ensayo, y las dificultades que supone la eliminación del carcinógeno implantado una vez lograda la inducción del tumor.

#### 5.- Sistemas de tumores trasplantables.

En la actualidad los sistemas de tumores trasplantables en animales experimentales constituyen la base de la mayoría de los programas establecidos para la búsqueda

de nuevas sustancias antineoplásicas, habiéndose desarrollado un gran número de estos sistemas<sup>125</sup>.

Cualquier tumor maligno, ya sea espontáneo o inducido, es potencialmente trasplantable en un número determinado de especies.

El trasplante consiste en esencia en introducir una cantidad determinada de células tumorales en una zona adecuada del animal. En el caso de tumores sólidos la inoculación se efectúa subcutánea o intramuscularmente, ya en forma de suspensión del tejido tumoral convenientemente picado, o bien como pieza sólida por medio de un trocar. Si se pretende obtener en forma ascítica se inyectará intraperitonealmente a la dilución adecuada.

Los tumores trasplantados empleados para pruebas antitumorales deben reunir una serie de características, así: tienen que ser estables, indiferenciados, genéticamente neutros y obtenidos por trasplantes sucesivos. Antes de su uso para estos fines han de haber pasado al menos a través de tres generaciones de animales. Durante los primeros estadíos del trasplante en serie, los tumores mantienen su semejanza con el original del que derivan, pudiendo crecer únicamente en un número limitado de huéspedes. Posteriormente tiene lugar una regresión con la pérdida consiguiente de la tipología, lo que conlleva la facilidad de aceptación por mayor número de huéspedes, abarcando incluso algunos de composición genética diferente<sup>126</sup>.

Para el mantenimiento de determinados sistemas tumorales (L-120, P-388, CD8F1, etc...) es imprescindible que los huéspedes sean de razas específicas dentro de una misma especie y, a su vez, que se haya seguido una consanguinidad rigurosa a lo largo de todas las generaciones, si bien para ensayos de actividad citostática, estudios sobre dosis respuesta, determinación de índices terapéuticos, etc... se pueden utilizar híbridos  $F_1$ . Otros sistemas en cambio (ECA, S-180, etc.) no exigen este último requisito.

Los sistemas tumorales más empleados en los estudios sobre actividad antineoplásica son la leucemia P-388, leucemia L-1210, el sarcoma S-180 y el tumor ascítico Ehrlich ECA, todos ellos de razas concretas de ratones; y el carcinoma de Walker y sarcoma Yoshida de ratas, también de razas específicas<sup>127</sup>.

Una de las grandes ventajas de esta técnica de ensayo es el poder utilizar un número grande de animales en los que se ha desarrollado simultáneamente el tumor, pues el trasplante prende en un porcentaje muy elevado de animales.

Por tanto, los tumores trasplantables son el instrumento más importante de que disponemos en la búsqueda de nuevas sustancias antineoplásicas. Sólo la falta de apreciación de ciertos principios básicos y el desconocimiento de los cambios en las propiedades biológicas que experimentan los tumores sometidos a trasplantes seriados han

llevado en algunos casos a interpretaciones falsas de resultados, que han sido la base de discusiones en torno al significado de este tipo de ensayo. Pero con sus argumentos a favor y en contra es hoy día el método más utilizado.

## VI.- RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Se ha estudiado la actividad citostática "in vitro" frente a cultivos de células HeLa de todos los compuestos descritos en esta memoria, (véase Método de ensayo, pág. 127 y Resultados, pág. 131). De los datos expuestos en las tablas VII y VIII (pág. 132) se pueden deducir ciertas relaciones estructura-actividad. Así, en todos los casos la actividad citostática, respecto al radical halometílico, aumenta en el sentido  $R-CH_2F < R-CH_2Cl < R-CH_2Br < R-CH_2I$ , lo que corresponde exactamente con el mismo orden creciente de capacidad alquilante que poseen dichos radicales.

En el caso de los derivados bencílicos, sintetizados como modelo, no se llega a detectar actividad cuando estas estructuras portan el resto  $-CH_2F$ ; precisamente por esta circunstancia se desestimó la obtención de más derivados fluorados. Así mismo la sustitución del grupo halometílico por el hidroximetílico conlleva una pérdida total de la actividad.

Por otra parte la posición ocupada (4 ó 5) por el radical  $-CH_2X$  en el núcleo de triazol no parece influir deci

sivamente en la actividad, pues en los casos estudiados los valores obtenidos son siempre del mismo orden.

Respecto al resto de azúcar se observa una graduación del mismo tipo en el caso de la glucopiranososa y ribopiranososa, mientras que con la 2-glucosamina y la ribofuranosa (benzoilada) la actividad disminuye ostensiblemente, saliendo en todos los casos del margen de significancia.

Queda por tanto bien esclarecido que la actividad está vinculada a la presencia del resto alquilante  $-\text{CH}_2\text{X}$  en la molécula, mientras que el resto de azúcar parece desempeñar el papel de modulador de la actividad.

P A R T E    E X P E R I M E N T A L

Los análisis elementales se realizaron por J. Prieto bajo la dirección del Dr. J. Calderón en el Laboratorio de Microanálisis del C.N.Q.O.

Los puntos de fusión no están corregidos.

Los espectros de i.r. se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 257.

Los espectros de u.v. en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 350 6 402.

Los espectros de r.m.n. en un espectrómetro Varian XL-100 o en un espectrómetro Perkin-Elmer R-12, utilizando como referencia interna TMS.

Los espectros de masas se han obtenido en espectrómetro Hitachi-Perkin-Elmer, modelo RMV-GMG con marcador interno de masas.

Las cromatografías de capa fina se realizaron en cromatoplasmas de 0,25 mm. de gel de sílice GF<sub>254</sub> Merck y las cromatografías en placas preparativas de 2 mm. con gel de sílice PF<sub>254</sub> Merck. Las manchas se visualizaron con una lámpara de luz ultravioleta de 254 nm.

Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron con gel de sílice Merck tipo 60 (70-230 mesh).

## I.- PREPARACION Y ORIGEN DE LOS PRODUCTOS DE PARTIDA

- 1.- Alcohol propargílico. Procedencia comercial, Fluka  
A.G.
- 2.- Bromuro de propargilo. Procedencia comercial, Fluka,  
A.G.
- 3.- Cloruro de propargilo. Procedencia comercial, Fluka,  
A.G.
- 4.- 1,4-Dihidroxi-2-butino. Procedencia comercial, Fluka,  
A.G.
- 5.- 1,4-Dicloro-2-butino. Procedencia comercial, Fluka  
A.G.
- 6.- Azida de trimetilsililo. Procedencia comercial, Fluka,  
A.G.
- 7.- D(-)glucosa anhidra. Procedencia comercial, Fluka  
A.G.
- 8.- N-acetil-D-glucosamina. Procedencia comercial, Fluka,  
A.G.
- 9.- D(-)ribosa. Procedencia comercial, Fluka, A.G.
- 10.- 1,4-Dibromo-2-butino.

A una mezcla de 40 ml. de benceno y 5 g. (0,058 moles) de 1,4-dihidroxi-2-butino se añaden, gota a gota, 13,7 g. (0,051 moles) de tribromuro de fósforo, manteniendo la mezcla con agitación magnética y a temperatura ambiente. Finalizada la adición, se eleva un poco la temperatura y se continúa la agitación durante una noche. A continuación, se añade agua helada y la mezcla se extrae con éter (3x50ml.). Los extractos así reunidos, se lavan con una disolución de bicarbonato sódico, se secan y el 1,4-dibromo-2-butino se obtiene por destilación fraccionada como un aceite amarillo que oscurece al aire, p.eb. 60°C/0,07 mm. Hg,  $n_D^{19,5} = 1,5987$ ; (p.eb., bibl. 60°C/0,07 mm. Hg,  $n_{D,bibl.}^{19} = 1,5927$ )<sup>106</sup>

11.- Bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo.

En un matraz de medio litro se introducen 29,7 g. (0,165 moles) de D(-)glucosa anhidra y 151 g. (1,40 moles) de anhídrido acético al 95%. A esta mezcla se añaden, con agitación magnética suave, dos gotas de ácido sulfúrico. La reacción comienza, la mezcla de reacción se calienta, y la glucosa se disuelve poco a poco. Si la temperatura de la mezcla alcanza el punto de ebullición, se sumerge momentáneamente el matraz en agua fría. Después de unos diez o quince minutos se ha disuelto la glucosa y la temperatura de ebullición de la mezcla alcanza unos 100°C. A continuación, se adapta al matraz un refrigerante de reflujo y se

calienta en baño de vapor durante dos horas. Entonces se separan por destilación a presión reducida, aproximadamente, unos 100 ml. de la mezcla de ácido y anhídrido acético.

Al jarabe amarillo resultante, mantenido caliente, se le añaden 32,5 g. (30,1 ml.; 0,32 moles) de anhídrido acético; la mezcla se calienta ligeramente y se agita hasta que la disolución se hace homogénea. Seguidamente, se burbujéa a través de esta disolución una corriente de ácido bromhídrico seco. Después de enfriar la mezcla en baño de hielo se tapa el matraz herméticamente y se mantiene en la nevera toda la noche a 5°C.

Los ácidos bromhídrico y acético, y el anhídrido acético se separan de la disolución amarillenta por destilación a presión reducida calentando en baño de agua, cuya temperatura no exceda de 60°C. Durante la destilación, la disolución se hace más brillante y más oscura. Seguidamente, se destila a alto vacío (presión inferior a 5 mm. Hg), manteniendo la temperatura del baño entre 50-60°C durante unos tres cuartos de hora, hasta que ya no destila más. El residuo del matraz se recristaliza en la mezcla éter sulfúrico/éter de petróleo. El producto así obtenido se seca sobre hidróxido sódico, p.f. 88-89°C; (p.f. <sup>bibl.</sup> 88-89°C)<sup>128</sup>. Rto. 73%

12.- Azida de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β -D-glucopiranosilo. (XIII)

A una suspensión de 16,5 g. (0,25 moles) de azida

sódica en 225 ml. de N,N-dimetilformamida pura y seca, se añaden 33 g. (0,080 moles) de bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo. La mezcla se calienta al baño maría, mientras se agita durante dos horas. Pasado este tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente y se vierte sobre 500 ml. de agua fría. El precipitado que se forma, se filtra y lava con agua abundante. El sólido así obtenido se seca sobre pentóxido de fósforo y se recristaliza de metanol, p.f. 127°C; (p.f. bibl. 127°C)<sup>53</sup>. Rto. 41%

13.- 1,2,3,4-Tetra-O-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosilo.

Se sigue el procedimiento de Zinner<sup>55</sup> y Kissman<sup>56</sup> con algunas modificaciones. Se disuelven 30,02 g. (0,2 moles) de D(-)ribosa en 230 ml. de piridina anhidra y, manteniendo la mezcla con agitación magnética, se agregan 84,35 g. (0,82 moles) de anhídrido acético destilado y seco. La reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación, se concentra la disolución en el rotavapor, y el residuo se evapora cuatro veces consecutivas con 15 ml. de xileno anhidro (cada vez). Las últimas trazas de disolventes se eliminan por destilación a alto vacío. Al sirupe así obtenido se le añaden 200 ml. de éter anhidro apareciendo casi inmediatamente unos cristales blancos, 42,52 g. (67%) p.f. 103-105°C; (p.f. bibl. 103-105°C)<sup>56</sup>

14.- Cloruro de 2,3,4-tri-O-acetil-D-ribopiranosilo.

Se disuelven 5,85 g. (0,018 moles) de 1,2,3,4-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosilo en 120 ml. de éter anhidro, saturado con ácido clorhídrico seco a 0°C, y la disolución se deja en reposo tres días. Después, el disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se evapora tres veces con benceno anhidro, estando el baño a 15°C. De esta manera se obtiene el cloruro de 2,3,4-tri-O-acetil-D-ribopiranosilo<sup>128a</sup> como un sirupe (6,02 g.) que se utiliza "in situ" en el proceso de síntesis que se cita a continuación.

15.- Azida de 2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosilo. (XIV)

a) Por reacción de cloruro de 2,3,4-tri-O-acetil-D-ribopiranosilo con azida sódica.

Se sigue un procedimiento similar al de Carrington<sup>57</sup>. Se disuelve el sirupe (6,02 g.) obtenido en la reacción anterior en 135 ml. de acetonitrilo anhidro y se añaden, con agitación magnética, 10,4 g. (0,16 moles) de azida sódica. La mezcla se calienta a reflujo (en ausencia de humedad) durante dos horas. A continuación, se filtra y el filtrado se evapora a sequedad, lavándose varias veces con benceno anhidro. De esta manera, se obtienen 5,24 g. de un sirupe que se purifica en cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente acetato de etilo: éter de petróleo (1:3). Se recogen 2,90 g. de un sirupe amarillo

pálido (primer producto recogido) cromatográficamente puro, que se identifica por su espectro de i.r. (banda de tensión  $N\equiv N$  a  $2130\text{ cm}^{-1}$ ), r.m.n.<sup>48</sup> y por reacciones posteriores.

b) Por reacción de 1,2,3,4-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosilo con azida de trimetilsililo.

Se sigue un procedimiento semejante al utilizado por Paulsen<sup>48</sup>. A 3,18 g. (0,01 ml) de 1,2,3,4-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosilo y 1,5 ml. de azida de trimetilsililo, se añade 1 ml. de tetracloruro de estaño en 90 ml. de dicloroetano anhidro. Después de estar 90 minutos a temperatura ambiente, se lava dos veces con 50 ml. de agua (cada vez), se neutraliza con disolución de bicarbonato sódico y posteriormente se lava con agua. A continuación, se separan las dos fases en un embudo de decantación, la fase orgánica se seca con cloruro cálcico y se eliminan los disolventes. El residuo siruposo obtenido se purifica en columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo:éter de petróleo (1:1). Así, se recogen, en primer lugar, 2,38 g. (80%) de un sirupe amarillo pálido idéntico al obtenido en a).

16.- Cloruro de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-  
 $\alpha$ -D-glucopiranosilo.

En un matraz de 500 ml., provisto de agitador magnético y refrigerante de reflujo (protegido de la humedad), se añaden 100 ml. de cloruro de acetilo y, a continuación,

50 g. (0,226 moles) de N-acetilglucosamina anhidra, en el transcurso de 2 ó 3 minutos, manteniendo la agitación. La mezcla se mantiene, con agitación, a temperatura ambiente 16 horas. La reacción hierve espontáneamente durante la primera hora, llegándose a obtener un líquido viscoso de color ámbar claro.

A través del refrigerante se añaden 400 ml. de cloroformo seco y libre de alcohol, y la disolución se vierte, con agitación, en 400 g. de hielo y 100 ml. de agua. La mezcla se transfiere a un embudo de separación de 1 litro. La capa orgánica se vierte rápidamente en un vaso de precipitado que contiene 400 ml. de disolución saturada de bicarbonato sódico, se agita la mezcla y, a continuación, se vierte en un embudo de decantación continuando la agitación. la capa orgánica se echa directamente en un erlenmeyer que contiene 25 g. de sulfato magnésico. El proceso completo de lavado se consigue en unos 15 minutos. La disolución se agita con el agente desecante unos 10 minutos. Se separa el agente desecante y se lava bien con cloroformo seco y libre de alcohol o cloruro de metileno. El filtrado se pasa directamente a un matraz de 1 litro y se concentra, en rotavapor a 50°C, hasta 75 ml.; se añaden rápidamente a la disolución caliente 500 ml. de éter seco. En general, la cristalización comienza después de unos 30 segundos. Se tapa y se deja en reposo unas 12 horas.

El sólido obtenido se separa y se lava dos veces con

dos porciones de 150 ml. de éter seco, secando por succión en 5 minutos, y en un desecador sobre hidróxido sódico y pentóxido de fósforo, p.f. 127°C. Rto. 67-79%; (p.f. bibl. 127-128°C)<sup>129</sup>

17.- Azida de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo. (XV)

Se suspenden 5 g. (0,076 moles) de azida sódica en 100 ml. de formamida anhidra y se agita con 10 g. (0,026 moles) de cloruro de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo durante 3 horas a 80-85°C. Pasado este tiempo, se vierte la mezcla (fría) sobre 400 ml. de agua helada y se extrae tres veces con cloroformo. Los extractos reunidos se lavan con agua y se secan sobre sulfato sódico. Al eliminar el disolvente a vacío, se obtiene un sólido que se recristaliza de acetato de etilo/éter de petróleo para dar 4,5 g. (45%) de agujas incoloras, p.f. 160°C; (p.f. bibl. 160-161°C)<sup>54</sup>

18.- 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosilo.

Se disuelven, con agitación, 15 g. (0,1 mol) de D(-)ribosa en 320 ml. de metanol. A continuación, se añade lentamente una disolución de 2 g. de ácido clorhídrico anhidro en 6 ml. de metanol y se agita durante una hora a temperatura ambiente. Se agregan 30 ml. de piridina seca y,

se deja en la nevera unas ocho horas. Transcurrido este tiempo, se eliminan los disolventes a presión reducida (temperatura del baño 45°C). Se añaden 30 ml. más de piridina y, a continuación, se elimina en el rotavapor todo lo posible. De esta manera, se obtiene un aceite espeso que se deja en la nevera toda la noche. Después de este tiempo, se añaden 80 ml. de cloroformo y 150 ml. de piridina; se enfría con hielo y se agregan con agitación, lentamente, 59 ml. de cloruro de benzoílo puro y seco, precipitando así un sólido blanco que se deja en la nevera una noche. A continuación, se vierte sobre 400 ml de agua helada y se separa la capa orgánica de la acuosa. La capa acuosa se extrae dos veces con 40 ml. de cloroformo. Los extractos orgánicos se lavan dos veces con 80 ml. de agua helada y se secan sobre sulfato sódico. El disolvente se evapora a presión reducida, obteniéndose un aceite rojo viscoso que se disuelve en 25 ml. de ácido acético y 56 ml. de anhídrido acético. La disolución se enfría y, a continuación, se añaden, con agitación, 8 ml. de ácido sulfúrico concentrado. Al cabo de una hora, se forma un precipitado espeso que, sin filtrar, se deja en la nevera durante tres horas. Pasado este tiempo, se añade agua helada, se decanta y, se lava tres veces con agua. El producto así obtenido se recristaliza de isopropanol, p.f. 126°C. Rto. 40%; (p.f. <sup>bibl.</sup> 127°C)<sup>130</sup>

19.- Azida de 2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosilo. (XVI)

Se disuelven 15 g. (0,032 moles) de 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosilo en 225 ml. de éter seco y, se pasa una corriente de ácido clorhídrico anhidro hasta obtener una disolución clara, que se deja una noche en la nevera. Pasado este tiempo, se evapora la disolución y, el residuo se evapora dos veces con 20 ml. de benceno seco y una vez con 20 ml. de tolueno. El residuo se hierve a reflujo durante 2 horas con 15 g. (0,23 moles) de azida sódica en 190 ml. de acetonitrilo. La disolución se filtra y se evapora. Así se obtiene un aceite que no se puede recristalizar, aunque en la literatura<sup>57</sup> aparece descrito como sólido de p.f. 70°C. El aceite se purifica por cromatografía sobre columna de gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla de acetato de etilo:éter de petróleo (1:1) se obtienen así 12,2 g. (88%) de un producto cromatográficamente puro, que se identificó por su espectro de i.r. (banda de tensión N $\equiv$ N a 2130 cm<sup>-1</sup>) y reacciones posteriores.

20.- Azida de bencilo.

Una mezcla de 45 ml. de etanol absoluto, 15 g. (0,23 moles) de azida sódica pura y 20 g. (0,15 moles) de cloruro de bencilo se mantiene, con agitación magnética, y a reflujo (protegido de la humedad) durante 6 horas. Al ca

bo de este tiempo, ha precipitado cloruro sódico, y se añaden 50 ml. de agua destilada. La fase orgánica, que contiene la azida de bencilo, se separa y la fase acuosa se extrae con éter dos veces y, los extractos etéreos se unen a la fase orgánica, que se seca con cloruro cálcico y se concentra a vacío. El residuo contiene la azida de bencilo, que se purifica por destilación a 82,5°C y 16,5 mm. Hg. Rto. 90% sobre cloruro de bencilo; (p.eb. bibl. 82,5°C a 16,5 mm. Hg)<sup>131</sup>

21.- 1-Bencil-4-hidroximetil-1,2,3-triazol. (XXIII)

Una mezcla de 2,8 g. (0,05 moles) de alcohol propargílico, 24 g. de tolueno y 6,7g. (0,05 moles) de azida de bencilo se calienta a reflujo durante 8 horas 30 minutos. Al enfriarse la reacción se obtienen unas agujas blancas que se recristalizan de benceno, p.f. 76-77°C; (p.f. bibl. 76-76,5°C)<sup>71</sup>. Rto. 3,5 g. (36%).

II.- SINTESIS DE DERIVADOS NO GLICOSIDICOS DE 1H-1,2,3-TRIAZOL Y v-TRIAZOL

1.- 4(5)-Hidroximetil-v-triazol. (XXXVIII)

A un matraz de 50 ml. se agregan 6,42 g. (0,056 moles) de azida de trimetilsililo, 2,80 g. (0,05 moles) de alcohol propargílico y 10 ml. de tolueno anhidro. La mezcla se mantiene a reflujo (en ausencia de humedad) y con agitación magnética durante 6 horas. A continuación, se añaden 40 ml. de metanol y la mezcla se calienta brevemente. Se concentra a vacío y queda un residuo siruposo de 0,52 g. que se purifica en cromatografía de capa fina preparativa utilizando como eluyente la mezcla metanol:acetato de etilo:cloroformo (1:1:1). Al extraer, con metanol, la única banda visible al iluminar la placa con luz ultravioleta se obtienen 0,264g. (6%) de un sirupe amarillo pálido; u.v.

$\lambda_{\text{máx}}^{\text{agua}} = 240 \text{ nm } (\epsilon, 605)$ ;  $^1\text{H r.m.n. (DMSO) } \delta: 4,60 \text{ (s, 2, CH}_2\text{)}, 7,75 \text{ (s, 1, CH)}$ ; m/e (%): 99  $\text{M}^+$  (19), 100  $\text{M}+1$  (3), 98 (27), 96 (5), 82 (9), 80 (17), 70 (100), 54 (30)

2.- 4,5-Bis(hidroximetil)-v-triazol. (XXXIX)

Una mezcla de 4,30 g. (0,05 moles) de 1,2-dihidroxibutino-2, 25 ml. de tolueno anhidro y 10 g. (0,087 moles) de azida de trimetilsililo se calienta en tubo cerrado a 95-100°C durante 34 horas, tiempo en el que se ha consumido

prácticamente el compuesto acetilénico. Al cabo de este tiempo se añaden 50 ml. de metanol, manteniéndose la mezcla con agitación magnética durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, se concentra a vacío en el rotavapor obteniéndose 5,28 g. de un residuo siruposo que se purifica mediante cromatografía de capa fina preparativa, utilizando como eluyente la mezcla metanol:acetato de etilo:cloroformo (1:1:1). Se recoge como producto final (extraído con metanol) la banda más intensa al revelar una placa preparativa con iodo. Dicha banda da lugar a 0,93 g. (14%) de un sirupe denso amarillo pálido; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{agua}} = 237 \text{ nm}$  ( $\epsilon$ , 370); m/e (%): 129  $M^+$  (3), 130  $M+1$  (2), 128 (6,5), 112 (15), 111 (100), 110 (42), 100 (15), 98 (7,5), 88 (11), 82 (17), 72 (8,5), 70 (15), 54 (92)

Análisis (%):

Calc. para $C_4H_7N_3O_2$ .....	C 37,25	H 5,42	N 32,56
Encontrado.....	37,25	5,40	32,53

3.- 1-Bencil-4-clorometil-1,2,3-triazol. (XXIVa)

a) Sobre 10 ml. de benceno anhidro se agregan 1,80g. (0,0136 moles) de azida de bencilo y 1,80 g. (0,024 moles) de cloruro de propargilo. La mezcla se calienta a reflujo, en ausencia de humedad, durante 5 horas, después se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo que queda se recristaliza de etanol dando lugar a 0,302 g. (10%) de

un sólido blanco que se identifica XXIVa de p.f. 114-116°C;

$$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 231 \text{ nm } (\epsilon, 1.270)$$

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{Cl}$ ...	C 57,85	H 4,82	N 20,25	Cl 17,06
Encontrado.....	57,75	4,77	20,18	17,35

b) A una disolución de 3,78 g. (0,02 moles) de 1-bencil-4-hidroximetil-1,2,3-triazol (XXIII) en 20 ml. de acetonitrilo anhidro se añaden 5,76 g. (0,022 moles) de tri fenilfosfina y 5 ml. de tetracloruro de carbono. La disolución se agita durante la noche y, después se concentra a vacío. El residuo se trata con 200 ml. de una mezcla de éter sulfúrico/éter de petróleo (1/1) fría (baño de hielo) y se agita magnéticamente durante dos horas hasta que se alcanza la temperatura ambiente. Se filtra y el filtrado se evapora a vacío, quedando un residuo que se recristaliza de etanol, dando lugar a 1,43 g. (47%) de un sólido blanco de p.f. 114-116°C idéntico al descrito anteriormente.

4.- 1-Bencil-4-bromometil-1,2,3-triazol. (XXIVb)

a) En un matraz provisto de agitación magnética, refrigerante de reflujo y tubo de cloruro cálcico, se calienta a reflujo una mezcla de 2 g. (0,015 moles) de azida de bencilo, 3,32 g. (0,028 moles) de bromuro de propargilo y 10 ml. de benceno anhidro. Transcurridas 5 horas se elimi-

nan los disolventes, apareciendo un residuo sólido blanco, 0,36 g. (10%), que se filtra y recristaliza de etanol, p.f. 124-126°C; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 236 \text{ nm}$  ( $\epsilon$ , 2.270)

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{Br}$ ...	C 47,62	H 3,99	N 16,66	Br 31,72
Encontrado.....	47,90	4,11	16,90	31,70

b) Se disuelven 3,78 g. (0,02 moles) de 1-bencil-4-hidroximetil-1,2,3-triazol (XXIII) en 20 ml. de 1,2-dimetoxietano anhidro y se agregan 6,2 g. (0,02 moles) de fosfito de trifenilo. La mezcla resultante se mantiene con agitación magnética a 0°C durante media hora. A continuación, se añaden (manteniendo a 0°C la mezcla) gota a gota 3,20 g. (0,02 moles) de bromo. Se deja la reacción a temperatura ambiente cuatro días, transcurridos lo cuales se concentra la disolución obteniéndose un residuo de 3,75 g. que se cromatografía en capa fina preparativa, utilizando como eluyente cloroformo:éter de petróleo (3:1). Al eluir con acetato de etilo la banda más intensa de las que se observan a la luz ultravioleta, se obtiene un sólido blanco que se recristaliza de etanol dando lugar a 1,32 g. (27%) de un producto de p.f. 124-126°C, idéntico al descrito anteriormente.

5.- 1-Bencil-4-iodometil-1,2,3-triazol. (XXIVc)

A un matraz enfriado en baño de hielo, provisto

de agitación magnética, que contiene una disolución de 0,94 g. (0,005 moles) de 1-bencil-4-hidroximetil-1,2,3-triazol (XXIII) en 10 ml. de 1,2-dimetoxietano anhidro, se agregan 1,55 g. (0,005 moles) de fosfito de trifenilo. Transcurridos unos treinta minutos se añaden 1,27 g. (0,005 moles) de iodo, y se continúa la agitación hasta que la reacción alcanza lentamente la temperatura ambiente. Transcurridas 24 horas se elimina el disolvente en el rotavapor. El residuo siruposos (3,75 g.) se distribuye en placas de cromatografía preparativa que se eluyen dos veces consecutivas con la mezcla cloroformo:éter de petróleo (3:1). De las dos bandas observadas a la luz ultravioleta, se recoge la más próxima al origen obteniéndose 1,12 g. (76%) de un sólido amarillo que se recristaliza de etanol, p.f. 124-125°C; u.v.

$$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 241 \text{ nm} (\epsilon, 3.980), h (275 \text{ nm}; \epsilon 1.200)$$

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{I}$ .....	C 40,13	H 3,34	N 14,04	I 42,47
Encontrado.....	40,03	3,60	14,50	42,64

6.- 1-Bencil-4-fluorometil-1,2,3-triazol. (XXIVa)

Se disuelven 0,50 g. (0,0019 moles) del éter 18-crown-6 en 12 ml. de acetonitrilo seco y, a continuación, se agregan 0,58 g. (0,01 mol) de fluoruro potásico anhidro; después de agitar la mezcla media hora se añaden 1,26 g. (0,005 moles) de 1-bencil-4-bromometil-1,2,3-triazol (XXIVb).

La mezcla resultante se mantiene a reflujo, en ausencia de humedad, durante 33 horas. A continuación se elimina el disolvente en el rotavapor y se obtienen 1,68 g. de un sirupe que se distribuye en placas de cromatografía de capa fina preparativa. Estas placas se eluyen con la mezcla acetato de etilo:éter de petróleo (1:1). De las dos bandas observadas a la luz ultravioleta, se recoge la más intensa y de mayor recorrido, que da lugar a 0,30 g. (30%) de un sólido blanquecino que se recristaliza de etanol, p.f. 46-48°C; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 228 \text{ nm} (\epsilon, 990)$

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{F}$	C 62,83	H 5,24	N 21,98	F 9,95
Encontrado.....	62,85	5,31	21,74	10,10

### III.- SINTESIS DE DERIVADOS GLICOSIDICOS DE 1H-1,2,3-TRIAZOL

Procedimiento general de obtención de nucleosidos por cicloadición dipolar-1,3 de acetilenos a azidas de glicosilo.

En un matraz de 100 ml. provisto de agitación magnética, se suspenden o disuelven de 0,0028 a 0,01 moles de azida de glicosilo en 10 - 30 ml. de tolueno anhidro. A continuación se agregan 0,0028-0,097 moles del compuesto acetilénico correspondiente, y la mezcla de reacción se mantiene a reflujo, en ausencia de humedad, durante el tiempo necesario, normalmente de 3 a 17 horas. Seguidamente, se concentra a vacío en el rotavapor, y el residuo se recristaliza o se cromatografía en placas preparativas utilizando el eluyente adecuado.

1.- 4- y 5-Clorometil-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol. (XLVIIa) y (XLVIIIa)

De forma análoga a la descrita anteriormente, una mezcla de 3,73 g. (0,01 mol) de azida de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (XIII), 1,48 g. (0,02 moles) de cloruro de propargilo y 15 ml. de tolueno anhidro se calienta durante 17 horas, manteniendo la temperatura del baño a 125-130°C. Seguidamente, la disolución se concentra hasta obtener un sólido de color oscuro. Una de las placas prepa

rativas se pulveriza con una mezcla de ácido sulfúrico:etanol (7:3) y se calienta a 100°C durante 15 minutos, lo que da lugar a la aparición de dos bandas carbonizadas. Como se pudo comprobar posteriormente, la banda más próxima al origen corresponde al isómero 5-clorometílico y la más alejada al isómero 4-clorometílico. La separación de los dos productos se lleva a cabo por recristalizaciones sucesivas en etanol. De esta forma se obtienen 2,10 g. (48%) de un sólido blanco que se identifica como XLVIIa de p.f. 169-170°C; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{Me OH}} = 226 \text{ nm} (\epsilon, 2.345)$

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_9\text{Cl}$ ...	C 45,58	H 4,91	N 9,38	Cl 7,91
Encontrado.....	45,49	4,61	9,56	8,15

De las aguas madres anteriores, una vez eliminado el etanol, se obtienen 0,80 g. (18%) de un sólido blanco que se recristaliza de metanol y que se identifica como XLVIIIa, de p.f. 129-130°C; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 232 \text{ nm} (\epsilon, 2.345)$

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_9\text{Cl}$ ...	C 45,58	H 4,91	N 9,38	Cl 7,91
Encontrado.....	45,40	4,60	9,25	7,53

2.- 4- y 5- Bromometil-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol. (XLIXa) y (Ia)

Según el procedimiento general descrito anterior

mente, una mezcla de 3,73 g. (0,01 mol) de azida de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (XIII) y 1,45 g. (0,012 moles) de bromuro de propargilo y 20 ml. de tolueno anhidro se calienta durante 5 horas en un baño de aceite cuya temperatura es de 110-115°C. Después se concentra la disolución hasta obtener 4,02 g. de un sirupe espeso que se disuelve en la mínima cantidad de cloroformo y, se distribuye en placas de cromatografía de capa fina preparativa. Las placas se desarrollan con la mezcla acetato de etilo:éter de petróleo (1:1). A la luz ultravioleta se detectan tres bandas fundamentales que se separan y, los productos se extraen con acetato de etilo. De la banda más alejada del origen se obtienen 1,17 g. de la azida de partida XIII sin reaccionar.

De la segunda banda se aislan 0,74 g. (22%) (teniendo en cuenta la azida recuperada) de un sólido blanco que se recristaliza de metanol y se identifica como XLIXa, p.f. 151-152°C;  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 235 \text{ nm}$  ( $\epsilon$ , 2.440)

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_9\text{Br}$	C	41,46	H	4,50	N	8,53	Br	16,26
Encontrado.....		41,20		4,50		8,68		16,08

De la banda más próxima al origen se extraen 0,33g. (10%) (teniendo en cuenta la azida recuperada) de un sirupe amarillo pálido, que se identifica como La.

Análisis (%):

Calc. para $C_{17}H_{22}N_3O_9Br$ ..	C 41,46	H 4,50	N 8,53	Br 16,26
Encontrado.....	41,65	4,73	8,68	16,04

3.- 4- y 5-Hidroximetil-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol. (LVIIa) y (LVIIIa)

Una mezcla de 3,73 g. (0,01 mol) de azida de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (XIII), 2,92 g. (0,052 moles) de alcohol propargílico y 20 ml. de tolueno anhidro se calienta durante 8 horas manteniendo la temperatura del baño a 100-105°C. Seguidamente, y siguiendo la técnica experimental descrita, se concentra la disolución obteniéndose 4,67 g. de un residuo rojizo que se distribuye en placas de cromatografía de capa fina preparativa. Estas placas se desarrollan con la mezcla acetato de etilo: cloroformo (2:1). Al iluminar con luz ultravioleta una placa se observa el frente superior de una banda mayoritaria. Al extraer esta banda con acetato de etilo, se obtienen 2,49 g. (58%) de un sólido, cromatográficamente homogéneo, que se recristaliza de n-butanol y se identifica como una mezcla (1:1) de los dos isómeros 4- y 5- hidroximetílicos LVIIa y LVIIIa, p.f.(mezcla) 148-150°C;  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 228 \text{ nm}$  ( $\epsilon$ , 2.150)

Análisis (%):

Calc. para $C_{17}H_{23}N_3O_{10}$ .....	C 47,55	H 5,39	N 9,78
Encontrado.....	47,49	5,45	9,58

4.- 4,5-Bis(hidroximetil)-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol. (LVIIIa)

Se sigue el procedimiento habitual según el cual una mezcla de 3,73 g. (0,01 mol) de azida de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (XIII), 1,2 g. (0,014 moles) de 1,4-dihidroxibutino-2 y 25 ml. de tolueno anhidro, se calienta 14 horas en un baño de aceite, cuya temperatura es de 125-130°C. A continuación, se concentra a vacío en el rotavapor y, se obtienen 3,89 g. de un sirupe espeso oscuro que se distribuye sobre placas de cromatografía de capa fina preparativa. Las placas se desarrollan con la mezcla acetato de etilo:metanol (9:1). Al carbonizar una placa (como se ha descrito anteriormente) se observan tres bandas, siendo la más intensa y mayoritaria la más próxima al origen. Al extraer esta banda con la mezcla acetato de etilo:metanol (9:1) se obtienen 1,31 g. (28%) de un sólido blanco que se recristaliza de n-butanol y se identifica como LVIIIa de p.f. 158-160°C; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 233 \text{ nm}$  ( $\epsilon$ , 1.710)

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_{11}$ .....	C 46,95	H 5,69	N 9,12
Encontrado.....	46,92	5,46	8,96

5.- 4,5-Bis(clorometil)-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol. (LIa)

a) Una mezcla de 3,73 g. (0,01 mol) de azida de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (XIII), 10 ml. de tolueno anhidro y 3,27 g. (0,026 moles) de 1,4-diclorobutino-2 se calienta durante 4 horas en un baño de aceite cuya temperatura es de 115-120°C. Seguidamente, se concentra la disolución obteniéndose 6,51 g. de un sólido de color beige constituido por la azida de partida XIII y el nucleosido esperado IIa, como se comprueba por cromatografía de capa fina utilizando como eluyente acetato de etilo:éter de petróleo (1:1) y posterior carbonización. Por recristalizaciones sucesivas, de metanol, de este residuo sólido se obtienen finalmente 2,23 g. (45%) de IIa como sólido blanco de p.f. 184-186°C;  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}} = 236 \text{ nm}$  ( $\epsilon$ , 3.100)

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_9\text{Cl}_2 \cdot \text{C}$	43,46	H 4,82	N 8,45	Cl 14,28
Encontrado.....	43,53	4,65	8,19	14,54

b) En un matraz se disponen 0,5 ml. de tetracloruro de carbono, 5 ml. de acetonitrilo anhidro, entonces se añaden 0,045 g. (0,1 mmol) de 4,5-bis(hidroximetil)-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol (LVIIIa) y 0,78 g. (0,3 mmoles) de trifenilfosfina. La mezcla se agita durante 24 horas a temperatura ambiente y, después se concentra la disolución hasta obtener 0,16 g. de un sirupe oscuro que se distribuye en placas de cromatografía de capa fina preparativa. Estas placas se desarrollan

dos veces consecutivas con acetato de etilo:éter de petróleo (2:1). A la luz ultravioleta se observan dos bandas, de las cuales sólo se carboniza la más próxima al origen. Al extraer la banda con acetato de etilo se obtienen 0,045 g. (30%) de un sólido cromatográficamente puro e idéntico a IIa obtenido en el apartado anterior a), p.f. 184-186°C (de metanol).

6.- 4,5-Bis(bromometil)-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol. (IIIa)

a) Según el procedimiento general ya descrito, una mezcla de 1,04 g. (0,0028 moles) de azida de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosilo (XIII), 0,607 g. (0,0028 moles) de 1,4-dibromobutino-2 y 10 ml. de tolueno anhidro, se calienta durante 15 horas en un baño de aceite cuya temperatura es de 105-110°C. Seguidamente, se concentra la disolución hasta obtener un sirupe que se distribuye en placas de cromatografía de capa fina preparativa. Estas placas se desarrollan con acetato de etilo:éter de petróleo (1:1). A la luz ultravioleta se detectan cuatro bandas de las que sólo carbonizan las dos de menor recorrido, que se extraen con acetato de etilo.

De estas bandas, la más rápida corresponde a la azida de partida XIII sin reaccionar.

De la banda más próxima al origen se obtienen 0,21 g. (13%) de un sólido blanco IIIa que se recristaliza de etanol, p.f. 154-156°C; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 254 \text{ nm}$  ( $\epsilon$ , 4.340)

Análisis (%):

Calc. para C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> Br <sub>2</sub> .	C 36,86	H 4,10	N 7,17	Br 27,30
Encontrado.....	37,01	3,98	7,22	27,68

b) Se disuelven 0,30 g. (0,0006 moles) de 4,5-bis (hidroximetil)-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol (LVIIIa) en 10 ml. de 1,2-dimetoxietano anhidro y, se añaden 0,37 g. (0,0012 moles) de fosfito de trifenilo. La mezcla se mantiene, con agitación magnética, a 0°C, durante media hora. A continuación se agregan 0,197g. (0,0012 moles) de bromo y se continúa la agitación, mientras la mezcla alcanza la temperatura ambiente, durante 72 horas. Seguidamente, se concentra la disolución hasta obtener un sirupe oscuro (1,05g.) que se distribuye en placas de cromatografía preparativa. Las placas se desarrollan con cloroformo:etanol (10:1). A la luz ultravioleta se observan dos bandas mayoritarias, de las que sólo se carboniza la de menor recorrido, que se extrae con acetato de etilo. Esta banda llega a dar 0,07 g. (21%) de un sólido blanco que se recristaliza de etanol y de p.f. 154-156°C, idéntico en todos los aspectos a LIIIa obtenido anteriormente en el apartado a).

7.- 4-Iodometil-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol. (LIXa)

Se disuelven 2 g. (0,0046 moles) de una mezcla al

50% de 4- y 5-hidroximetil-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol (LVIIa) y LVIIa) en 20 ml. de 1,2-dimetoxietano anhidro y, seguidamente, se añaden 1,43 g. (0,0046 moles) de fosfito de trifenilo. La mezcla se mantiene, con agitación magnética, a 0°C durante 20 minutos. A continuación, se agregan 1,17 g. (0,0046 moles) de iodo, permaneciendo el conjunto a la temperatura de un baño de hielo hasta que éste funde. Transcurridas 24 horas a la temperatura ambiente, se concentra la disolución obteniéndose 4,69 g. de un sirupe rojizo que se distribuye en placas de cromatografía de capa fina preparativa. Estas placas se eluyen con acetato de etilo:éter de petróleo (1:1). A la luz ultravioleta se observan tres bandas, de las que sólo se carbonizan las dos de menor recorrido, que se extraen con acetato de etilo. De estas bandas la más alejada del origen da lugar a 1,13 g. (45%) de un sólido blanco que se recristaliza de etanol, y que se identifica como LXa de p.f. 155-157°C; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 239 \text{ nm}$  ( $\epsilon$ , 4.155), h (270 nm;  $\epsilon$ , 1.180)

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_9\text{I}$ ....	C 38,22	H 4,14	N 7,85	I 23,56
Encontrado.....	38,22	4,14	7,85	23,51

De la banda más próxima al origen se extraen 0,54g. (22%) de un glass rojizo, cuyo análisis elemental da una fórmula empírica idéntica a la de LXa, pero cuyo espectro

de r.m.n. indica que puede tratarse de un compuesto polimérico.

- 8.- 4- y 5-Clorometil-1-(2,3,4-tri-0-acetil- $\beta$ -D-ribo-  
piranosil)-1,2,3-triazol. (XLVIIc) y (XLVIIIc) y  
4-clorometil-1-(2,3,5-tri-0-acetil- $\beta$ -D-ribofura-  
nosil)-1,2,3-triazol. (XLVIIId)

De forma análoga, se disuelven en 15 ml. de tolueno anhidro 3,01 g. (0,01 mol) de azida de 2,3,4-tri-0-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosilo (XIV) y se agregan 1,37 g. (0,018 moles) de cloruro de propargilo. La mezcla se calienta durante 7 horas en un baño de aceite cuya temperatura es de 110-115°C. A continuación se filtra, y el filtrado se evapora a sequedad quedando 3,55 g. de un sirupe oscuro que se distribuye en placas de cromatografía de capa fina preparativa. Estas placas se desarrollan tres veces consecutivas con acetato de etilo:éter de petróleo (1:1). A la luz ultravioleta se observan cuatro bandas, de ellas (al carbonizar una placa) se carbonizan las dos primeras y la cuarta con respecto al origen. Las bandas seleccionadas se extraen con acetato de etilo.

De la banda más alejada del origen se extraen 0,75 g. de la azida de partida XIV.

De la segunda banda se obtienen 0,63 g. (22%) de un sólido blanco que se recristaliza de etanol, p.f. 124-126°C y se identifica como 4-clorometil-1-(2,3,4-tri-0-ace

til- $\beta$ -D-ribopiranosil)-1,2,3-triazol (XLVIIc); u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}}$   
 = 229 nm ( $\epsilon$ , 1.550)

Análisis (%):

Calc. para $C_{14}H_{18}O_7N_3Cl$ ..	C 44,74	H 4,79	N 11,18	Cl 9,45
Encontrado.....	44,86	4,84	11,21	9,35

La extracción de la primera banda con respecto al origen conduce a 0,65 g. de un sirupe que vuelve a cromatografiarse en placas de cromatografía preparativa. Estas placas se desarrollan cuatro veces consecutivas en la mezcla acetato de etilo:cloroformo:éter de petróleo (1:2:2). Al extraer la banda mayoritaria con acetato de etilo se obtienen 0,42 g. (15%) de un sirupe, cromatográficamente homogéneo, que se identifica por su espectro de r.m.n. como una mezcla de los isómeros 5-clorometil-1-(2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosil)-1,2,3-triazol y 4-clorometil-1-(2,3,5-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribofuranosil)-1,2,3-triazol, (XLVIIIc) y (XLVIIId); u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}} = 231$  nm ( $\epsilon$ , 2.165)

Análisis (%):

Calc. para $C_{14}H_{18}O_7N_3Cl$ ..	C 44,74	H 4,79	N 11,18	Cl 9,45
Encontrado.....	44,34	5,21	10,74	9,45

9.- 4-Bromometil-1-(2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosil)-1,2,3-triazol. (XLIXc)

Según el procedimiento general, una mezcla de

3,01 g. (0,01 mol) de azida de 2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribo piranosilo (XIV), 2,79 g. (0,023 moles) de bromuro de propargilo y 25 ml. de tolueno anhidro, se calienta durante 6 horas en un baño de aceite cuya temperatura es de 100-105°C. Seguidamente, se filtra la mezcla reaccionante y el filtrado se evapora a sequedad quedando 3,36 g. de un sirupe oscuro que se distribuye en placas de cromatografía de capa fina preparativa. Estas placas se desarrollan con acetato de etilo:éter de petróleo (1:1). A la luz ultravioleta son visibles tres bandas que se separan y los productos se extraen con acetato de etilo.

De la banda más próxima al origen se aislan 0,72 g. de un sirupe, cromatográficamente homogéneo cuyo análisis elemental concuerda aproximadamente con el que debería tener el isómero 5-bromometílico ( $C_{14}H_{18}O_7N_3Br$ ) pero cuyo espectro de r.m.n., de gran complejidad, impidió hacer una asignación definitiva.

De la segunda banda se extraen 1,02 g. (36%) de un sólido blanco que se recristaliza de n-propanol (se tienen en cuenta los 0,98 g. de la azida de partida XIV que se obtienen de la banda más alejada del origen) y que se identifica como XLIXc de p.f. 128-131°C; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}} = 233 \text{ nm}$  ( $\epsilon$ , 3.120)

Análisis (%):

Calc. para $C_{14}H_{18}O_7N_3Br$ ..	C 40,00	H 4,31	N 9,99	Br 19,05
Encontrado.....	40,04	4,46	9,64	19,14

10.- 4- y 5-hidroximetil-1-(2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosil)-1,2,3-triazol. (LVIc) y (LVIIc)

Se sigue el procedimiento general de obtención de nucleosidos. Una mezcla de 15 ml. de tolueno anhidro, 3,01 g. (0,01 mol) de azida de 2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosilo (XIV) y 1,33 g. (0,02 moles) de alcohol propargílico. La mezcla se calienta durante 9 horas en un baño de aceite cuya temperatura es de 115-120°C. Seguidamente, se eliminan los disolventes a vacío, obteniéndose 3,5 g. de un sirupe oscuro que se distribuye en placas de cromatografía de capa fina preparativa. Estas placas se eluyen dos veces consecutivas con acetato de etilo. A la luz ultravioleta se observan dos bandas más importantes que se extraen con acetato de etilo.

De la banda más alejada del origen se obtienen 0,62 g. de la azida de partida XIV sin reaccionar.

De la banda más lenta, se extraen 1,40 g. (40%) de un sirupe, cromatográficamente homogéneo, cuyo espectro de r.m.n. demuestra ser una mezcla de los dos isómeros 4- y 5-hidroximetílicos LVIc y LVIIc; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 229 \text{ nm}$   
( $\epsilon$ , 3.120)

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_8$ .....	C 47,05	H 5,32	N 11,76
Encontrado.....	46,80	5,56	11,33

11.- 4-Iodometil-1-(2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribo-  
piranosil)-1,2,3-triazol. (LXc)

Se disuelven 1,82 g. (0,005 moles) de una mezcla de 4- y 5-hidroximetil-1-(2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribo-  
piranosil)-1,2,3-triazol (LVIc) y (LVIIc) en 10 ml. de 1,2-  
dimetoxietano anhidro y, seguidamente, se añaden 1,55 g.  
(0,005 moles) de fosfito de trifenilo. La mezcla se mantiene,  
con agitación magnética, a 0°C durante 20 minutos. Se-  
guidamente se añaden 1,27 g. (0,005 moles) de iodo, permaneciendo  
la reacción a la temperatura de un baño de hielo hasta que éste se  
funde. Después, la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente  
durante 4 días, al cabo de los cuales aún queda producto sin reaccionar,  
por ello se agregan 0,15 g. (0,0005 moles) de fosfito de trifenilo y,  
a continuación, 0,13 g. (0,0005 moles) de iodo. Dos días más tarde  
una muestra cromatográfica revela que las relaciones de productos son  
análogas, por ello se concentra la disolución hasta obtener 5,00 g. de  
un sirupe rojizo que se distribuye en placas de cromatografía de capa  
fina preparativa. Estas placas se desarrollan dos veces consecutivas  
con acetato de etilo:éter de petróleo (2:1). A la luz ultravioleta se  
detectan cuatro bandas. Al carbonizar una de estas placas, carbonizan  
las dos bandas de menor recorrido y una tercera banda más lenta  
todavía, no visible a la luz ultravioleta.

Se extraen estas tres bandas de las placas no

carbonizadas, con acetato de etilo. De la banda de menor recorrido se aislan 0,47 g. de producto de partida (la mezcla LVI<sub>c</sub> y LVII<sub>c</sub>).

De la primera banda se obtiene un producto de tipo polimérico, mientras que de la segunda se extraen 0,75g. (44%) de un sólido amarillo que se recristaliza de etanol, p.f. 125-127°C; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{MeOH}} = 232 \text{ nm}$  ( $\epsilon$ , 5.490)

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_7\text{I}$ .....	C 35,97	H 3,85	N 8,99	I 27,19
Encontrado.....	36,04	3,94	8,48	26,65

12.- 1-(2-Acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-4- y 5-clorometil-1,2,3-triazol. (XLVII<sub>b</sub>) y (XLVIII<sub>b</sub>)

Según el procedimiento general ya descrito, una mezcla de 3,72 g. (0,01 mol) de azida de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (XV), 7,23 g. (0,097 moles) de cloruro de propargilo y 30 ml. de tolueno anhidro se calienta durante 12 horas en un baño de aceite cuya temperatura es de 110-115°C. Después se concentra la disolución hasta obtener 3,85 g. de un sirupe oscuro que se distribuye en placas de cromatografía de capa fina preparativa. Las placas se desarrollan cuatro veces consecutivas con acetato de etilo:cloroformo (3:1). Se carboniza una placa y las dos bandas que aparecen se recogen por aproxi-

mación, extrayendo con acetato de etilo.

De la banda más alejada del origen se aislan 2,12 g. (46%) de un sólido blanco que se recristaliza de etanol, p.f. 180-182°C, que se identifica como XLVIIb; u.v.

$$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 225 \text{ nm } (\epsilon, 1.700)$$

Análisis (%):

Calc. para $C_{17}H_{23}N_4O_8Cl$ ..	C 45,69	H 5,15	N 12,54	Cl 7,93
Encontrado.....	45,98	5,13	12,65	7,90

Al extraer la banda más próxima al origen se obtienen 1,15 g. (26%) de un sólido blanco que se recristaliza de etanol, p.f. 175-177°C y se identifica como XLVIIIb;

$$\text{u.v. } \lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 224 \text{ nm } (\epsilon, 4.515)$$

Análisis (%):

Calc. para $C_{17}H_{23}N_4O_8Cl$ ..	C 45,69	H 5,15	N 12,54	Cl 7,93
Encontrado.....	45,40	5,34	12,55	7,96

13.- 1-(2-Acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-4- y 5-hidroximetil-1,2,3-triazol. (LVIIb) y (LVIIIb)

Se sigue el procedimiento habitual de síntesis de nucleosidos, por el que una mezcla de 3,72 g. (0,01 mol) de azida de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (XV), 4,10 g. (0,073 moles) de alcohol pro

pargílico y 25 ml. de tolueno anhidro se calienta durante 7 horas en un baño de aceite cuya temperatura es de 110-115°C. A continuación, se concentra la disolución hasta obtener 4,61 g. de un sirupe oscuro que se distribuye en placas de cromatografía de capa fina preparativa y, se desarrollan cuatro veces consecutivas con la mezcla cloroformo: etanol (10:1). A la luz ultravioleta se aprecian dos frentes débiles que corresponden a dos bandas intensas al carbonizar y, los productos se extraen con cloroformo y etanol.

La banda de mayor recorrido da lugar a 1,35 g. (32%) de un sólido blanco que se recristaliza de etanol, p.f. 180-182°C y que se identifica como LVIIb; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$  = 229 nm (  $\epsilon$ , 2.280)

Análisis (%):

Calc. para $C_{17}H_{24}N_4O_9$ .....	C 47,65	H 5,64	N 13,07
Encontrado.....	47,44	5,63	12,79

De la banda más próxima al origen se recogen 1,71 g. (40%) de un sólido blanco que se recristaliza de etanol, p.f. 211-212°C y que resulta ser LVIb; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$  = 228 nm (  $\epsilon$ , 2.540)

Análisis (%):

Calc. para $C_{17}H_{24}N_4O_9$ .....	C 47,65	H 5,64	N 13,07
Encontrado.....	47,79	5,49	13,00

14.- 4,5-Bis(hidroximetil)-1-(2-acetamido-2-desoxi-

3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol. (LVIIIb)

Según el procedimiento general descrito anteriormente, una mezcla de 3,72 g. (0,01 mol) de azida de 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilo (XV), 0,86 g. (0,01 mol) de 1,4-dihidroxi-butino-2 y 30 ml. de tolueno anhidro se calienta 11 horas en un baño de aceite cuya temperatura es de 115-120°C. Seguidamente, se concentra la disolución hasta obtener 4,32 g. de un sirupe rojizo, que se purifica en cromatografía de columna utilizando etanol como eluyente. Así, se extraen 3,02 g. (66%) de un glass color mostaza, cromatográficamente puro, que se identifica como LVIIIb; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 233 \text{ nm}$  ( $\epsilon$ , 3.160)

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_{10}$ .....	C 47,06	H 5,88	N 12,20
Encontrado.....	46,77	5,65	11,77

15.- 1-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-4-bromometil-1,2,3-triazol.  
(LIX)

Se disuelven 0,619 g. (1,45 mmoles) de 1-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-4-hidroximetil-1,2,3-triazol (LVIb) en 10 ml. de 1,2-dimetoxietano anhidro y, seguidamente, se agregan 0,449 g. (1,45

mmoles) de fosfito de trifenilo. La mezcla se mantiene, con agitación magnética, a 0°C durante 20 minutos. A continuación, se añaden 0,232 g. (1,45 mmoles) de bromo, permaneciendo el conjunto a la temperatura del baño de hielo hasta que éste funde. Transcurridas 24 horas a la temperatura ambiente se concentra la disolución, obteniéndose 1,10 g. de un sirupe oscuro que se distribuye en placas de cromatografía de capa fina preparativa. Estas placas se eluyen tres veces consecutivas en acetato de etilo. A la luz ultravioleta se detectan tres bandas de las que sólo se carboniza la de recorrido medio. Esta se extrae con acetato de etilo, dando lugar a 0,15 g. (21%) de un sólido blanco que se recristaliza de etanol, p.f. 143-145°C y que se identifica como LIX; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 230 \text{ nm}$  ( $\epsilon$ , 2.540)

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_8\text{Br}$	C 41,54	H 4,68	N 11,40	Br 16,19
Encontrado.....	41,02	4,57	11,02	15,85

16.- 4-Clorometil-1-(2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosil)-1,2,3-triazol. (XLVIIe)

Siguiendo el procedimiento ya descrito, una mezcla de 4,87 g. (0,01 mol) de azida de 2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosilo (XVI), 2,90 g. (0,04 moles) de cloruro de propargilo y 15 ml. de tolueno anhidro se calienta durante 10 horas en un baño de aceite cuya temperatura se mantiene

ne a 100-105°C. Después se concentra la disolución hasta obtener 5,76 g. de un sirupe oscuro que se distribuye sobre placas de cromatografía de capa fina preparativa. Estas placas se desarrollan seis veces consecutivas con la mezcla acetato de etilo:éter de petróleo (1:3). A la luz ultravioleta se observan dos bandas fundamentales, que se extraen con acetato de etilo.

De la banda de mayor recorrido se aislan 0,94 g. de la azida de partida XVI.

La segunda banda se vuelve a cromatografiar utilizando como eluyente la misma mezcla y desarrollándolas nueve veces consecutivas. Al extraer el producto de la banda mayoritaria, se obtienen 1,19 g. (27%) de un sólido blanco que se recristaliza de n-propanol y se identifica como XLVIIe, p.f. 110-112°C; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 247 \text{ nm}$  ( $\epsilon$ , 5.900) h (276 nm;  $\epsilon$ , 3.170), h (283 nm;  $\epsilon$ , 2.710)

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{N}_3\text{Cl}$ .....	C 61,98	H 4,27	N 7,48	Cl 6,32
Encontrado.....	61,69	4,22	7,31	6,62

17.- 4-Bromometil-1-(2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosil)-1,2,3-triazol. (XLIXe)

Según el procedimiento general descrito con anterioridad, una mezcla de 4,87 g. (0,01 mol) de azida de 2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosilo (XVI), 5,49 g. (0,046 moles) de bromuro de propargilo y 15 ml. de tolueno anhi-

dro se calienta durante 4 horas en un baño de aceite cuya temperatura es de 120-125°C. A continuación, se concentra la disolución hasta obtener 5,17 g. de un sirupe oscuro que se distribuye en placas de cromatografía preparativa. Estas placas se desarrollan tres veces consecutivas con acetato de etilo:éter de petróleo (1:2). A la luz ultravioleta se aprecian tres bandas que se extraen con acetato de etilo. De la banda de mayor movilidad se obtienen 1,68 g. de la azida de partida sin reaccionar.

De la segunda banda se aislan 2,03 g. (63%) (te niendo en cuenta la azida recuperada) que resulta ser un sirupe que se oscurece y descompone con el tiempo y, se identifica como XLIXe.

Análisis (%):

Calc. para $C_{29}H_{24}O_7N_3Br$ ..	C 57,42	H 3,98	N 6,92	Br 13,20
Encontrado.....	57,70	4,21	6,61	13,06

De la banda más próxima al origen se obtienen 0,23 g. (7%) de un sirupe que oscurece con el tiempo, cuyo microanálisis concuerda exactamente con el que debería tener el isómero 5-bromometílico, pero cuyo espectro de r.m.n., de gran complejidad, impidió hacer una asignación definitiva.

18.- 4,5-Bis(clorometil)-1-(2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)-1,2,3-triazol. (LIIe)

Según el procedimiento general descrito con ante

rioridad, una mezcla de 4,87 g. (0,01 mol) de azida de 2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosilo (XVI), 4,91 g. (0,04 moles) de 1,4-diclorobutino-2 y 15 ml. de tolueno anhidro se calienta durante 3 horas en un baño de aceite cuya temperatura es de 125-130°C. A continuación se concentra la disolución hasta obtener 6,15 g. de un sirupe oscuro que se cromatografía en columna utilizando como eluyente acetato de etilo:éter de petróleo (1:4). De dicha columna se eluyen dos productos, de la banda más rápida se recogen 1,55 g. de la azida de partida XVI, sin reaccionar.

De la banda más lenta, se extraen 2,12 g. (38%) (teniendo en cuenta la azida recuperada) de un sirupe que se identifica como IIe; u.v.  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} = 248 \text{ nm}$  ( $\epsilon$ , 11.670), h (275 nm;  $\epsilon$ , 2.135), h (282 nm;  $\epsilon$ , 1.830)

Análisis (%):

Calc. para $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{N}_3\text{Cl}_2$ .	C 58,91	H 4,25	N 6,87	Cl 11,62
Encontrado.....	59,03	4,16	6,25	11,73

## IV.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CITOSTATICA "IN VITRO"

## IV.A.- MATERIALES Y METODOS

1.- Origen de los productos utilizados.

Colorante Violeta cristal. Ferosa  
5-Fluor-uracilo (5-FU). Roche  
Glutamina-TC 5789. Difco  
6-Mercapto-purina (6-MP). Gayoso Wellcome S.A.  
Metanol. Merck  
TC-Fetal calf serum, desiccated 5065. Difco  
TC-Gey solution, Dried 0796-23. Difco  
TC-Hanks solution, Dried 5775. Difco  
TC-Minimal Medium Eagle, 5675. Difco  
TC-Penicillin-Streptomycin Desiccated, 5854-  
60. Difco  
Tripsina 1:250, 0152-15. Difco  
TC-Phenol red solution 1%, 5358. Difco  
Tween-80. Carlo Erba

2.- Preparación del medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado es el "TC-Minimal Medium Eagle" 5675. Se trata de un medio sintético que contiene los compuestos usuales para el cultivo de cé-

lulas en monocapa. Su preparación a partir del polvo liofilizado es como sigue: se suspenden 9,06 g. del liofilizado en 972 ml. de agua bidestilada, agitándose enérgicamente hasta su total disolución. A continuación se añaden 6 ml. de glutamina-TC al 5% y 2 ml. de cloruro cálcico al 2%. Se calienta a 37°C y se agregan 20 ml. de bicarbonato sódico al 10%. Se pasa una corriente de carbógeno hasta que el pH queda entre 7,2-7,4, controlándolo con indicador rojo fenol. Se esteriliza el líquido por filtración a presión a través de un filtro "Millipore" y finalmente se agregan 100 unidades de penicilina G y 100 mcg. de estreptomicina por ml de medio, suplementando finalmente el medio con 110 ml. de suero de feto de ternera. Estas últimas adiciones se han de efectuar en condiciones rigurosamente estériles. Si en el transcurso de estas operaciones se eleva el pH del medio debido a una posible pérdida de dióxido de carbono, es necesario volver a pasar a través del líquido una corriente de carbógeno estéril hasta lograr el pH indicado

### 3.- Preparación de reactivos.

Líquido de Bouin.

Consta de dos soluciones A y B que se mezclan en el momento de su uso en la proporción de 19 partes de A y 1 parte de B.

La solución A está formada por 10 g. de áci

do pícrico disuelto en 750 ml. de agua destilada, más 250 ml. de formaldehído; la solución B es ácido acético glacial.

#### 4.- Mantenimiento de la línea celular.

Entre las numerosas líneas de células establecidas hemos elegido las células "HeLa", originarias de un carcinoma de útero humano, aisladas por primera vez por Gey y col.<sup>120</sup> en 1952. La sublínea de éstas que mantenemos en nuestro laboratorio desde 1969, proceden del Instituto Superior de Sanidad de Roma.

Las células se mantienen en cultivo estacionario en monocapa. Dos veces por semana se le da un pase a las células, para lo que se tripsiniza la monocapa celular y se pone un pequeño inóculo en una botella de cultivo conteniendo medio fresco.

#### 5.- Método de ensayo.

El procedimiento seguido es una modificación<sup>132</sup> del establecido en los protocolos de "screening" del "Cancer Chemotherapy National Service Center". U.S.A.<sup>133</sup>

Se basa, en el estudio comparativo de la proliferación celular en condiciones normales de cultivo, con la posible inhibición de crecimiento originada por la

sustancia ensayada a concentraciones seriadas de la misma en condiciones idénticas de cultivo.

El proceso se realiza partiendo de una o varias botellas Rous de cultivo de 200 ml. de capacidad con una superficie por pared de  $50 \text{ cm}^2$  (12x4 cm), que posee una monocapa celular repleta.

Se desecha el medio antiguo (3 ó 4 días de incubación) y se lava la capa celular con 2 ml. de tripsina al 0,25%. A continuación se añaden 5 ml. de tripsina al 0,25% y se deja actuar durante unos 2 minutos hasta que se observa un ligero desprendimiento de la monocapa. Se desecha la tripsina y se deja estar la botella hasta que se aprecie claramente el desprendimiento de la capa celular de la superficie de vidrio. Seguidamente se añaden 6 ml. de medio de cultivo fresco procediéndose a la disgregación de las masas celulares con la pipeta mediante aspiraciones y proyecciones enérgicas contra las paredes del frasco.

Se centrifuga después la suspensión celular a 800 r.p.m. durante cinco minutos, eliminándose a continuación el líquido sobrenadante con una pipeta. Se añaden al residuo unos ml. de medio fresco, se resuspenden las células y se toman dos o tres muestras a distintas diluciones de la suspensión homogeneizada para calcular, mediante recuento en el hematocitómetro, previa tinción con violeta cristal el número de células viables por ml. Posteriormente se diluye con el medio de cultivo necesario hasta obtener una sus-

pensión de la concentración deseada ( $0,8-1,2 \times 10^5$  células/ml.)

Seguidamente se preparan los tubos de cultivo Leighton (tubos de ensayo Pyrex con pozo de superficie plana, de área  $4 \times 1,25 \text{ cm}^2$ ). Con una jeringa automática se distribuye la suspensión celular obtenida anteriormente a razón de 1,8 ml. por tubo, de forma que se mantenga homogénea en todo momento mediante agitación magnética. Esta operación ha de efectuarse con rapidez a fin de evitar la alcalinización del medio. Una vez tapados los tubos con tapón de caucho se colocan en gradillas que los mantienen en posición horizontal con un ángulo de inclinación de  $5^\circ$  y de forma que el pozo de cultivo quede en la parte inferior, incubando a continuación en una estufa a  $37^\circ\text{C}$  durante tres o cuatro horas, hasta que se depositen las células y comiencen a adherirse al vidrio.

Al cabo de este tiempo se verifica la buena marcha del cultivo en cada tubo mediante examen microscópico directo, para proceder seguidamente a agregar las sustancias a ensayar.

Los productos se ensayan a tres niveles de dosis: 100, 10 y  $1 \mu\text{g/ml}$ , probándose previamente el disolvente o el emulgente adecuado. En nuestro caso se utilizó metanol acuoso a una concentración final (1%) no tóxica ó Tween 80 al 0,2% en el caso de prepararse las muestras en forma de suspensiones.

Cada dosis se ensaya por duplicado, poniéndose así mismo controles en blanco a los que se adiciona

idéntico volumen (0,2 ml.) del vehículo empleado para las sustancias.

Los tubos se incuban en la estufa a 37°C durante tres días y al cabo de este tiempo se sacan y estudian al microscopio. Posteriormente, para lograr mayor precisión en la lectura de los resultados, se fijan y tiñen las capas celulares. Para ello, se procede a tirar el medio antiguo contenido en los tubos Leighton, lavando las monocapas dos o tres veces con suero salino a 37°C. Para la fijación de las células se añaden a cada tubo 2 ml. de líquido de "Bouin", dejando actuar durante 10 ó 15 minutos. Finalizado este período de tiempo, se desecha el líquido y se enjuagan los tubos varias veces con etanol al 80%, hasta que se observe una decoloración prácticamente total de las monocapas celulares. Seguidamente se dejan secar los tubos, situándolos boca a bajo (dentro de las propias gradillas), sobre papel de filtro. Una vez secos se estiman los resultados comprobando la extensión de las capas celulares en las áreas de cultivo en cada tubo, mediante su observación con lupa a 25-50 aumentos, siempre comparativamente a los controles en blanco.

Si en este primer ensayo que incluye tres niveles de dosis a intervalos logarítmicos, se observa actividad a concentraciones inferiores a 10 µg/ml., se procede a un segundo ensayo para definir con precisión la  $DI_{50}$  (dosis de inhibición 50, aquélla a la que tiene lugar una inhibición del crecimiento celular en un 50%). En esta re-

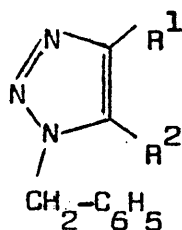
petición las dosis se seleccionan de modo que la  $DI_{50}$  aproximada obtenida en el ensayo anterior queda incluida en el centro de una serie de diluciones (generalmente cinco) que se duplican hacia arriba de ese valor y se dividen a la mitad por debajo del mismo. Una vez obtenidos los valores de los porcentajes de inhibición con arreglo a estas últimas diluciones se determina por interpolación la  $DI_{50}$  definitiva.

Como control positivo se emplea 6-mercaptopurina, 6-MP, cuya  $DI_{50}$  debe ser  $\leq 0,1 \mu\text{g/ml}$ . Así mismo en los controles en blanco el grado de desarrollo del cultivo debe ser máximo.

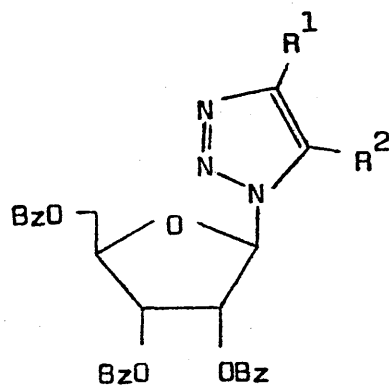
#### IV.B.- RESULTADOS

Los resultados de estos estudios se resumen en las Tablas VII y VIII, en las que se expresa la actividad de cada uno de los compuestos en función de la  $DI_{50}$ . De acuerdo con los protocolos establecidos por el "Cancer Chemotherapy National Service Center" U.S.A.<sup>133</sup>, se considera significativa la actividad de todas aquellas sustancias cuya  $DI_{50} \leq 6 \mu\text{g/ml}$ .

TABLA VII. Actividad citostática "in vitro" frente a células HeLa de los derivados 1-ribofuranosil- y 1-bencil-halometil-1,2,3-triazoles.

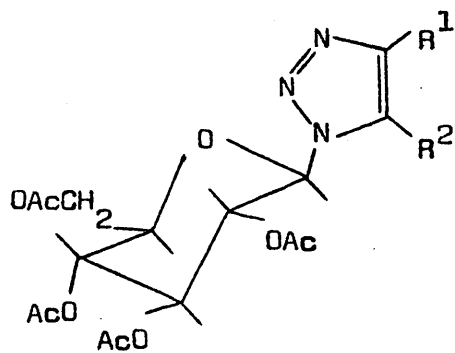


Compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	DI <sub>50</sub> (μg/ml)
XXIV <sub>b</sub>	CH <sub>2</sub> Br	H	2
XXIV <sub>c</sub>	CH <sub>2</sub> I	H	2
XXIV <sub>a</sub>	CH <sub>2</sub> Cl	H	18
XXIV <sub>d</sub>	CH <sub>2</sub> F	H	> 100

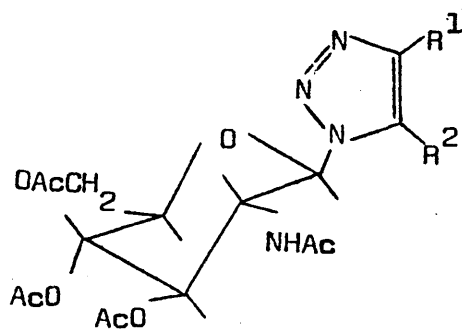


Compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	DI <sub>50</sub> (μg/ml)
XLIX <sub>e</sub>	CH <sub>2</sub> Br	H	50
XLVII <sub>e</sub>	CH <sub>2</sub> Cl	H	> 100
LI <sub>e</sub>	CH <sub>2</sub> Cl	CH <sub>2</sub> Cl	40

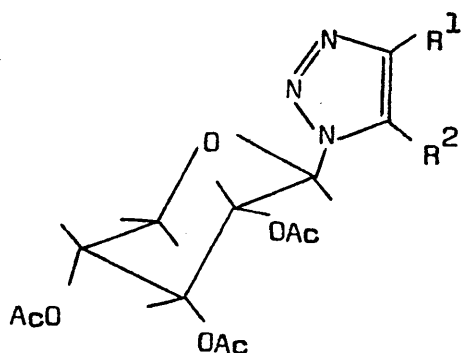
TABLA VIII. Actividad citostática "in vitro" frente a células HeLa de los derivados 1-glucopiranosil-, 1-(2-glucosaminapiranosil)- y 1-ribopiranosil-halo ó hidroximetil-1,2,3-triazolas.



Compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	DI <sub>50</sub> (μg/ml)
XLIX <sub>a</sub>	CH <sub>2</sub> Br	H	3,5
L <sub>a</sub>	H	CH <sub>2</sub> Br	4
LII <sub>a</sub>	CH <sub>2</sub> Br	CH <sub>2</sub> Br	3
LX <sub>a</sub>	CH <sub>2</sub> I	H	2
XLVII <sub>a</sub>	CH <sub>2</sub> Cl	H	37
LI <sub>a</sub>	CH <sub>2</sub> Cl	CH <sub>2</sub> Cl	6
LVIII <sub>a</sub>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	>100
LVI <sub>a</sub>	CH <sub>2</sub> OH	H	>100
LVII <sub>a</sub>	H	CH <sub>2</sub> OH	



Compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	DI <sub>50</sub> (μg/ml)
XLIX <sub>b</sub>	CH <sub>2</sub> Br	H	20
XLVII <sub>b</sub>	CH <sub>2</sub> Cl	H	20
XLVIII <sub>b</sub>	H	CH <sub>2</sub> Cl	25
LVI <sub>b</sub>	CH <sub>2</sub> OH	H	>100
LVII <sub>b</sub>	H	CH <sub>2</sub> OH	>100
LVIII <sub>b</sub>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	>100



Compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	DI <sub>50</sub> (g/ml)
LX <sub>c</sub>	CH <sub>2</sub> I	H	1,5
XLIX <sub>c</sub>	CH <sub>2</sub> Br	H	2,5
XLVII <sub>c</sub>	CH <sub>2</sub> Cl	H	55
LVIII <sub>c</sub>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	>100

A P E N D I C E

## ACTIVIDAD CITOSTÁTICA "IN VIVO"

Se ha iniciado el estudio de la actividad citostática "in vivo" frente a dos sistemas de tumores trasplantables de ratón: ECA (carcinoma ascítico de Ehrlich) y S-180 (sarcoma 180) de los compuestos seleccionados, por su citotoxicidad significativa, en la primera fase ("in vitro").

Paralelamente a estos estudios, como parte de un plan de trabajo más amplio que se viene desarrollando en la Sección de Citobiología, en el "Cancer Chemotherapy National Service Centre" U.S.A. se ha realizado el ensayo de algunos de estos compuestos frente a otros sistemas tumorales.

En este apéndice referimos brevemente algunos de los resultados más significativos respecto a la actividad citostática "in vivo" obtenidos en dicho Centro. Para ello reproducimos aquí las tablas con los datos referentes al compuesto: 4-bromometil-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol, (XLIX<sub>a</sub>), NSC 266997, frente a dos sistemas tumorales de ratón: PS (leucemia linfocítica P-388) y CD (tumor de mama CD8F1), así como un sucinto comentario sobre su interpretación.

La primera tabla se refiere al estudio sobre el tumor PS. Se utilizan ratones CDF<sub>1</sub> (Host 06) inoculados con el tumor un día antes de iniciar el tratamiento de nue

ve días de duración. En el casillero correspondiente a "Tumor Evaluation" se pueden observar los días de supervivencia de los animales tratados ("test") y de los usados como control. La relación entre estos dos valores nos da en el encuadramiento siguiente (T/C%) el porcentaje de incremento de supervivencia de los animales tratados respecto a los controles.

En el caso de animales macho (sex M) se logra un T/C = 127% a dosis de 50 mg/Kg/día que sobrepasa el límite de supervivencia (125%) establecido como significativo. Con animales hembras (sex F) a esta misma dosis de 50 mg/Kg/día se alcanza un T/C = 163% altamente significativo, bajando este porcentaje al disminuir la dosis. En cambio, dosis superiores a 200 ó 100 mg/Kg/día resultan tóxicas.

En la tabla siguiente se resume el estudio de este mismo compuesto sobre el "Tumor CD". Los animales en este caso son ratones de la raza CD8F<sub>1</sub> (Host 49) inoculados con el tumor un día antes de iniciar el tratamiento de siete días de duración. En este caso al tratarse de un tumor de mama (sólido) el parámetro T/C% se refiere al cociente entre la media de peso de los tumores desarrollados en los animales tratados y la misma media del tumor de los animales control. Como se puede observar en la casilla correspondiente, la dosis óptima resulta también de 50 mg/Kg/día con un porcentaje de desarrollo tumoral del 46% respecto al control, incrementándose éste al disminuir la dosis. Dó-

sis superiores, como en el caso anterior, resultan ineficaces o tóxicas. Los métodos seguidos en estos estudios vienen detallados en los Protocolos del "Cancer Chemotherapy National Service Centre" U.S.A.<sup>133</sup>

Otros compuestos estudiados en este mismo Centro (LII<sub>a</sub>, NSC 268393; LIII<sub>a</sub>, NSC 283147; XXIV<sub>b</sub>, NSC 283149) no han mostrado actividad significativa en el sistema PS-(P-388). No obstante prosiguen en la actualidad estos estudios, tanto por parte de los compuestos reseñados anteriormente, como con otros nuevos enviados recientemente.

DIST. CODE **E95 A**      1ST SCR **28**  
 SI ONS **K**      M.C. DATE **0P 769**  
 M.C. DATE **6/27/77**      COR       OTHER   
 PARTIAL SAC      NSC 266997      PROS **2**  
 DIVISION OF CANCER TREATMENT  
 NATIONAL CANCER INSTITUTE, BETHESDA, MD. 20014

SCREENING DATA SUMMARY  
 DEVELOPMENTAL THERAPEUTICS PROGRAM  
 DIVISION OF CANCER TREATMENT  
 NATIONAL CANCER INSTITUTE, BETHESDA, MD. 20014

SAMPLE NUMBER	HOST	TUMOR	PARAMETER	SITE	TISSUE	LEVEL	SCREENER	CONTROL NUMBER	DATE		VEHICLE	ROUTE	INTERVAL	DAY 1ST INJ	NO OF INJECTIONS	DAY OF EVALUATION	DOSE/INJ.	TOXICITY DAY SURVIVORS	CURSES	CONTROL BODY WEIGHT CHANGE (T-C)	ANIMAL WEIGHT DIFF. (T-C)	TUMOR EVALUATION		PER. CENT (T/C) %	TEST STATUS CODE	CROSS
									YR.	MO.												TEST	CONTROL			
M06	PS	3	1	16	28	0225	762	762	762	T1	+1	1	0930	200	1	6	1.6	-3.8	3.0	11.0	22E1					
M06	PS	3	1	16	28	0225	762	762	762	T1	+1	1	0930	100	2	6	1.6	-3.2	5.3	11.0	22E1					
M06	ES	3	1	16	28	0225	762	762	762	T1	+1	1	0930	50.0	6	6	1.6	2.2	14.0	11.0	127	22E1				
F06	PS	3	1	16	28	0533	765	765	765	T1	+1	1	0930	50.0	6	6	1.2	-2.0	19.0	11.6	163	22E1				
F06	PS	3	1	16	28	0533	765	765	765	T1	+1	1	0930	25.0	6	6	1.2	-0.7	17.3	11.6	149	22E1				
F06	ES	3	1	16	28	0533	765	765	765	T1	+1	1	0930	12.5	6	6	1.2	-1.0	15.3	11.6	131	22E1				
F06	ES	3	1	16	28	0533	765	765	765	T1	+1	1	0930	6.25	6	6	1.2	-1.1	10.8	11.6	93	22E1				
NA00	F06	PS	3	1	16	28	1533	775	775	T1	+4	1	0330	300	4	6	1.5	-5.8	6.0	11.2	22E1E					
NA00	F06	ES	3	1	16	28	1533	775	775	T1	+4	1	0330	200	4	6	1.5	-1.8	6.8	11.2	22E1E					
NA00	F06	ES	3	1	16	28	1533	775	775	T1	+4	1	0330	100	6	6	1.5	-1.0	11.1	11.2	99	22E1E				
NA00	F06	PS	3	1	16	28	1533	775	775	T1	+4	1	0330	50.0	6	6	1.5	-0.7	11.4	11.2	101	22E1E				

END OF NSC

2409

PRINT CRITERIA  
 DISTR. CODE  
**E95B**  
 1ST SCR  
**28**  
 M.C. DATE  
**0P 769**  
 S.I. ONS  
**K**  
 M.C. DATE  
**0P 769**  
 ACO  
 DATE  
**769**  
 R.C. DATE  
 R.C. DATE  
 PUB  
 COR  
 BSF  
 OTHER

SCREENING DATA SUMMARY  
 DEVELOPMENTAL THERAPEUTICS PROGRAM  
 DIVISION OF CANCER TREATMENT  
 NATIONAL CANCER INSTITUTE, BETHESDA, MD. 20014

PARTIAL SAC  
 NSC 266997  
 Date  
**6/09/78**  
 Page  
**2**

SAMPLE NUMBER	SEX	HOST	TUMOR	PARAMETER	SITE	TISSUE	LEVEL	SCREENER	CONTROL NUMBER	DATE		VEHICLE	ROUTE	INTERVAL	DAY 1ST INJ	NO OF INFECTIONS	DAY OF EVALUATION	DOSE NO	DOSE/INJ	TOXICITY DAY SURVIVORS	RES	CONTROL BODY WEIGHT CHANGE	ANIMAL WEIGHT DIFF. (T-C)	TUMOR EVALUATION		PER. CENT (T/C) %	TEST STATUS CODE	C S O U
										Y	MO													TEST	CONTROL			
NB00F49		CD	7	2	2J	09	0165	784	N1	+7	1	05301	200	110	*	.3	2.7	0	2475	22	2*							
NB00F49		CD	7	2	2J	09	0165	784	N1	+7	1	05302	100	810	*	.3	1.72	2522	2475	101	22	2*						
NB00F49		CD	7	2	2J	09	0165	784	N1	+7	1	05303	50.0	910	*	.3	1.51	1152	2475	46	22	2*						
NB00F49		CD	7	2	2J	09	0165	784	N1	+7	1	05304	25.0	1010	*	.3	.22	2001	2475	80	22	2*						
NB00F49		CD	7	2	2J	09	0165	784	N1	+7	1	05305	12.5	710	*	.3	1.52	138	2475	86	22	2*						
NB00F49		CD	7	2	2J	09	0165	784	N1	+7	1	05306	6.25	910	*	.3	.12	2038	2475	82	22	2*						

END OF NSC 988

C O N C L U S I O N E S

Se ha llevado a cabo la obtención de una serie de halometil-1,2,3-triazoles sustituidos en N-1 por dos procedimientos. El primero consiste en la reacción de cicloadición dipolar-1,3 de azidas de glicosilo o de azida de bencilo a halometilacetilenos. El segundo consta a su vez de dos etapas: en la primera de ellas, a través de la cicloadición dipolar-1,3 de azidas de glicosilo o de azida de bencilo a hidroximetilacetilenos se llega a hidroximetil-1,2,3-triazoles sustituidos en N-1, mientras la segunda etapa consiste en el tratamiento de los hidroximetil-1,2,3-triazoles, obtenidos en la primera, con distintos agentes halogenantes para dar los halometil-1,2,3-triazoles sustituidos en N-1. Así mismo se ha realizado un estudio de la actividad citostática de los productos sintetizados frente a cultivos de células HeLa en una primera fase de selección. Los compuestos elegidos por su actividad significativa frente a ese sistema "in vitro" han sido enviados al "Cancer Chemotherapy National Service Center" U.S.A. para su estudio "in vivo" frente a diversos sistemas de tumores trasplantables. Uno de estos compuestos ha sido, a su vez, seleccionado por dicho Centro para un estudio más detenido de su actividad, dado el alto porcentaje de supervivencia mostrado frente a un tipo de leucemia linfocítica: P-388.

En las conclusiones que siguen se resumen los aspectos más importantes de este trabajo:

1.- La reacción de azida de bencilo con cloruro de propargilo, bromuro de propargilo o alcohol propargílico conduce a 4-bromometil-, 4-clorometil- ó 4-hidroximetil-1-bencil-1,2,3-triazol respectivamente.

2.- La reacción de 1-bencil-4-hidroximetil-1,2,3-triazol con trifenilfosfina/ $\text{CCl}_4$ , trifenilfosfito/ $\text{Br}_2$  ó trifenilfosfito/ $\text{I}_2$  da lugar a los 4-clorometil-, 4-bromometil- ó 4-iodometil derivados correspondientes.

La reacción de 1-bencil-4-bromometil-1,2,3-triazol con  $\text{KF}/18\text{-crown-6}$  da lugar a 1-bencil-4-fluorometil-1,2,3-triazol.

3.- Varios intentos encaminados a la preparación de 4-halometil-y-triazoles, no han conducido a los resultados esperados. Los intentos realizados han consistido en: a) reacción de cicloadición dipolar-1,3 de azida de trimetilsililo a halometilacetilenos, b) halogenación de hidroximetil-y-triazoles, obtenidos por reacción de azida de trimetilsililo e hidroximetilacetilenos y, c) hidrogenólisis de 1-bencil-1,2,3-triazoles.

El fallo de estos intentos unido a que los halometil-y-triazoles son compuestos de estructura muy sencilla aún no descritos, indica que dichos productos son inestables y que posiblemente no puedan ser obtenidos.

4.- La reacción de cicloadición dipolar-1,3 de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilazida, 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil azida,

2,3,4-tri-O-acetil- $\beta$ -D-ribopiranosil azida ó 2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosil azida a cloruro de propargilo bromuro de propargilo condujo a una mezcla de los dos 4- y 5-halometil-1-glicosil-1,2,3-triazoles isómeros. La reacción del alcohol propargílico con las mismas azidas de glicosilo también condujo a una mezcla de los dos 4- y 5-hidroximetil-1-glicosil-1,2,3-triazoles isómeros. En todas las mezclas predominó el isómero 4-sustituído, menos impedido estéricamente.

5.- La reacción de cicloadición dipolar-1,3 de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil azida ó 2,3,5-tri-O-benzoil- $\beta$ -D-ribofuranosil azida a 1,4-diclorobutino ó 1,4-dibromobutino condujo a los correspondientes 4,5-bis(halometil)-1-glicosil-1,2,3-triazoles. La reacción análoga de 1,4-dihidroxibutino y 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil azida ó 2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil azida dio lugar a los correspondientes 4,5-bis(hidroximetil)-1-glicosil-1,2,3-triazoles.

6.- Los 1-glicosil-halometil-1,2,3-triazoles anteriores también se obtuvieron a partir de los correspondientes 1-glicosil-4-hidroximetil-1,2,3-triazoles por tratamiento de estos últimos compuestos con trifenilfosfina/ $\text{CCl}_4$ , trifenilfosfito/ $\text{Br}_2$  ó trifenilfosfito/ $\text{I}_2$ . Estas reacciones dieron lugar a la formación de los 4-clorometil-, 4-bromometil- ó 4-iodometil-1-glicosil-1,2,3-triazoles respectivamente.

Un tratamiento análogo de los 4,5-bis(hidroxiometil)-1-glicosil-1,2,3-triazoles con trifenilfosfina/ $\text{CCl}_4$  ó trifenilfosfito/ $\text{Br}_2$  condujo a los correspondientes 4,5-bis(clorometil)-, 4,5-bis(bromometil)-1-glicosil-1,2,3-triazoles.

7.- Las estructuras de todos los derivados, tanto bencílicos como glicosídicos, de triazol se han determinado por métodos analíticos y espectroscópicos. La diferenciación entre los isómeros 4- ó 5-sustituídos se realizó mediante la espectroscopía de r.m.n. La conformación C-1 del resto de azúcar de los nucleosidos de tetraacetilglucopiranososa, 2-amino-tetraacetilglucopiranososa y triacetilribopiranososa se determinó mediante la espectroscopía de r.m.n. La configuración  $\beta$  de todos los nucleosidos triazólicos obtenidos, idéntica a la configuración de las azidas de partida correspondientes, también se determinó mediante la espectroscopía de r.m.n.

8.- Actividad "in vitro": Algunos de estos compuestos presentan una actividad muy significativa frente a células HeLa, lo que ha permitido su selección para estudios posteriores "in vivo".

9.- El compuesto 4-bromometil-1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol, presenta una actividad muy interesante frente a un tipo de leucemia linfocítica: P-388. Actualmente prosiguen los estudios en el "Cancer Chemotherapy National Service Centre" U.S.A.

10.- Se ha comprobado una actividad mayor en los derivados bromo- y iodometílicos de los nucleosidos de gluco- y ribopiranososa mientras decrece ostensiblemente, dicha acción citotóxica, en los derivados clorometílicos.

Respecto a los derivados nucleosídicos de glucosamina y ribofuranosa benzoilada la actividad disminuye considerablemente quedando en todos los casos fuera del margen de significancia.

Finalmente se ha comprobado una carencia absoluta de actividad cuando estas estructuras portan un radical hidroximetílico en lugar del halometílico.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- A. Gilman, F.S. Philips, Science 103, 409 (1946).
- 1a.- W.C.J. Ross, en "Biological alkylating agents" (Butterworths, ed.), London (1946).
- 2.- L.M. Schmidt, R. Fradkin, R. Sullivan y A. Flowers, Cancer Chemother. Rep. Suppl. 2, 1 (1965).
- 3.- Handbook of experimental Pharmacology. Vol. XXXVIII, "Antineoplastic and Immunossuppressive Agents". Tomo I (1974) capítulo 3. Tomo II (1975) capítulo 30-35. (SpringerVerlag, ed.), Berlín.
- 4.- W.C.J. Ros, ref. 3. Tomo I, págs. 33-46
- 5.- P.P. Carbone, C.W. Berard, J.M. Bennett, J.L. Ziegler M.L. Cohen y P. Gerber, Annals Intern. Med. 70, 817 (1969).
- 6.- W.J. Yount, T.C. Hall, A. Schilling, R.K. Shadduck, Cancer Chemother. Rep. 51, 517 (1967).
- 7.- L.M. Cobb, T.A. Connors, L.A. Elson, A.H. Khan, B.C.V. Mitchley, W.C.J. Ross y M.E. Whisson, Biochem. Pharmacol. 18, 1519 (1969).
- 8.- T.A. Connors y W.C.J. Ross, Chem. and Ind. 492 (1960).
- 9.- R.A. Kyle, P.P. Carbone, J.J. Lynch, A.H. Owens, G. Costa, R.T. Silver, J. Cuttner, J.B. Harley, L.A. Leone, B.I. Shnider, J.F. Holland, Cancer Res. 27, 510 (1967).
- 10.- A.R. Cassazza, E.L. Cahn, P.P. Carbone, Cancer Chemother. Rep. 51, 91(1967).
- 11.- L.A. Elson, M. Yarman y W.C.J. Ross, Europ. J. Cancer 4, 617 (1968).
- 12.- M.E. Wall, S. Abernethy, F.I. Carol y D.J. Taylor,

- J. Med. Chem. 12, 810 (1969).
- 13.- D.J. Brown, en "The pyrimidines". The chemistry of heterocyclic compounds. (John Wiley, ed.) Interscience, New York (1962). También en "The pyrimidines". Supplement I. The chemistry of heterocyclic compounds. (A. Weisberger y E.C. Taylor, eds.). Interscience (1970).
- 14.- J.A. Montgomery, Ver ref. 3. Tomo I, pág. 97.
- 15.- J.A. Montgomery, K. Hewson y C. temple, J. Med. Phar Chem. 5, 15 (1962).
- 16.- J. Farkas y F. Sorm, Collect. Czech. Chem. Commun. 34, 1696(1969).
- 17.- A.M. Belikova, V.F. Zarytova y N.I. Grineva, Tetrahedron Letters 3557(1967).
- 18.- D. Baerwolf y P. Langen, Nucleic Acid Res. Spec. publ. S, 29 (1975).
- 19.- J. Zemlika, J. Smrt y F. Sorm, Collect. Czech. Chem. Commun. 29, 635 (1964).
- 20.- H.M. Williams, Cancer Chemother. Rep. 32, 73 (1963).
- 21.- F.R. White, Cancer Chemother. Rep. 14, 73 (1961).
- 22.- a) L.B. Townsend, Chem. Rev. 67, 533(1967).  
b) J.T. Witkowski, R.K. Robins, R.W. Sidwell y L.N. Simon, J. Med. Chem. 15, 1150(1972).  
c) G.D. Diana y F. Pancic, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 15, 410(1976).  
d) H. Prusoff y D.C. Ward, Biochem. Pharm. 25, 1233 (1976).
- 23.- a) R. Huisgen, Angew. Chem. Intern. Edit. Eng. 7, 321-406(1968).

- b) R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 2, 565(1963).  
c) R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 2, 633(1963).
- 24.- R.B. Woodward y R. Hoffmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 8, 781(1969).
- 25.- R.A. Firestone, *J. Org. Chem.* 33, 2285(1968).
- 26.- R. Huisgen, *J. Org. Chem.* 33, 2291(1968).
- 27.- R.A. Firestone, *J. Org. Chem.* 37, 2181(1972).
- 28.- R. Huisgen, *J. Org. Chem.* 41, 403(1976).
- 29.- R. Hoffmann y R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* 87, 4388(1965); R. Hoffmann y R.B. Woodward, *Accounts. Chem. Res.* 1, 17(1968).
- 30.- H.N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* 94, 8953(1972); H.N. Houk J. Sims, R.E. Duke Jr., R.W. Strozier y J.K. George, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 7287(1973); H.N. Houk, J. Sims, C.R. Watts y L.J. Kuskus, *Ibid.* 95, 7301(1973); J.Sims y H.N. Houk, *Ibid.* 95, 5789(1973).
- 31.- A. Michael, *J. Prak. Chem.* 2, 4894(1893).
- 32.- G. L'abbé, *Chem. Rev.* 69, 345(1969); G. L'abbé, *Ind. Chim. Belg.* 34, 519(1969).
- 33.- T. Shedarsky, en "The chemistry of the azido group" (S. Patai, ed.), pág. 331. Wiley (Interscience) New York (1971).
- 34.- R. Huisgen, G. Szeimies y L. Möbius, *Chem. Ber.* 100, 2494(1967).
- 35.- G. L'abbé y A. Hassner, *Bull. Soc. Chim. Belg.* 80, 209 (1971).
- 36.- G. Alonso, M.T. García-López, G. García-Muñoz, R. Madro

- ñero y M. Rico, J. Heteroc. Chem. 7, 1269(1970).
- 37.- L. Hörner y W. Kirmse, Ann. 614, 1(1958).
- 38.- J.C. Sheehan y C.A. Robinson, J. Am. Chem. Soc. 73, 1207(1951).
- 39.- G. L'abbé, J.E. Galle y A. Hassner, Tetrahedon Lett. 303(1970).
- 40.- S. Corsano y R. Inverardi, Ric. Sci. 29, 74 (1959); Chem. Abstr. 53, 17108(1959).
- 41.- L. Birkofer, A. Ritter y H. Uhlenbrauck, Chem. Ber. 96, 3280(1963).
- 42.- A. Bertho y H. Nüssel, Ber. 63, 836 (1930); A. Bertho y D. Aures, Ann. 592, 54(1955).
- 43.- F. Micheel y A. Klemer, Advan. Carbohyd. Chem. 16, 95 (1961).
- 44.- F. Micheel y H. Wulff, Ber. 89, 1521(1956).
- 45.- M. Nys y J.P. Verheiden, Bull. Soc. Chim. Belg. 69, 57 (1960).
- 46.- J. Baddiley, J.G. Buchanan, R. Hodges y J.F. Prescott, J. Chem. Soc. 4769(1957).
- 47.- L. Birkofer y A. Ritter, Angew. Chem. 77, 414(1965); Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 4, 417(1965).
- 48.- H. Paulsen, Z. Györgydeak y M. Friedmann, Chem. Ber. 107, 1568(1974).
- 49.- H. Paulsen, Advan. Carbohydr. Chem. 26, 127(1971).
- 50.- W. Pfleiderer y E. Bühler, Chem. Ber. 99, 3022(1966).
- 51.- R.E. Harmon, R.A. Earl y S.K. Gupta, J. Org. Chem. 36, 2553(1971).

- 52.- D. Dunstan y L. Hough, Carbohyd. Res. 23, 17(1972).
- 53.- A. Bertho, Ber. 99, 3033(1965).
- 54.- A. Yamaoto, C. Miyeshita y H. Tsukamoto, Chem. Pharm. Bull. 1036(1965).
- 55.- H. Zinner, Chem. Ber. 83, 153(1950).
- 56.- H.M. Kissman, C. Pidacks y B.R. Baker, J. Am. Chem. Soc. 77, 18(1955).
- 57.- R. Carrington, G. Shaw y D.V. Wilson, J. Chem. Soc. 6864(1965).
- 58.- J. Baddiley, J.G. Buchanan, R. Hodges y J.F. Prescott, J. Chem. Soc., 4769(1957).
- 59.- F. Micheel y G. Baum, Chem. Ber. 90, 1595(1957).
- 60.- Cita 3. Tomo II, págs. 458-464.
- 61.- J. Baddiley, J.G. Buchanan y G.O. Osborne, J. Chem. Soc. 1651(1958); Ibid. 3606(1958).
- 62.- G. García-Muñoz, J. Iglesias, M. Lora-Tamayo y R. Madroño, J. Heteroc. Chem. 5, 699(1968).
- 63.- M.T. García-López, G. García-Muñoz, J. Iglesias y R. Madroño, J. Heteroc. Chem. 6, 639(1969).
- 64.- M.T. García-López, G. García-Muñoz, R. Madroño, An. Quím. 68, 629(1972).
- 65.- J.S. Drisoll, G.F. Hazard Jr., H.B. Wood Jr. y A. Goldin, Cancer Chemother. Rep., Part. 2, 4(2), 1(1974).
- 66.- G. Alonso, M. Fuertes, M.T. García-López, F.G. de las Heras, J.M. Infante y M. Stud, Eur. J. Med. Chem. 13, 155(1978).

- 67.- R.E. Harmon, R.A. Earl y S.K. Gupta, Chem. Commun. 296(1971).
- 68.- H. El Khadem, D. Horton y M.H. Meshreki, Carbohyd.Res. 16, 409(1971).
- 69.- a) R.K. Robins, J.T. Witkowski, Chem. Abstr. 85: 94660v  
b) O. Makabe, S. Fukatsu, S. Umezawa, Bull. Chem. Soc. Jap. 45(8), 2577(1972).  
c) J.T. Witkowski, R.K. Robins y F.A. Lehmul, Chem. Abstr. 85:6010e.  
d) F.A. Lehmul, J.T. Witkowski y R.K. Robins, J. Hete roc. Chem. 9(6), 1195(1972).  
e) T. Sato, T Shimidate y Y. Ishido, Nippon Kagaku Za-sshi, 81, 1440(1960).
- 70.- J. Elguero, E. González y R. Jacquier, Bull. Soc. Chim. France. 2998(1967).
- 71.- Fr. Moulin, Helv. Chim. Acta. 35, 167(1952).
- 72.- D.M. Brown, A.R. Todd y S. Varadarajan, J. Chem. Soc. 868(1957).
- 73.- W. Jahn, Chem. Ber. 98, 1705(1965).
- 74.- R.F. Dods y J.S. Roth, J. Org. Chem. 34, 1627(1969).
- 75.- K. Kikugawa y M. Ichino, J. Org. Chem. 37, 284(1972).
- 76.- T. Yamazaki, K. Matsuda, H. Sugiyama, S. Seto y N. Yamaoka, J.C.S. Perkin I, 1654(1977).
- 77.- K.A. Watanabe, R.S. Goody y J.J. Fox, Tetrahedron 26, 3883(1970).
- 78.- C.L. Stevens, N.A. Nielsen y P. Blumbergs, J. Am. Chem.

Soc. 86, 1894(1964).

- 79.- K. Miyai, R.K. Robins y R.L. Tolman, J. Med. Chem. 15, 1092(1972).
- 80.- R. Mengel y H. Wiedener, Chem. Ber. 109, 1395(1976).
- 81.- J.F. Codington, I. Doerr, D. van Praag, A. Bendich y J.J. Fox, J. Am. Chem. Soc. 83, 5030(1961).
- 83.- L. Goodman en "Basic principles in nucleic acid chemistry" (P.O.P. Ts'0, ed.) Academic Press. Capítulo 2. New York (1974).
- 84.- J.H. Lister en "Fused Pyrimidines", Parte II "Purines" de la serie The chemistry of heterocyclic compounds (A. Weissberg y E.C. Taylor, eds.) Wiley Interscience. New York (1971).
- 85.- D.J. Brown, en "The pyrimidines", cita 13
- 86.- M.J. Robins, Y. Fouron y R. Mengel, J. Org. Chem. 39, 1564(1974); M.J. Robins, R.A. Jones y R. Mengel, J. Am. Chem. Soc. 98, 8213(1976).
- 87.- S. Greenberg y J.G. Moffatt, J. Am. Chem. Soc. 95, 4016 (1973); T.C. Jain, I.D. Jenkins, A.F. Russell, J.P.H. Verheyden y J.G. Moffatt, J. Org. Chem. 39, 30 (1974).
- 88.- J.B. Lee y T.J. Nolan, Can. J. Chem. 44, 1331(1966).
- 89.- F.G. de las Heras, S. Y-K. Tam, R.S. Klein y J.J. Fox, J. Org. Chem. 41, 84 (1976).
- 90.- J.P.H. Verheyden y J.G. Moffatt, J. Org. Chem. 37, 2289 (1972).
- 91.- J. Hooz y S.S.H. Gilani, Can. J. Chem. 46, 86(1968).

- 92.- R.D. Birkenmeyer y F. Kagen, J. Med. Chem. 13, 616(1970).
- 93.- J.P.H. Verheyden y J.G. Moffatt, J. Org. Chem. 35, 2319 (1970), y referencias allí citadas.
- 94.- L. Horner, H. Oediger y H. Horrmann, Ann. 626, 26 (1959)
- 95.- G.A. Wiley, R.L. Hershkowitz, B.M. Rein y B.C. Chung, J. Am. Chem. Soc. 86, 964(1964).
- 96.- H.N. Rydon y B.L. Tonge, J. Chem. Soc. 3043(1965).
- 97.- C.S.L. Baker, P.D. Landor S.R. Landor y A.N. Patel, J. Chem. Soc. 4348(1965).
- 98.- S. Hanessian, M.M. Pompipom y P. Lavallee, Carbohyd. Res. 24, 45(1972).
- L.F. Fieser y M. Fieser, en "Reagents for Organic Chemistry", Tomo I (John Wiley and Sons, eds.) Inc. New York (1967). Ver también Tomos II y VII.
- a) S.R. Landauer y H.N. Rydon, J. Chem. Soc. 2225(1953).
- b) D.G. Coe, S.R. Landauer y H.N. Rydon, J. Chem. Soc. C 2281(1954).
- 100.- J.B. Lee y I.M. Downie, Tetrahedron 23, 359(1967).
- 101.- G.A. Wiley, B.M. Rein y R.L. Hershkowitz, Tetrahedron Lett. 2509(1964).
- 102.- R.D. Chambers, en "Fluorine in Organic Chemistry", págs. 45-46, Wiley Interscience, New York (1973).
- a) Ver ref. 102 págs. 15-26.
- 103.- Y. Kobayashi, C.A. Kashi y K. Morinaga, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 16, 1784(1968).
- 104.- C.J. Pedersen, J. Am. Chem. Soc. 89, 2495 y 7017(1967).

- a) G.W. Gokel y H.D. Durst, *Synthesis*, 168(1976).
- 105.- C.L. Liotta y H.P. Harris, *J. Am. Chem. Soc.* 96, 2250 (1974).
- 106.- A.W. Johnson, *J. Chem. Soc.* 1011(1946).
- 107.- a) R. Huisgen y M. Seidel, *Chem. Ber.* 94, 2509(1961);  
D.R. Sutherland y G. Tennant, *J. Chem. Soc. C*, 2156 (1971); cita 108.
- b) A. Albert, *J. Chem. Soc. C*, 230(1970); *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 461(1972); cita 108.
- c) J.O. Fournier y J.B. Miller, *J. Heterocyc. Chem.* 2, 488(1965).
- d) S. Yamada y T. Mizoguchi, *Chem. Abstr.* 54, 18555c (1960); D.G. Farnum y P. Yates, *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2967(1963).
- 108.- R.H. Wiley, K.F. Hussung y J. Moffatt, *J. Chem. Soc.* 190(1956).
- 109.- N.J. Cusack, B.J. Hildick, D.H. Robinson, P.W. Rugg y G. Shaw, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1720(1973).
- 110.- L.B. Townsend, en "Synthetic procedures in nucleic acid chemistry". (W.W. Zorbach y R.S. Tipson, eds.) Wiley Interscience, New York (1968). Vol. II pág. 267.
- 111.- W.W. Zorbach y R.S. Tipson, eds. "Synthetic procedures in nucleic acid chemistry". Wiley Interscience, New York (1968). Vol. I.
- 112.- M. Kuhn y A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* 51, 163 (1968).

- 113.- H. Eagle, C.G. Foley, An. J. of Med. 21, 739(1956).
- 114.- C. Flood, G. Pincus, F. Tait, S.A.S. Tait y S. Willoughby, J. Clin. Invest. 46, 717(1967).
- 115.- S. Miyamura, Antibiotics and Chemother. 6, 1280(1956).
- 116.- M. Fujikawa, Folia Pharmacol. Japon, 55, 1442(1959).
- 117.- W.E. Siegenthaler, A. Dowdy y J.A. Luetscher, J. Clin. Endocrinol. Metabol. 22, 172(1962).
- 118.- G. Kahlson, E. Rosengren y R. Thunberg, J. Physiol. 169, 467(1963).
- 119.- V.I. Oyama y H. Eagle, Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 91, 305(1956).
- 120.- G. O. Gey, W.A. Coffman y M.T. Kubicek, Cancer Res. 12, 264(1952).
- 121.- H. Eagle, Proc. Soc. exp. Biol., Med. 89, 362(1955).
- 122.- R.J. Bayley y E.A. Evans, J. Label Compounds 2, 1(1966).
- 123.- R.J. Bayley y E.A. Evans, J. Label Compounds 3, 349(1967).
- 124.- W. Stepka y A.S. Larson, "Isotopes in Experimental Pharmacology". University of Chicago Press, Chicago, 7(1965).
- 125.- W. Tarpey, H. Hauptmann, B.M. Tolbert y H. Rapoport, J. Am. Chem. Soc. 72, 5126(1950); H. Rapoport, C.H. Lovell y B.M. Tolbert, J. Am. Chem. Soc. 73, 5900(1951).
- 126.- J.L. Ross, R.L. Mung y A.R. Maas, Science 128, 1279 (1958).
- 127.- G. Mathé, en "Scientific Basis of Cancer Chemotherapy" (Springer-Verlag, eds.) New York Inc., 7(1969).
- 128.- C.E. Redeman y C. Nieman, Organic Synthesis 22, 1.

- a) F. Micheel y A. Klemer, *Advan. Carbohydr. Chem.* 16, 95(1961).
- 129.- D. Horton, *Organic Synthesis*, 46, 1 (1966).
- 130.- E.F. Reckondo y H. Rinderknecht, *Helv. Chim. Acta* 42, 1171(1959).
- 131.- T. Curtius y G. Erhart, *Ber.* 55, 1559(1922).
- 132.- G. Alonso, M. Lora-Tamayo y P. Navarro. Vol. Homenaje Prof. Vara-López (Ed. Sever-Cuesta), págs. 447-452 (1975).
- 133.- R.I. Geran, N.H. Greenberg, M.M. McDonald, A.H. Schumacker y B.J. Abbott, *Cancer Chemoth. Rep. Part* 3(2), 17(1972).