



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

235043

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 07 D 473/18

(22) Přihlášeno 20 05 82
(21) [PV 4403-83]

(32) (31) (33) Právo přednosti od 21 05 81
(267210) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 13 08 84

(45) Vydáno 15 02 87

(72) Autor vynálezu VERHEYDEN JULIEN P., LOS ALTOS, MARTIN JOHN C., REDWOOD CITY (Sp. st. a.)
(73) Majitel patentu SYNTEX (U.S.A.) INC., PALO ALTO (Sp. st. a.)

(54) Způsob přípravy 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guaninu

1

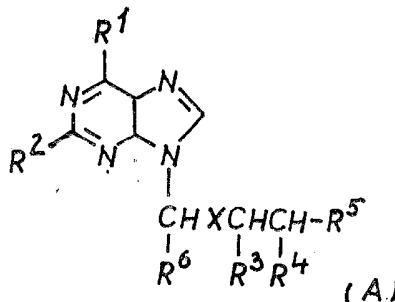
Vynález se týká způsobu přípravy 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guaninu a jeho farmaceuticky vhodných solí, které jsou vhodné jako protivirové látky.

Virové infekce jsou velmi rozšířené a vedou k nejružnějším symptomům. Některým virovým infekcím se snadno předchází ochranným mechanismem těla, zatímco jiné mají mnohem závažnější povahu a vedou k trvalým následkům, například k oslepnutí nebo dokonce k úmrtí. Jedním takovým rodem virů, které způsobují závažné infekce, je skupina virů Herpes.

V současné době používaná léčiva pro ošetřování virových infekcí jsou v mnoha případech neúčinná, nebo pokud jsou účinná, musejí se podávat ve velkých a/nebo v trvalých dávkách, čímž dochází k závažným vedlejším účinkům a/nebo k toxicitě. Proto je potřebný účinný protivirový prostředek, který by byl účinný v menších dávkách než dosud dostupná léčiva, a tak by snižoval nebezpečí vedlejších účinků a toxicitu.

Americký patentový spis číslo 4 199 574 popisuje sloučeninu obecného vzorce A

2



kde znamená

X atom síry,

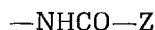
R¹ atom vodíku, atom halogenu, hydroxyskupinu, alkoxy skupinu, azidoskupinu, thioskupinu, alkylthioskupinu, aminoskupinu, alkylaminoskupinu nebo dialkylaminoskupinu,

R² atom vodíku, atom halogenu, alkylthioskupinu, acylaminoskupinu, aminoskupinu nebo azidoskupinu,

R³ atom vodíku, alkylovou skupinu s přímým, rozvětveným nebo cyklickým řetě-

cem, hydroxyalkylovou skupinu, benzyloxyalkylovou skupinu nebo fenylovou skupinu, R⁴ atom vodíku, hydroxyskupinu nebo alkylovou skupinu,

R⁵ atom vodíku, hydroxyskupinu, aminoskupinu, alkylovou skupinu, hydroxyalkylovou skupinu, benzyloxyskupinu, benzoyloxyskupinu, benzoyloxymethylovou skupinu, sulfamoyloxyskupinu, fosfátovou skupinu, karboxypropiamyloxyskupinu, acyloxyskupinu s přímým nebo cyklickým řetězcem s 1 až 8 atomy uhlíku, jako například acetoxykupinu nebo substituovanou karbamoylovou skupinu obecného vzorce



kde znamená

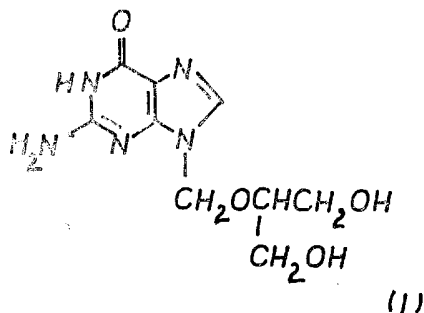
Z alkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo aralkylovou skupinu, popřípadě substituovanou alespoň jednou skupinou sulfonylovou, aminoskupinou, karbamoylovou skupinou nebo atomem halogenu a

R⁶ atom vodíku nebo alkylovou skupinu, za podmínky, že v případě, kdy X znamená atom kyslíku a R², R³, R⁴ a R⁶ znamenají atom vodíku, pak R¹ neznamená aminoskupinu nebo methylaminoskupinu, jestliže R⁵ znamená atom vodíku nebo hydroxyskupinu, nebo její soli.

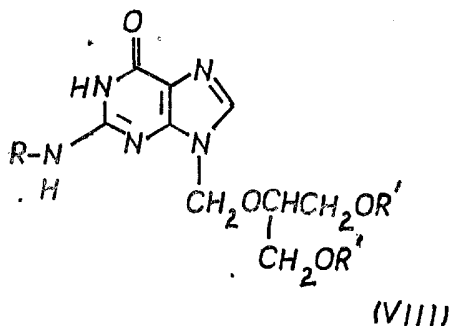
O třídě sloučenin shora uvedeného obecného vzorce A a o jejich farmaceuticky vhodných solích adičních s kyselinami se uvádí, že mají protivirovou účinnost. Viz například Tetrahedron Letters, **21**, str. 327 až 330 (1980).

Nyní se s překvapením zjistilo, že 9-[1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl]guanin a jeho soli jsou obzvláště účinnými protivirovými prostředky. Selektivní účinnost této sloučeniny je zřejmá, jestliže se tato sloučenina porovnává se strukturálně nejpodobnější sloučeninou známou z amerického patentového spisu číslo 4 199 574 při protivirových zkouškách, podrobně popsanych v příkladu 5.

Vynález se tedy týká způsobu přípravy 9-[1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl]guaninu vzorce I



a jeho farmaceuticky vhodných solí, odstraněním chránicí skupiny a hydrolýzou sloučeniny obecného vzorce VIII



kde znamená

R acylovou skupinu obecného vzorce R''CO, kde znamená R'' uhlovodíkovou skupinu s 1 až 10 atomy uhlíku s přímým nebo s rozvětveným řetězcem, například skupinu methylovou, ethylovou, isopropylovou, n-propylovou, n-butylovou, isobutylovou, terc.-butylovou, n-hexylovou, isohexylovou, n-oktylovou, isooktylovou, n-nonylovou, isononylovou, n-decylovou, isodecylovou,

R' chránicí skupinu jako je benzylová skupina, případně substituovaná jednou nebo dvěma skupinami alkylovými nebo alkoxykupinami s 1 až 4 atomy uhlíku v alkylovém podílu nebo v alkoxyypodílu, s výhodou methoxyskupinou nebo methylovou skupinou, nebo její soli a získaný 9-[1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl]guanin se případně převádí na svoji farmaceuticky vhodnou sůl, nebo se sůl 9-[1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl]guaninu převádí na 9-[1,3-dihydroxy-3-propoxymethyl]guanin nebo se sůl 9-[1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl]guaninu převádí na farmaceuticky vhodnou sůl.

Výrazem „farmaceuticky vhodná sůl“ se vždy míní soli, které mají biologickou účinnost a vlastnosti volné sloučeniny a které nejsou biologicky nebo jinak nežádoucí. Soli mohou být buď adiční soli s kyselinou, nebo to mohou být soli anorganické s kovy, s výhodou to jsou soli s kovy alkalických zemin. Vhodnými kyselinami pro přípravu solí jsou anorganické kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková, bromovodíková, kyselina sírová, kyselina dusičná, kyselina fosforečná a jako jsou podobné kyseliny a organické kyseliny, například kyselina trifluorctová, kyselina methansulfonová, ethansulfonová, p-toluensulfonová. Vhodnými zásadami pro přípravu solí jsou organické zásady, anorganické kovové zásady, jako zásadité sloučeniny mědi, stříbra a zásadité sloučeniny alkalických kovů, jako jsou například hydroxidy alkalických kovů, například hydroxid sodný, hydroxid draselný a jako jsou podobné sloučeniny.

Sloučeniny vzorce I, připravené způsobem podle vynálezu a jejich farmaceuticky vhodné soli jsou založeny na objevu, že substitucí 1,3-dihydroxy-2-propoxymethylovou skupinou v poloze 9 guaninového jádra se

získají překvapivě vysoce účinné sloučeniny.

Sloučenina vzorce I a její farmaceuticky vhodné soli mají potenciální protivirotické působení při podávání živočichům, zvláště savcům (zvířatům a lidem), studenokrevným živočichům, jako jsou ryby, a ptákům, zvláště však při podávání lidem. Například sloučenina vzorce I má vynikající působení proti virům Herpes Simplex virus I a II a příbuzným vlivům, jako je cytomegalovirus, Epstein Barr virus a varicella Zoster virus.

Farmaceutické prostředky jak pro veterinární, tak pro humánní medicínu, obsahující sloučeninu vzorce I, vhodné pro protivirotické použití, se připravují o sobě známými způsoby a mohou obsahovat o sobě známé excipienty. Obecně uznávaný soubor takových způsobů a takových složek je popsán v publikaci Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin (Merk Publ. Co., 15. vydání, 1975).

Farmaceutické prostředky mohou také obsahovat další protivirotické účinné látky. Obecně má farmaceutický prostředek obsahovat hmotnostně 0,1 až 90 % účinných látek.

Sloučenina vzorce I se může podávat parenterálně (například intravenózní, intraperitoneální nebo intramuskulární injekcí), orálně, topicky nebo rektálně, v závislosti na tom, zda se prostředku používá pro ošetření vnitřní nebo zevní virové infekce.

V případě vnitřních infekcí se prostředky podávají orálně nebo parenterálně ve formě dávek, přepočtených na volnou zásadu, přibližně 0,1 až 300 mg/kg tělesné hmotnosti savce, s výhodou 1,0 až 30 mg/kg tělesné hmotnosti savce a v případě lidí se může používat jednotkové dávkové formy podávané jednou až čtyřikrát denně při množství 1 až 250 mg na dávkovací jednotku. Pro orální podání mohou jemné prášky nebo granule obsahovat zředovací, dispergační a/nebo povrchově aktivní látky a mohou být obsaženy v doušku vody nebo v sirupu; dále mohou být v kapslích nebo v sáčcích v suchém stavu nebo ve formě nevodného roztoku nebo suspenze, přičemž může být obsaženo suspenzační činidlo; účinná látka může být v tabletách, které mohou obsahovat také pojídla a mazadla, nebo mohou být ve formě suspenzí ve vodě nebo v sirupu. Popřípadě nebo nutně mohou takové farmaceutické prostředky obsahovat chuťové látky, konzervační látky, suspenzační činidla, zahušťovadla nebo emulgátory. Výhodné jsou tablety a granule, přičemž tablety i granule mohou být povlečeny.

Pro parenterální podání nebo pro podání ve formě kapek, jako při ošetřování očních

infekcí, mohou být účinné látky ve formě vodného roztoku o koncentraci hmotnostně 0,1 až 10 %, s výhodou o koncentraci přibližně hmotnostně 0,1 až 7 %. Roztok může obsahovat antioxidanty, pufrý a podobné složky.

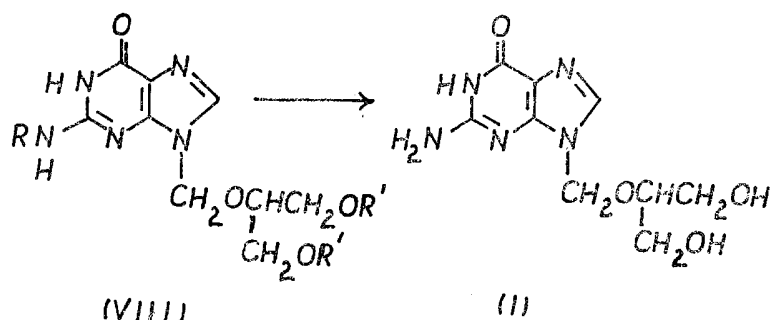
Nebo se pro oční infekce nebo pro jiné venkovní tkáně, například pro ošetřování úst a pokožky, s výhodou nanáší účinná látka na infikované místo na těle nemocného topicky ve formě masti, krému, aerosolu nebo prášku, s výhodou však ve formě masti nebo krému. Účinná látka vzorce I může být obsažena v masti například spolu s ve vodě rozpustnou mastíovou látkou nebo v krému, například v krémové hmotě na bázi oleje ve vodě, v koncentraci přibližně 0,01 až 10 %, s výhodou v množství 0,1 až 7 % a především v množství 0,5 % hmotnost na objem. Kromě toho při virové infekci oka, jako je herpetická keratitis, se může ošetření provádět použitím systému uvolňujícího léčivo, popsaného v americkém patentovém spisu číslo 4 217 898.

Farmaceutické prostředky, obsahující sloučeninu vzorce I, jsou také vhodné pro ošetřování nehumánních savců, ptáků, například kuřat a krůt, a studenokrevných živočichů, jako jsou ryby. Virovým onemocněním ptáků, jako je nemoc New Castle, Marekova nemoc a jako jsou podobné nemoci, lze předcházet a/nebo je lze léčit sloučeninou vzorce I, připravenou způsobem podle vynálezu, a to o sobě známými způsoby z veterinární praxe, jako máčení nenasezených vajec do roztoku obsahujícího sloučeninu vzorce I, vstřikováním sloučeniny vzorce I do ptáků, přičemž sloučenina vzorce I je ve formě vhodného farmaceutického prostředku nebo přidáváním sloučeniny vzorce I do krmiva nebo do napájecí vody.

Ryby, které žijí ve vymezených prostorách, jako jsou bazény, akvária nebo pěstovací nádrže, se rovněž mohou ošetřovat pro zdolávání virové infekce, jako je infekce herpesovitým virem, jako je virus vodních dravých ryb (CCV), salomony působené herpesovým virem, onemocnění Nerka virem a jako jsou podobná onemocnění, přidáváním sloučeniny vzorce I přímo do vody bazény, akvária nebo nádrže pro pěstování ryb nebo vnášením této sloučeniny do krmiva.

Přesný režim podávání sloučeniny I nebo farmaceutických prostředků, které ji obsahují, závisí nutně na potřebách jednotlivého ošetřovaného subjektu, na typu ošetření a na úsudku ošetřujícího.

Sloučenina vzorce I se může připravovat podle následujícího reakčního schématu



přičemž symboly R a R' mají shora uvedený význam.

Jak acylová, tak benzylová chránicí skupina se tedy může odstraňovat ze sloučeniny obecného vzorce VIII najednou za vzniku sloučeniny vzorce I.

Sloučenina obecného vzorce VIII se udržuje pod zpětným chladičem (při teplotě -25 až -40 °C) v roztoku sodíku v kapalném amoniaku, přičemž je sodík přítomen v mírném nadbytku, přičemž se do tohoto roztoku přidá malé množství zdroje protonu, jako je nižší alkylalkohol s přímým nebo rozvětveným řetězcem a s 1 až 4 atomy uhlíku, s výhodou ethanol nebo methanol. Amoniak se odpaří a zbytek se trituruje s amoniumpchloridem za vzniku zbytku, kterým je sloučenina vzorce I.

Farmaceuticky vhodné soli sloučeniny vzorce I se připravují reakcí sloučeniny vzorce I se vhodnou zásadou nebo se vhodnou kyselinou, jak shora uvedeno. Taková konverze se může provádět v rozpouštědle, přičemž se přidává přibližně stechiometricky ekvivalentní množství zásady nebo kyseliny do sloučeniny vzorce I rozpuštěné ve vhodném rozpouštědle při teplotě 0 až 50 stupňů C.

Podobně se sloučeniny vzorce I mohou uvolňovat ze solí sloučeniny vzorce I přidáním stechiometricky ekvivalentního množství zásady do adiční soli s kyselinou, nebo přidáním kyseliny do adiční soli se zásadou sloučeniny vzorce I, rozpuštěné v rozpouštědle při teplotě 0 až 50 °C.

Podobně se sůl sloučeniny vzorce I může převádět na farmaceuticky vhodnou sůl sloučeniny vzorce I, například běžným podvojným rozkladem soli, přičemž se aniont nebo kationt výchozí soli nahrazuje farmaceuticky vhodným aniontem nebo kationtem. Podvojný rozklad soli zpravidla využívá výhody skutečnosti, že se připravuje méně rozpustná sůl z více rozpustné soli při teplotě podvojného rozkladu 0 až 50 °C.

Následující specifický popis příkladů je určen pro pracovníky v oboru k lepšímu pochopení provádění způsobu podle vynálezu. Není míněn jako jakékoliv omezení vynálezu, pouze vynález objasňuje.

Příklad 1

Roztok N²-acetyl-9-(1,3-dibenzyloxy-2-propoxymethyl)guaninu (0,31 g, 0,65 mmolu) v amoniaku (10 ml) a ethanolu (0,1 ml) se zpracovává sodíkem pod zpětným chladičem tak dlouho, až roztok zůstává modrý. Reakce se ukončí přidáním chloridu amonného (0,3 g); přidá se methanol a roztok se odpaří. Zbytek se překrystaluje z vody, čímž se získá 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin.

Příklad 2

Do roztoku sodné soli 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guaninu (0,83 g, 3 mmolu) ve vodě (10 ml) se přidá chlorid amonný (0,48 g, 9 mmolu) a vzniklý roztok se ochladí na teplotu 0 °C. Krystaly se oddělí filtrací a usuší se. Rozpustí se ve vodě (100 mililitrů) obsahující hydroxid draselný (0,17 g, 3 mmoly). Vzniklý roztok se zmrazí, pak se lyofilizuje, čímž se získá draselná sůl 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guaninu.

Příklad 3

9-(1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin se rozpustí ve vodě obsahující 1 molekvivalent hydroxidu sodného. Roztok se pak lyofilizuje, čímž se získá 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin ve formě sodné soli jakožto bílý prášek.

Příklad 4

Sodná sůl 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guaninu se rozpustí v minimálním množství vody a přidá se zředěná chlorovodíková kyselina k nastavení hodnoty pH 7. Z roztoku vykřystaluje 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin o teplotě tání 250 stupňů C za rozkladu.

Příklad 5

Následující příklad objasňuje způsob pří-

pravy reprezentativních farmaceutických prostředků obsahujících účinnou látku vzorce I:

A. Topický prostředek

Účinná látka	0,2 až 2,00 g
Span 60 (sorbitanmonostearát)	2,00 g
Tween 60 (polysorbát 60)	2,00 g
Minerální olej	5,00 g
Petrolatum	10,00 g
Methylparaben	0,15 g
Propylparaben	0,05 g
BHA (butylovaný hydroxyanisol)	0,01 g
Voda	do 100 ml

Všechny shora uvedené složky kromě vody se smíchají a udržují se na teplotě 60 °C za míchání. Pak se přidá dostatečné množství vody o teplotě 60 °C za intenzivního míchání, čímž se získá 100 g krémového prostředku, který se pak ochladí na teplotu místnosti.

Následující prostředek je vhodný pro intraperitoneální a intramuskulární vstřikování.

B. Prostředek pro intraperitoneální a intramuskulární vstřikování

Účinná látka	0,5 g
Propylenglykol	20,0 g
Polyethylenglykol	20,0 g
Tween 80 (polysorbát 80)	1,0 g
0,9% fyziologický roztok	do 100,0 ml

Účinná látka se rozpustí v propylenglykolu, polyethylenglykolu 400 a Tweenu 80. Pak se přidá dostatečné množství fyziologického roztoku 0,9% za míchání k získání 100 ml roztoku pro intraperitoneální nebo intramuskulární vstřikování, který se zfiltruje 0,2 mikrometrovým membránovým filtrem a plní se za sterilních podmínek.

Následující prostředek je vhodný pro intravenózní vstřikování.

C. Prostředek pro intravenózní vstřikování

Účinná látka	0,5 g
0,9% fyziologický roztok	100,0 g

Účinná látka se přidá do 100 ml 0,9% fyziologického roztoku za míchání k získání 100 ml roztoku pro intravenózní vstřikování, který se zfiltruje 0,2 mikrometrovým membránovým filtrem a plní se za sterilních podmínek.

D. Tablety

Hmotnostní díly

Účinná látka	200
Stearát hořečnatý	3
Škrob	30
Laktosa	116
Polyvinylpyrrolidon	3

Shora uvedené složky se smíchají a granulují se za použití methanolu jakožto rozpouštědla; prostředek se pak suší a zpracuje se na tablety (obsahující 200 mg účinné látky) za použití vhodného tabletovacího stroje.

Příklad 6

Mimořádná protivirová účinnost sloučeniny vzorce I, připravené způsobem podle vynálezu, se dokládá tímto způsobem:

Virus Herpes simplex 2, kmen G se pro infekci připravuje v HEP-2 buněčných kulturách; virus se adsorbuje po dobu jedné hodiny, čerstvé prostředí se umístí na buňky a pak se inkubuje při teplotě 35 °C tak dlouho, až jsou všechny buňky infikovány. Buněčná suspenze se zmrazí na teplotu -70 °C, nechá se roztát a odstředí se k odstranění zlomků buněk. Kapalina nad buňkami se dělí na alikvotní podíly a uloží se ve zmrazeném stavu -70 °C až do použití. Zředění 10^{6,7} kapaliny nad buňkami vytváří 50% infekční dávku buněčné kultury (CID₅₀) v HEP-2 buňkách a zředění 10^{3,7}, vytváří 50% letální dávku pro myši.

Skupina 20 myších samic Swiss Webster (o hmotnosti 15 až 17 g) se ošetří intraperitoneálně použitím 0,2 ml EMEM obsahujícím 10 LC₅₀/myš viru. Myš ošetřená o 10^{0,5} více nebo méně viry, než je dávka 10 LD₅₀ slouží jako kontrola virulence.

Ošetření zkoušenou sloučeninou začíná 6 hodin po infikování. Myším, rozděleným do skupin po 20 jedincích, se podávají sloučeniny ve fyziologickém roztoku s. c. v dávkách 5 mg/kg, 10 mg/kg a 20 mg/kg. Jedna skupina 20 myší se použije jako skupina kontrolní a podává se jim jen fyziologický roztok s. c. Ošetření se opakuje 24, 48, 72 a 96 hodin po podání.

Zkoušenými sloučeninami jsou sloučeniny podle vynálezu a tři sloučeniny podle amerického patentového spisu číslo 4 199 574, které jsou strukturálně podobné částem sloučeniny vzorce I, připravené způsobem podle vynálezu.

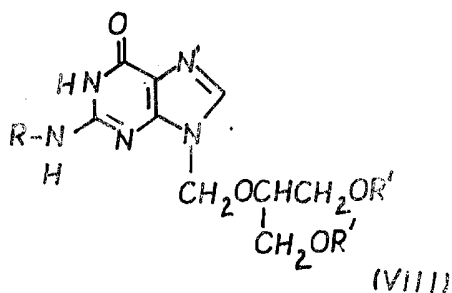
Zkoušená sloučenina	Dávka mg/kg	Přežilé (z 20 myší) dny po podání		
		12	14	21
Neošetřené kontroly		0	0	0
9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)adenin	5	2	2	2
	10	1	0	0
	20	1	1	1
9-(1,3-dibenzoxy-2-propoxymethyl)-6-merkaptopurin	5	2	0	0
	10	0	0	0
	20	1	0	0
9-(1-hydroxy-2-ethoxymethyl)-guanin	5	1	1	1
	10	3	3	3
	20	5	4	4
9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin	5	15	14	14
	10	19	18	18
	20	19	18	15

Shora uvedené výsledky, porovnání počtu přežilých zvířat, kterým byla podána sloučenina vzorce I a počtu přežilých zvířat, kterým byly podány tři účinné látky známé

ze stavu techniky, jasně dokládají výrazně vyšší protivirové působení sloučeniny vzorce I, připravené způsobem podle vynálezu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guaninu a jeho farmaceuticky vhodných solí vyznačený tím, že se odstraňuje chránicí skupina a hydrolyzuje se sloučenina obecného vzorce VIII



kde znamená

R acylovou skupinu obecného vzorce R'CO

kde znamená

R' uhlovodíkovou skupinu s 1 až 10 ato-

my uhlíku s přímým nebo s rozvětveným řetězcem, například skupinu methylovou, ethylovou, isopropylovou, n-propylovou, isobutylovou, n-butylovou, terc.-butylovou, isohexylovou, n-hexylovou, isooktylovou, n-oktylovou, isononylovou, n-nonylovou, isodecyllovou, n-decyllovou,

R' chránicí skupinu, jako je benzylová skupina, případně substituovaná jednou nebo dvěma skupinami alkylovými nebo alkoxy skupinami vždy s 1 až 4 atomy uhlíku, nebo její sůl

a získaný 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin se případně převádí na svoji farmaceuticky vhodnou sůl, nebo se sůl 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guaninu převádí na 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin, nebo se sůl 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guaninu převádí na farmaceuticky vhodnou sůl.