ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

228939
(11) (B2)

(51) Int. Cl.[3]
C 07 D 405/02

(22) Přihlášeno 02 09 82
(21) (PV 6394-82)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 07 09 81
(2571/81) Maďarská lidová republika

(40) Zveřejněno **15 09 83**

(45) Vydáno 15 08 86

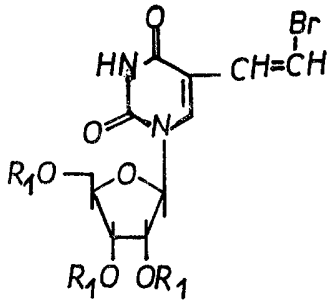
(72)
Autor vynálezu SZABOLCS ANNA dr., ÖTVÖS LÁSZLÓ dr., SÁGI JÁNOS dr., SZEMZÖ ATTILA dr., PEREDY MÁRIA dr., HORVÁTH ISTVÁN dr., KOCZKA ISTVÁN dr., RÉTHÁTI CSILLA, IVÁN PÁL, FRITZSCHE ILDIKÓ, NAGY JÁNOS, BUDAPEŠŤ (MLR)

(73)
Majitel patentu EGYT GYÓGYSZERVEGYÉSZETI GYÁR, BUDAPEŠŤ (MLR)

(54) Způsob přípravy (E)-5-(2-bromvinyl)uridinu a jeho derivátů

1

Vynález se týká způsobu přípravy (E)-5-(2-bromvinyl)uridinu a jeho derivátů obecného vzorce VI



(VI)

kde

R_1 značí atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 8 atomy uhlíku, benzoylovou skupinu nebo benzoylovou skupinu substituovanou v

2

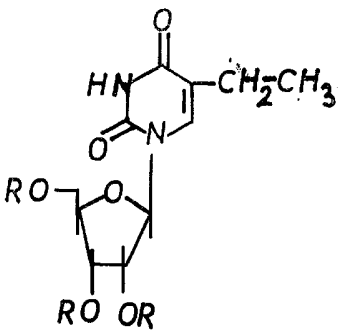
para-poloze buď alkylovou skupinou s 1 až 4 atomy uhlíku, nebo atomem halogenu.

Je známo, že 2'-deoxy-nukleosidy 5-substituované uracilové báze projevují in vitro a in vivo význačnou antivirální účinnost [Meth. a Fing, Exptl. Clin. Pharmacol. **2**, 253 (1980)]. Ze známých nukleosidů (E)-5-(2-bromvinyl)uracil-2'-deoxynukleosid význačnou antiherpesní účinnost (účinnosti proti Herpes simplex virus species) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76** (6) 2946 (1979)].

Je také známo, že ve skupině pyrimidin-nucleosidů substituovaných nízkou alkylovou skupinou v poloze 5 projevují pouze deoxyribonukleosidy antiherpesní účinnost, zatímco příslušné ribonukleosidy zůstávají téměř neúčinné [Chem. Pharm. Bull. **18**, 261 (1970)].

Neočekávaně bylo zjištěno, že ribonukleosid (E)-5-(2-bromvinyl)uracilové báze, připravený místo 2'-deoxyribonukleosidu, má podobnou vysokou antihypersní účinnost a je současně méně toxický.

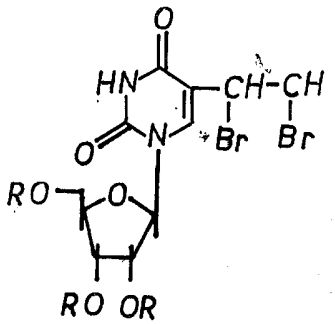
Způsob přípravy (E)-5-(2-bromvinyl)uridinu a jeho derivátů obecného vzorce I se vyznačuje tím, že se bromuje 2',3',5'-tri-O-acyl-5-ethyluridin obecného vzorce IV



(IV)

kde

význam R je identický s významem R_1 s výjimkou atomu vodíku, bromem, výsledná dibromsloučenina obecného vzorce V

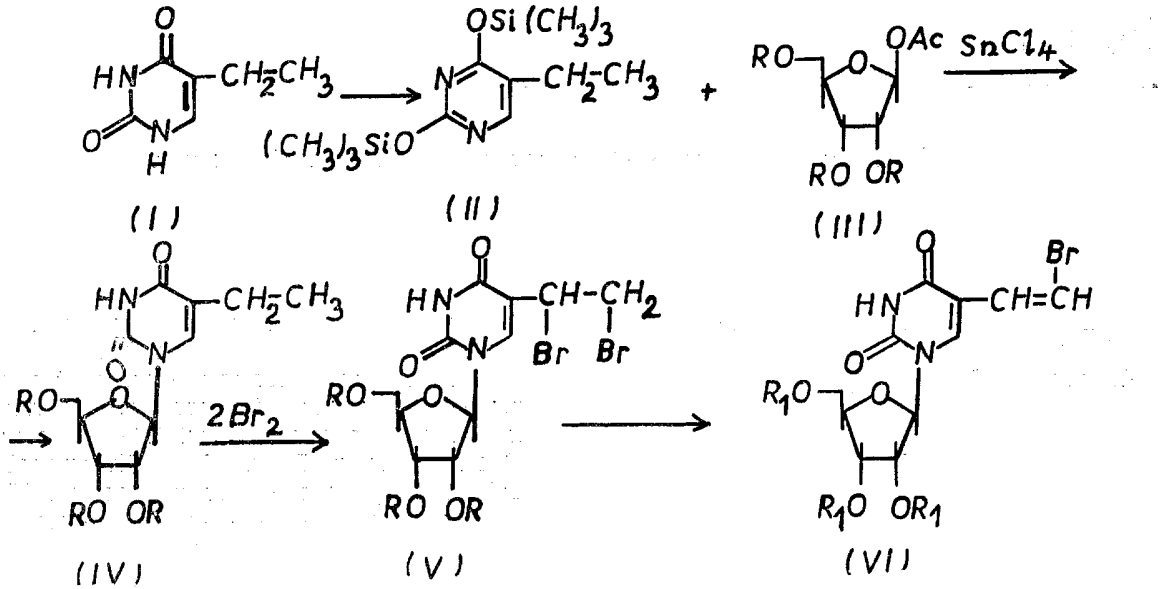


(V)

kde

význam R je identický s významem R_1, s výjimkou vodíku, se dehydrohalogenuje a potom se případně deacyluje.

Uridinové deriváty obecného vzorce IV se mohou výhodně připravit z 5-ethyluracilu vzorce I a použitím následných syntézních stupňů s vysokým výtěžkem, při získání meziproduktů obecného vzorce II a III, podle následujícího reakčního schématu:



Podle výhodného způsobu podle vynálezu se 1,2',3',5'-tri-O-acyl-5-ethyluridin obecného vzorce IV, s výhodou rozpuštěný v halogenovaném rozpouštědle, jako dichlormethanu, nebo chloridu uhličitém, bromuje za přítomnosti ultrafialového světla 2,5 M bromem, výsledný dibromderivát obecného vzorce V se případně oddělí, potom se dehydrohalogenuje za přítomnosti přebytku terciální báze, s výhodou triethylaminu, v halogenovaném rozpouštědle nebo ethylacetátu a konečně se případně deacyluje C_{1-4} alkoholátem alkalického kovu v C_{1-4} alkanolu.

Antivirální účinnost sloučenin obecného vzorce VI podle vynálezu je demonstrován za použití (E)-5-(2-bromvinyl)uridinu jako příkladu.

Zkoušení antivirální účinnosti se provádí podle následujícího způsobu:

Podle literatury se předpokládá, že větší část antivirálních nukleosidních analogů spojuje svou „antivirální účinnost" s činností hostitelské buňky, což vede ke snížení rychlosti množení virů v buňce (je velmi známou skutečností, že množení virů vyžaduje dobrou činnost hostitelské buňky).

Metoda byla vyvinuta pro zkoušení antivirální účinnosti různých léků v roztoku, která je vhodná pro přesnou, citlivou a objektivní zkoušku účinnosti léků in vitro použitelnou na buňkách a tkáních teplokrevních živočichů a lidí [Toxicology **16**, 59 (1980)]. Metoda je také vhodná pro vypočí-

tání nejvyšší koncentrace ze zkušebních údajů zkoušeného léku na tkáňové kultuře, která ještě nepoškozuje tkáň (CTo). Antivirální účinnost léku je považována za virově specifickou, tj. obzvláště vhodnou pro terapeutické účely, jestliže může brzdit množení virů v tkáni při koncentraci CTo nebo nižší než CTo, tudíž se může předpokládat, že má nízkou akutní toxicitu u teplokrevných živočichů a lidí. (Nízká toxicita je zvláště výhodná v případě sloučenin, které se mají použít jako antivirové léky).

Bohužel buď nebyly uveřejněny v literatuře u léků popsaných jako „antivirální" podobné údaje toxicity (CT_0), nebo se zkoušky prováděly při koncentracích vyšších než CT_0 a bylo zjištěno, že tyto roztoky brzdí „antivirální účinnost". Při srovnání antivirální účinnosti (E)-5-(2-bromvinyl)uridinu s účinností známého (E)-5-(2-bromvinyl)-2'-deoxyuridinu [Tetrahedron Letters **45**, 4415 (1979)] bylo zjištěno, že obě sloučeniny ukazují významný antivirální účinek in vitro i při tak nízké koncentaci jako CT_0 bez poškození buněk a tkáně použitých pro kulturu. Neočekávaně však projevil (E)-5-(2-bromvinyl)uridin podstatně nižší toxicitu než deoxy-deriváty. Antivirální účinek sloučenin je potvrzen výsledky zkoušek uvedených v tabulce 1.

Tabulka 1

Účinek nukleosidních analogů na množení virů na tkáňových kulturách při koncentraci CT_0

Sloučenina	Kmeny viru			
	Herpes simpl.[1]	Adeno[2]	Rubeola[3]	Influenza[4]
A	++++	0	0	0
B	++++	0	0	0
C	0	—	—	0
D	0	—	—	0

Zkratky:

A = (E)-5-(2-bromvinyl)uridin
B = (E)-5-(2-bromvinyl)-2'-deoxyuridin
C = 5-jod-2'-deoxyuridin
D = 5-jod-2'-deoxycytidin
++++ = pozoruhodná inhibice množení
0 = neúčinný
— = nezkoušeno
1 = typ 1 na HeLa tkáňové kultuře
2 = typ 5 na Hep-2 tkáňové kultuře
3 = Judith kmen v Rk-13 tkáňové kultuře
4 = AO PR8 kmen v chorioallantois-membránové kultuře

Bylo zjištěno, že (E)-5-(2-bromvinyl)uridin je velmi účinný při inhibici množení virů Herpes simplex typ 1. Na tkáňové kultuře obsahující (E)-5-(2-bromvinyl)uridin v koncentraci CT_0 byl počet virů, měřeno v $TCID_{50}$ (virová koncentrace ničící 50 % buněk tkáňové kultury), značně snížen ve srovnání s podobnými hodnotami získanými v kontrolních zkumavkách bez účinné látky. Rozdíl logaritmu virového titru se může považovat za objektivní indikátor rychlosti inhibice virového množení. Výsledky několika pokusů, obsahujících také srovnávací údaje (E)-5-(2-bromvinyl)uridinu a (E)-5-(2-bromvinyl)-2'-deoxyuridinu, jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Inhibiční účinek nukleosidních analogů na množení viru

Zkoušený virus: typ 1 Herpes symplex
Tkáňová kultura: HeLa (Eaglův roztok* připravený ze standardního Eaglova roztoku obsahujícího 2 % telecího séra)

Výsledky zkoušek několika jednotlivých pokusů:

Kontrola log $TCID_{50}$	Slouč. A log $TCID_{50}$	Δlog $TCID_{50}$	Kontrola log $TCID_{50}$	Slouč. B log $TCID_{50}$	Δlog $TCID_{50}$
6,0	2,77	3,23	5,83	2,5	3,33
5,83	2,5	3,33	5,5	1,66	3,84
5,75	2,5	3,25	6,0	2,22	3,78
6,0	3,0	3,0	5,83	2,66	3,17
5,66	2,5	3,16			
6,0	3,0	3,0			
5,5	3,17	3,17			
Průměr:					
5,82	2,66	3,16	5,79	2,26	3,53

Zkratky:

Slouč. A = (E)-5-(2-bromvinyl)uridin
Slouč. B = (E)-5-(2-bromvinyl)-2'-deoxyuridin
$TCID_{50}$ = Koncentrace viru ničící 50 % tkáňové kultury
*H. Eagle: Metabolismus aminokyselin v tkáňové kultuře savců, Sciene **130**, 432 (1959)

(E)-5-(2-bromvinyl)uridin a (E)-5-(2-bromvinyl)-2'-deoxyuridin projevuje podobný antivirální účinek (úchylka mezi rozdílem log $TCID_{50}$ 3,16 a 3,53 je nepatrná).

Ve srovnání s biologickým účinkem dalších antivirálních sloučenin nukleosidního typu popsaných v literatuře je (E)-5-(2-bromvinyl)uridin méně toxický při pokusech prováděných na tkáňové kultuře, stejně jako u porovnávacích testů s (E)-5-(2-bromvinyl)-2'-deoxyuridinem.

Tabulka 3

Cytotoxicita nukleosidních analogů přikoncentraci CT_0 a CT_{50} v různých tkáňových kulturách při log μg/ml

Sloučenina	Kultury viru							
	HeLa		RK-13		BHK-21		Vero	
	CT_{50}	CT_0	CT_{50}	CT_0	CT_{50}	CT_0	CT_{50}	CT_0
A	2,6	2,0	2,7	1,6	2,7	2,1	2,6	2,0
B	2,4	1,6	2,9	1,3	2,9	2,5	2,5	1,6
C	1,3	—1,4	1,9	0,7	0,8	—1,0	1,6	—1,5
D	0,9	—2,0						

Zkratky:

A = (E)-5-(2-bromvinyl)uridin
B = (E)-5-(2-bromvinyl)-2'-deoxyuridin
C = 5-jod-2'-deoxyuridin
D = 5-jod-2'-deoxycitidin

Při testech prováděných v HeLa tkáňových kulturách projevuje (E)-5-(2-bromvinyl)uridin terapeutický index $10^{1,8}=63$ oproti viru Herpes simplex typ 1 ve srovnání s kontrolním stanovením projevujícím 50% inhibici.

Příznivá tkáňová toxicita (E)-5-(2-bromvinyl)uridinu byla také potvrzena v průběhu jednoduché zkoušky toxicity u myší (LD_{50}).

Tabulka 4

Akutní toxicita (E)-5-(2-bromvinyl)uridinu u myší
Rozpouštědlo: 20% vodný roztok dimethylsulfoxidu

Aplikace	Akutní toxicita po jednotlivé dávce (měřeno po 24 hodinách)		
	Dávka mg/kg	Počet mrtvých / léčených zvířat A	B
i. v.	300*	0,5	1,5
i. p.	1000**	4/5	5/5
	750	0/5	2/5
	500	0/5	0/5
per os	1000**	0/5	0/5
	1500**	0/5	0/5

Zkratky:

A = (E)-5-(2-bromvinyl)uridin
B = (E)-5-(2-bromvinyl)-2'-deoxyuridin (srovnávací látka)
* i. v. zkouška byla omezena následkem špatné rozpustnosti sloučeniny ve vodě
** vodná suspense sloučeniny byla použita při aplikaci polyoxy-ethylensorbitmonooleátu (Tween 80) a karboxymethylcelulózy

Na základě předběžných zkoušek jsou injekce, masti a tablety obsahující (E)-5-(2-bromvinyl)uridin jako účinnou složku a připravené známými metodami vhodné pro specifické lokální a také pro systemické léčení infekcí vyvolaných virem Herpes simplex typ 1 u lidí.

Vynález bude objasněn v následujících příkladech:

Příklad 1

2',3',5'-Tri-O-bezoyl-(E)-5-(2--bromvinyl)uridin
(VI, R_1 = benzoyl)

56,0 g (0,095 M) 2',3',5'-tri-O-benzoyl-5--ethyluridinu se rozpustí při mírném zahřívání ve 400 ml bezvodého dichlormethanu. Zahřívání se přeruší a během 20 až 25 minut pod proudem dusíku při ozařování ultrafialovým zářením se přidá 34,15 g (11 ml) bromu. Po přidání bromu se ozařování ultrafialovým zářením zastaví a reakční směs se zahřívá 30 až 40 minut pod zpětným chladičem v silném proudu dusíku. Potom se odstraní za sníženého tlaku rozpouštědlo a vytvořený bromovodík. Zbylý světle žlutý sirup se vloží do 20 ml bezvodého dichlormethanu a opět se odpařuje. Zbytek se rozpustí ve 200 ml bezvodého ethylacetátu, po kapkách při stálém míchání se přidá 15 ml triethylaminu, vytvořený triethylaminhydrobromid se filtruje, potom se promyje 2× 20 ml ethylacetátu. Spojené ethylacetátové promývací tekutiny se odpaří za sníženého tlaku. Zbytek je 63,0 g pevné pěny, výtěžek 100 %. Tento produkt se může případně přímo deacylovat. Pěna se může převést na bílé krystaly, t. t. 160 až 170 °C, roztíráním v ethanolu.

2',3',5'-tri-O-benzoyl-5-ethyluridin, použitý jako výchozí látka, se může připravit podle následujícího reakčního postupu.

a. 2,4-Bis-(O-trimethylsilyl)-5-ethyluracil (II)

40 g (0,285 mM) ethyluracilu (I), sušeného před reakcí ve vakuu při 150 °C, se míchá s 80 ml (0,50 M) 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilasanu, a zahřívá se 24 hodiny pod zpětným chladičem za bezvodých podmínek. Vytvořený čirý roztok se odpaří za atmosférického tlaku. Zbytek je lepkavý sirup, který se destiluje za sníženého tlaku. T. v. 134 °C (1733 Pa). Výtěžek 78,95 g (97 %).

b. 1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-D-ribosa (III)

60 g (0,4 M) D-ribosy se rozpustí v 1280 mililitrech bezvodého methanolu, a přidá se 34 ml methanolu nasyceného plynným bezvodým chlorovodíkem (11,2 %). Reakční směs se nechá 20 hodin při teplotě místnosti za bezvodých podmínek, potom se neutralizuje 120 ml pyridinu, a odpaří se za sníženého tlaku při 30 až 40 °C. Znovu se odpaří a potom se přidá dalších 120 ml pyridinu. Výsledný viskózní, světležlutý sirup se rozpustí ve směsi 304 ml pyridinu a 320 mililitrů chloroformu, za chlazení ledem se přidá 233,8 ml čerstvě destilovaného benzoylchloridu a nechá se stát přes noc v ledničce. Další den se zruší přebytek benzoylchloridu nalitím reakční směsi na led a vodná vrstva organického rozpouštědla se oddělí. Vodná fáze se extrahuje 2krát 160 mililitry chloroformu, spojené chloroformové extrakty se promyjí 200 ml vody, suší se bezvodým síranem sodným a odpaří se ve vakuu při 30 až 40 °C.

Znovu se odpařuje a přidá se 100 ml toluenu. Zbylý červený olej, získaný následujícím odstraněním posledních stop organického rozpouštědla, se rozpustí ve směsi 96 ml ledové kyseliny octové a 224 ml acetanhydridu, potom se přidá k roztoku během dvou až tří hodin za chlazení ledem a intenzívního míchání 32 ml 95 až 97% kyseliny sírové a směs se nechá přes noc v ledničce. Následující den se nalije roztok na led, a z vytvořených olejovitých krystalů se odstraní voda. Krystaly se rozmíchají s 500 ml vody, voda se opět dekantuje, krystaly se rozmíchají s 200 ml 50 až 80% vodného methanolu a filtruje se. Surový produkt se překrystaluje z 2,5 l methanolu. Výtěžek: 128,5 g (60,0 %) 1-O-acetyl-2,3,5-tri--O-benzoyl-D-ribosy, t. t. 131 °C.

c. 2',3',5'-tri-O-benzoyl-5-ethyluridin (IV)

48,1 g (0,095 M) 1-O-acetyl-2,3,5-tri-O--benzoyl-D-ribosy (III) se rozpustí v 1690 ml dichlormethanu a za stálého míchání se přidá směs 33,7 g (0,118 M) 2,4-bis(O-trimethylsilyl)-5-ethyluracilu (II) a 14 ml chloridu cíničitého ve 110 ml dichlormethanu. Dále se míchá 2 až 3 hodiny, reakční směs se nechá stát 24 hodiny při teplotě místnosti, potom se extrahuje 2300 ml nasyceného, vodného roztoku hydrogenuhličitanu draselného, organická vrstva se oddělí a odpaří se za sníženého tlaku. Zbytek, bílá krystalická látka, se překrystaluje z 250 ml ethanolu.

Výtěžek: 53,5 g (95 %) 2',3',5'-tri-O-benzoyl-5-ethyluridinu (IV), t. t. 155 až 156 °C.

Za použití postupu popsaného v příkladu 1 se připraví následující sloučeniny obecného vzorce VI.

Příklad číslo	Produkt	T. t. °C
2	2',3',5'-tri-O-acetyl-(E)-5-(2-bromvinyl)uridin	145,5
3	2',3',5'-tri-O-(p-chlorbenzoyl)-(E)-5-(2-bromvinyl)-uridin	187 — 188
4	2',3',5'-tri-O-oktanoyl-(E)-5-(2-bromvinyl)uridin	t. v.: 98 — 105/133,3 Pa
5	2',3',5'-tri-O-(p-methylbenzoyl)-(E)-5-(2-bromvinyl)uridin	209

Výchozí látky použité v příkladech 2, 3, 4, 5 se připraví stejně jako 2',3',5'-tri-O-benzoyl-5-ethyluridin (viz příklad 1).

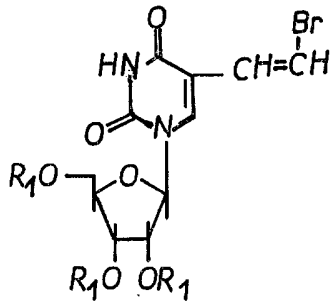
Příklad 6

(E) -5-(2-bromvinyl)-uridin (VI, R_1 =H)

65,5 g (0,11 M) 2',3',5'-tri-O-benzoyl-(E)-5-(2-bromvinyl)uridinu (surový produkt příkladu 1) se deacyluje směsí 250 ml 0,5 N methylátu sodného a 250 ml bezvodého methanolu, reakční směs se míchá 3 hodiny při teplotě místnosti. Případně vytvořená sraženina se odstraní filtrací. pH čirého roztoku se upraví ionexovou pryskyřicí (Dowex 50 H^+) na 5 až 6, pryskyřice se odfiltruje a promyje se 2× 100 ml methanolu. Spojené methanolové roztoky se odpaří za sníženého tlaku. Zbytek se rozpustí v ethanolu a benzenu a znovu se odpaří. Zpracováním zbytku s etherem se získá 33 g surového produktu, který se překrystaluje nejprve z vody, potom z ethanolu. Výtěžek: 28 gramů (71,7 %) (E)-5-(2-bromvinyl)uridinu (VI, R_1 = H), t. t. 165 až 167 °C.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy (E)-5-(2-bromvinyl)-uridin a jeho derivátů obecného vzorce VI

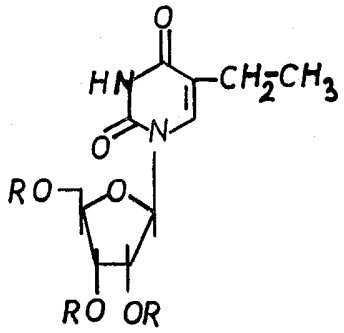


(VI)

kde

R_1 značí atom vodíku, alkanoylovou skupinu s 1 až 8 atomy uhlíku, bezoylovou skupinu nebo benzoylovou skupinu substituovanou v para-poloze buď alkylovou skupinou s 1 až 4 atomy uhlíku, nebo atomem halogenu,

vyznačený tím, že se bromuje 2',3',5'-tri-O-acyl-5-ethyluridin obecného vzorce VI

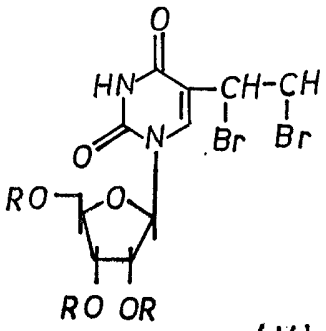


(IV)

kde

význam R je identický s významem R_1 s výjimkou atomu vodíku, bromem, výsledná dibromsloučenina obecného vzorce V

kde



(V)

význam R je identický s významem R_1 s výjimkou atom vodíku, se dehydrohalogenuje a potom se případně deacyluje.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se bromace provádí v halogenovaném rozpouštědle, jako dichlormethanu, dichlorethanu nebo chloridu uhličitém za přítomnosti ultrafialového záření.

3. Způsob podle bodů 1 nebo 2, vyznačený tím, že se dehydrohalogenace dibromderivátů obecného vzorce V provádí terciární bází, s výhodou triethylaminem.

4. Způsob podle bodu 3, vyznačený tím, že se dehydrohalogenace provádí v ethylacetátu nebo chlorovaném rozpouštědle, účelně dichlormethanu.

5. Způsob podle bodů 1 až 4, vyznačený tím, že se případná deacylace konečného produktu provádí C_{1-4} alkoholátem alkalického kovu v C_{1-4} alkanolu.