



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

258109
(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴
C 07 H 19/16

- (22) Přihlášeno 16 09 81
(21) (PV 6832-81)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 16 09 80
(187631) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 13 08 87
(45) Vydáno 15 12 88

(72)
Autor vynálezu OGILVIE KELVIN K., CANDIAC (Kanada)

(73)
Majitel patentu SYNTEX (U.S.A.) INC., PALO ALTO, CALIFORNIA (Sp. st. a.)

(54) Způsob výroby purinových a pyrimidinových sloučenin

1

Vynález se týká způsobu výroby nukleosidových analogů s otevřeným kruhem, zvláště nových sloučenin tohoto typu, které mají biologickou řídící účinnost, například protivirovou účinnost.

Nukleosidy obsahují D-ribózovou nebo 2-desoxy-D-ribózovou cukernou jednotku, která je chemicky vázána na purinovou nebo pyrimidinovou bázi, a to adenin, cytosin, guanin, thymin nebo uracil přes dusíkový atom kruhu. Protože jde o jednotky, které jsou stavebními kameny nukleových kyselin a vyskytují se v přírodě v živých buňkách, předpokládalo se, že nukleosidy a nukleotidy a jejich analogy by mohly mít chemoterapeutickou účinnost.

Jakýkoli praktický význam, který by v tomto směru mohly mít je však velmi snižován tím, že in vivo rychle podléhají deaminaci působením deamináz.

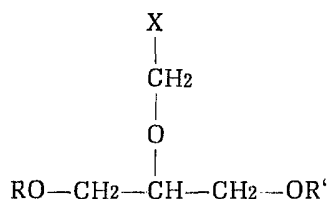
Byla provedena řada pokusů ke stanovení vztahu mezi strukturou a účinností, některé z těchto pokusů byly prováděny s analogy nukleosidů s otevřeným kruhem. Přes některé slibné výsledky a některé nové sloučeniny, které byly tímto způsobem popsány nebyly zatím nalezeny žádné nové látky, vhodné pro chemoterapeutické použití, jedinou takovou látkou by snad mohl být a-cykloguanosin, který byl popsán

2

Schaefferem v US patentu č. 4 146 715.

Vynález se týká způsobu výroby nukleosidových analogů s protivirovou účinností, tyto látky je možno zpracovávat na farmaceutické přípravky, jimiž je možno léčit virové infekce u savců.

Předmětem vynálezu je způsob výroby purinových a pyrimidinových sloučenin obecného vzorce



(I')

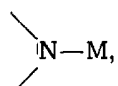
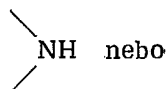
kde

X znamená:

5-fluoruracilovou skupinu,
cytosinovou skupinu,
5-azacytosinovou skupinu,
adeninovou skupinu,
guaninovou skupinu nebo
2-N-acetylguaninivou skupinu a

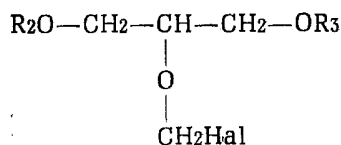
R a R' znamenají nezávisle na sobě atom

vodíku, benzyl nebo terc.butyldimethylsilyl, za předpokladu, že v případě, že X znamená adeninovou skupinu, má alespoň jeden ze substituentů R a R' odlišný význam od atomu vodíku, jakož i z farmaceutického hlediska přijatelné soli těchto sloučenin, vyznačující se tím, že se uvede v reakci příslušná purinová nebo pyrimidinová báze, popřípadě chemicky chráněná na svých dalších reaktivních místech, avšak obsahující volnou skupinu



kde

M znamená atom chloru, atom, bromu, atom jodu, nižší trimethylsilyl nebo sůl rtuti, stříbra nebo cínu v místě reakce, kterým je atom dusíku v poloze 9 v případě, že X znamená adeninovou, guaninovou nebo 2-N-acetylfuaninovou skupinu a atom dusíku v poloze 1 v případě, že X znamená 5-fluoruracilovou, 5-azacytosinovou nebo cytosinovou skupinu, se sloučeninou obecného vzorce



kde

R₂ a R₃ mají stejný význam jako substituenty R a R',

Hal znamená atom halogenu, načež se v případě, že jeden nebo oba symboly R₂ a R₃ znamenají benzyl, debenzyluje výsledný produkt na sloučeninu, v níž R a R' znamenají atom vodíku nebo se v případě, že jeden nebo oba symboly R₂ a R₃ znamenají atomy vodíku, provádí silylace za vzniku sloučeniny, v níž jeden nebo oba symboly R a R' znamenají terc.butyldimethylsilyl a popřípadě se takto získaná volná látka převede na sůl, přijatelnou z farmaceutického hlediska.

Je zřejmé, že sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu jsou blíže příbuzné pokud jde o strukturu i substituenty přírodně se vyskytujícím nukleosidům a nukleotidům. Základní uspořádání řetězce a jeho délka zůstávají zachovány. Příslušné funkční skupiny O a OH, které se v biolo-

gickém prostředí aktivně váží na biologická centra, zůstávají zachovány ve svém přírodním sledu vzhledem k bázi, avšak mohou být modifikovány ochrannými skupinami.

Tyto skupiny jsou tak podobné desoxyribózovým sloučeninám co do chemické skladby, že je nutno předpokládat tvorbu desoxyribózového kruhu za vhodných podmínek. Základní rozdíl spočívá v tom, že sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu nemají strukturální pevnost uhlíkového kruhu, takže dochází ke změnám ve vlastnostech a chování těchto sloučenin. Mimoto také atom uhlíku v poloze 4' není ve sloučeninách obecného vzorce I chirální, takže nedochází ke vzniku stereoisomerů. Každá hydroxylová skupina je primární, nedochází k isomerii syn a anti na glykosidové vazbě.

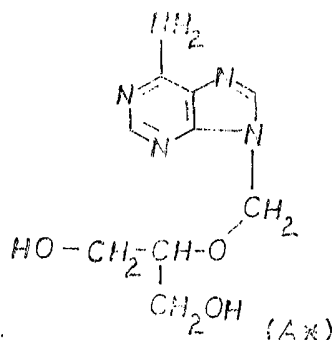
Výhodnou skupinou ve svrchu uvedených sloučeninách jsou purinové báze adenin a guanin. Sloučeniny s obsahem adeninu mají široké spektrum biologické účinnosti. Sloučeniny adeninu a guaninu jsou také biologicky nejúčinnější. Pokud jde o sloučeniny adeninu, je propracováno vyhodnocení jejich vlastností, například při použití specifických enzymů.

Na rozdíl od přírodně se vyskytujících adenosinových sloučenin a většiny dříve známých syntetických analogů jsou adeninové sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu odolné proti deaminázám, které se nacházejí ve většině tkání savců a jsou schopny deaktivovat většinu přírodně se vyskytujících látek uvedeného typu.

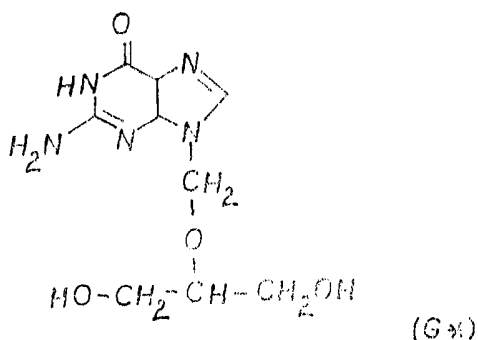
Přírodní a dříve známé syntetické analogy adenosinových sloučenin jsou uvedeným enzymem in vivo rozkládány s tím výsledkem, že aminoskupina na uhlíkovém atomu v poloze 6 primárního kruhu je hydrolyzována na hydroxylovou skupinu, takže vzniká odpovídající inoxinová sloučenina, většina těchto látek je pak biologicky zcela neúčinná. Pokud jde o pokusy in vitro, které byly prováděny na biologickou účinnost se známými látkami, není možno na podkladě těchto pokusů soudit na účinnost in vivo.

Sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu však nejsou dobrým substrátem pro působení adenosindeaminázy a z tohoto důvodu nedochází in vivo k hydrolýze jejich aminoskupiny, alespoň ne ve větším stupni. Z tohoto důvodu jsou pokusy, prováděné in vitro v souladu s pokusy in vivo.

Nejvýhodnějšími sloučeninami obecného vzorce I jsou ty látky, v nichž R a R' znamenají atomy vodíku a X znamená adenin nebo guanin, a to zejména sloučeniny obecného vzorce A*



to jest 9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl] a odpovídající sloučeniny, v nichž jeden nebo oba substituenty R a R' znamenají dimethyl-terc.butylsilyl nebo sloučenina vzorce



Sloučeniny obecného vzorce I je možno získat tak, že se uvede v reakci příslušně halogenovaná báze s příslušným alkylovým zbytkem. Syntézu je možno započít tak, že se působí na 1,3-dichlor-2-propanol, benzylátém sodným v dusíkové atmosféře v přítomnosti 1,2-dichlorethanu za vzniku chlor-methoxyderivátu 1,3-dibenzyl-oxy-2-propanolu za neustálého odstraňování přebytku vody. Tento derivát se pak váže na příslušně halogenovanou bázi, například 6-chlorpurin v dimethylformamidu při použití triethylaminu jako látky, která váže kyselinu.

Na takto získanou chlorovanou sloučeninu se pak působí methanolovým roztokem amoniaku v ocelové reakční tlakové nádobě, čímž se získá 6-aminoderivát. Výsledný produkt je pak možno podrobit debenzylaci za vzniku sloučeniny obecného vzorce I, například vodíkem při použití kysličníku paládia v methanolu. Ochrané skupiny je možno užít běžným způsobem.

Některé sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu mají protivirovou účinnost a současně nízkou toxicitu pro buňky, takže je možno je užít k léčbě virových infekcí v živých buňkách savců. Například 9-[(2-

-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]-adenin je účinný proti viru oparu, viru chřipky a viru vesikulární stomatitidy.

Sloučenina vzorce G*, to jest 9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]guanin je vysoce účinný proti viru oparu, a to daleko více, než acykloguanosin a mimoto je ještě účinný proti širšímu spektru virů než acykloguanosin. Rovněž mono-O-terc.-butyldimethylsilyl-9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]adenin je účinný proti viru chřipky.

V obou případech tyto látky virus hubí a současně inhibují jeho rozmnožování v dávce, která ještě není toxická pro buňky savců.

Další sloučeniny, které je možno získat způsobem podle vynálezu mají také toxicitu pro buňky savců i v nízkých dávkách, takže je možno je užít jako jedy například proti hlodavcům. Příkladem takové toxické látky může být například bis-O-terc.-butyldimethylsilyl-9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]adenin. Sloučeniny tohoto typu je možno užít také jako insekticidy.

Obecně je možno uzavřít, že sloučeniny obecného vzorce I, v nichž R a/nebo R' znamenají atom vodíku a X znamená purinovou bázi, zejména adenin a guanin, budou mít protivirovou účinnost ve vhodné dávce bez nežádoucí toxicity.

Sloučeniny obecného vzorce I, v nichž R i R' mají odlišný význam od atomu vodíku a v nichž X znamená adenin nebo guanin budou toxické a budou mít potenciální použití jako jedy.

Některé sloučeniny svrchu uvedeného vzorce I, v nichž purinová nebo pyrimidinová báze X je substituována na jádře, jsou rovněž zajímavé jako protivirové látky. Specifickými sloučeninami tohoto typu jsou ty látky, v nichž X znamená uracil, substituovaný v poloze 5 atomem fluoru nebo hydroxymethylovou skupinou, guanin nebo adenin, substituovaný v poloze 8 atomem halogenu, s výhodou bromu, thioskupinou nebo aminoskupinou, 5-fluoruracil, 5-azacytosin, 2-N-acetylguanin a podobně.

Je samozřejmé, že způsob podle vynálezu zahrnuje i tvorbu solí těchto sloučenin, přijatelných z farmaceutického hlediska.

Sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu je možno nemocným podávat parenterálně, místně ve formě mazání, krémů, aerosolů nebo prášků nebo jako oční nebo nosní kapky nebo perorálně. Obvykle se sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu podávají běžným způsobem a běžným způsobem se také vyrábějí farmaceutické přípravky, které tyto látky obsahují. Postupuje se stejně jako v případě jiných protivirových látek, jako jsou acykloguanosin, Ara-A a Ivdr. Účinná dávka pro podání interthekálně nebo parenterálně, vztaženo na volnou látku je v rozmezí 0,1 až 100 mg na kilogram, s výhodou 0,5 až 20 mg/kg a

zvláště přibližně 5 mg/kg, přičemž zvolená léková forma se podává 2- až 4X denně.

Perorálně podávané přípravky mají s výhodou formu prášku nebo granul a obsahují obvykle také nosič a/nebo dispergační činidlo a/nebo smáčedlo a vodu nebo sirup, může také jít o tablety nebo kapsle. Je rovněž možno užít roztoků těchto látek v destilované vodě nebo fyziologickém roztoku a jiných isotonických roztocích za případného použití pufru, například fosfátu, koncentrace roztoků se pohybuje v rozmezí 1 až 20 %, s výhodou 2 až 15 % a zvláště přibližně 10 % pro parenterální nebo interthekální podání.

Pokud jde o mazání, které se používá místně proti zevním infekcím, může jít o emulzi typu olej ve vodě v koncentraci 0,1 až 10 %, s výhodou až 3 %, zvláště 1 % (hmotnostní/objemová %). Tyto prostředky mohou obsahovat také parafinový olej a popřípadě smáčedlo ke stabilizačním účelům nebo dimethylsulfoxid.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

Příklad 1

Způsob výroby 9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]adeninu (III)

6,5 mmolů 6-chlorpurinu se kondenzuje s 1,3-dibenzyloxy-2-chlormethoxypropanem ve 4 ml dimethylformamidu s obsahem 6,5 mmolů triethylaminu při teplotě 25 °C po dobu 16 hodin. Takto vzniklý produkt, 1,3-dibenzyloxy-2-(6-chlorpurin)methoxypropan se izoluje chromatografií na tenké vrstvě jako olejovitá kapalina a pak se zahřívá v ocelové tlakové láhvi při teplotě 90 °C po dobu 20 hodin se 60 ml nasyceného methanolu (methanol se sytí amoniakem při teplotě 0 °C). Rozpouštědlo se odpaří a vzniklý 1,3-dibenzyloxy-2-adeninmethoxypropan se vysráží z ethanolu etherem.

Sloučenina se debenzyluje při použití kysličníku paládía v methanolu po dobu 20 hodin při tlaku vodíku 3,5 MPa. Katalyzátor se odstraní filtrací a po zahuštění a zchlazení methanolového roztoku dochází ke krystalizaci 9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]adeninu (III) ve formě bílé pevné látky. Celkový výtěžek je 27 %, vztaheno na 6-chlorpurin, teplota tání je 184 až 186 °C.

m/e (molekulová hmotnost) 239,

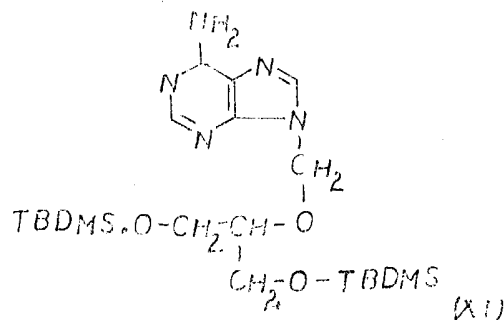
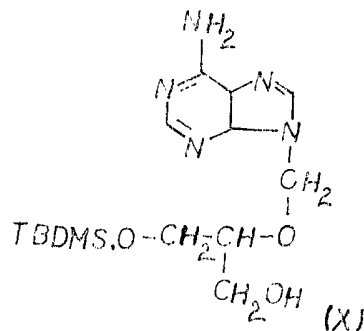
$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} = 259 \text{ nm}$

Rf 0,12 (CHCl₃ — Et OH, 4 : 1).

Příklad 2

Ze sloučeniny III, připravené způsobem podle příkladu 1 se získá mono-O-terc.butylidimethylsilyl-9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]adenin (sloučenina

X) a bis-O-terc.butylidimethylsilyl-9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]adenin (sloučenina XI) reakcí s příslušným množstvím terc.butylsilyldimethylchloridu za standardních podmínek pro ochranu hydroxylové skupiny způsobem, známým v syntéze nukleosidů s následnými standardními postupy pro izolaci obou výsledných produktů.



Příklad 3

Sloučenina III, připravená způsobem podle příkladu 1 byla podrobena zkouškám na protivirovou účinnost. Testy byly prováděny běžným způsobem pěstováním buněk savců ve vhodném živném prostředí na tkáňové kultuře. Při provádění kontrolních pokusů se suspenze virů známého typu a známé koncentrace nanasla na rostoucí tkáňovou kulturu a pak byl pozorován růst. Při pokusech s účinnou látkou byl nanesen na rostoucí tkáňovou kulturu virus i účinná látka, vyrobená způsobem podle vynálezu. Na tkáňových kulturách byl pozorován růst plaků. Snížení počtu plaků a jejich rozměru na tkáňové kultuře znamená, že použitá sloučenina brání rozmnožování virů.

Sloučenina III je schopna účinně zbrzdit rozmnožování viru oparu. V dávce 300 µg této látky v 1 ml živného prostředí bylo možno snížit plochu plaků o 70 % bez známek toxicity vzhledem k buňkám savců, rostoucím ve tkáňové kultuře.

Sloučenina III je rovněž účinná pokud jde

o brzdění viru vesikulární stomatitidy, kde snižuje počet plaků o 70 % v dávce 1 mg/ml živného prostředí. Ani v tomto případě nebylo možno pozorovat v uvedených dávkách žádnou toxicitu vzhledem k buňkám savců.

Příklad 4

Sloučenina X, připravená způsobem podle příkladu 2 byla podrobena zkouškám podle příkladu 3 na účinnost proti viru chřipky A. Účinná látka byla přidávána v dávkách 0,1, 1,1 a 11 $\mu\text{g/ml}$ a v každé z těchto dávek byla účinná pokud jde o zbrzdění rozmnožování virových buněk beze známek toxicity proti buňkám savců. Při vyšších dávkách, například 110 $\mu\text{g/ml}$ byla tato sloučenina pro buňky savců toxická.

V případě, že sloučenina X byla podrobena podobným zkouškám při použití viru oparu, byla toxická pro buňky savců v dávce 300 $\mu\text{g/ml}$, aniž by bylo dosaženo selektivní účinnosti proti viru.

Sloučenina XI byla při provádění podobných testů velmi toxická pro buňky savců, a to již v dávce 30 $\mu\text{g/ml}$.

Příklad 5

Testy a vyhodnocení účinných látek proti viru oparu

Kmeny viru oparu (HSV) byly pěstovány a titrovány při teplotě 36 °C na lidských fetální fibroblastech, odvozených od fetálního tkání a byly použity pro práci s virem před desátým pasážováním. Buňky byly pěstovány a udržovány na bazálním Eaglově prostředí (BME, Auto-Pow, Flow Laboratories) s přidáním 0,112 % hydrogenuhličitanu sodného, 2 mmolů l-glutaminu, 2 mg neomycinu na 100 ml a 5 až 20 % telecího séra. 5 % BME znamená v dalším popisu prostředí, které obsahuje 5 ml telecího séra v celkovém objemu 100 ml.

Titr kmenů HSV se stanoví titrací plaků způsobem podle publikace Roizman a Roane, „Virology“, 15, 75 až 79 (1961). Tkáňové kultury se naočkují buňkami a užijí se k pokusům po dosažení přibližně 25 % monovrstvy. Na každou z dvojice tkáňových kultur se očkuje virus v logaritmickém řadě a nechá se absorbovat 1 hodinu za občasného protřepání, pak se virus odstraní a přidají se 2 ml 5% BME s obsahem 0,5 % lidského imunního sérového globulinu. Po 48 hodinách inkubace při teplotě 36 °C v atmosféře s 5% kyslíčnicku uhličitého se prostředí odstraní a vrstvy buněk se barví 0,05% vodným roztokem krystalové violeti. Počítá se počet plaků v případě dvojího provedení se vypočítá průměr a počet jednotek, tvořících plaky.

Sloučenina se podrobí testům na účinnost proti viru oparu při použití zásobního roztoku každá ze sloučenin čerstvě připraveného rozpuštěním 1,2 mg v BME. Příslušné

zředění každé ze sloučenin se provede v 5% BME s obsahem 0,5 % lidského imunního sérového globulinu těsně před použitím.

Plotny s tkáňovými kulturami o velikosti 35 × 10 mm a přibližně 75% monovrstvou se očkují přibližně 50 jednotkami pro tvorbu plaků HSV v 0,2 ml a virus se nechá adsorbovat 1 hodinu za občasného protřepání. Po odstranění viru se přidají 2 ml 5% BME a 0,5 % imunního globulinu a trojnásobné ředění příslušné sloučeniny. Jedna skupina ploten se ponechá bez účinné látky a je kontrolní. Po inkubaci 48 hodin při teplotě 30 °C v atmosféře s 5 % kyslíčnicku uhličitého se prostředí odstraní, buňky se obarví svrchu uvedeným způsobem a počítají se plaky.

V případě většího počtu ploten pro jednu koncentraci se vypočítá průměr a tím se vypočítá i počet plaků, vznikajících za přítomnosti každého ředění jednotlivé účinné látky. Snížení rozměru plaků ve srovnání s kontrolou se rovněž vypočítává. Další hodnotou, která se vypočítává je snížení počtu plaků ve srovnání s kontrolou. Tato hodnota znamená, že přidaná látka je schopna bránit rozmnožování viru. Snížení rozměru rostoucího plaku rovněž znamená inhibici rozmnožování viru, které je způsobeno účinnou látkou.

Výsledky ukazují, že sloučenina G*, získána podle příkladů 11, 12, 13 a 14 je velmi účinná proti viru oparu. Snižovala rozměr plaků o 25 % již v koncentraci 0,02 $\mu\text{g/ml}$, o 50 % při koncentraci 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a o 75 % při koncentraci 0,8 $\mu\text{g/ml}$. V nejvyšší koncentraci, která byla použita, to jest při koncentraci 250 $\mu\text{g/ml}$ nebylo možno pozorovat žádné známky toxicity vzhledem k buňkám.

V případě, že tato sloučenina byla užita v koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ a vyšší, nedošlo vůbec ke tvorbě plaků ani k růstu viru. Dobrá účinnost byla prokázána již v koncentraci 0,007 $\mu\text{g/ml}$.

Sloučenina, získána způsobem podle příkladu 8, 5-aza-C* je rovněž účinná proti viru oparu. Snižuje rozměr plaků o 25 % v koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$, o 50 % při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ a 75 % v koncentraci 110 $\mu\text{g/ml}$. Tato látka snižuje počet plaků o 25 % v koncentraci 8 $\mu\text{g/ml}$ o 50 % v koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$ a o 75 % v koncentraci 140 $\mu\text{g/ml}$. Žádná známka toxicity nebyla pozorována až do koncentrace 304 $\mu\text{g/ml}$.

Sloučenina z příkladu 9, dibenzyl-C* je rovněž účinná proti viru oparu, avšak v menším měřítku, ke snížení rozměru plaků o 25 % je zapotřebí koncentrace 20 $\mu\text{g/ml}$, o 50 % koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$, ke snížení počtu plaků o 25 % je zapotřebí koncentrace 20 $\mu\text{g/ml}$ a o 50 % koncentrace 70 $\mu\text{g/ml}$. Až do koncentrace 305 $\mu\text{g/ml}$ nebylo možno pozorovat žádné známky toxicity.

Sloučenina z příkladu 6, 5P-benzyl-U* je rovněž účinná proti viru oparu a snižuje

rozměr plaků o 25 % v koncentraci 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, o 50 % v koncentraci 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a snižuje počet plaků o 25 % v koncentraci 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a o 50 % v koncentraci 110 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Až do této koncentrace nebylo také možno pozorovat žádné známky toxicity.

Sloučenina z příkladu 10, N-acetylbenzyl C* je částečně účinná proti viru oparu a snižuje rozměr plaků o 25 % v koncentraci 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a o 50 % v koncentraci 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ke snížení počtu plaků o 25 % je zapotřebí koncentrace 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, o 50 % koncentrace 130 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a o 75 % koncentrace 310 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

V podstatě podobné výsledky je možno získat v případě, že byla sloučenina C* podrobena zkouškám proti osmi různým kmenům viru oparu typ I a proti šesti různým kmenům viru oparu typ II.

Sloučenina C* z příkladu 15 byla účinná proti VSV typ 1 v nízkých koncentracích.

Příklad 6

Způsob výroby 1-[(2-benzoyloxy-1-benzyl-oxy)methyl/ethoxy)methyl]-5-fluoruracilu

1,0 g, 0,0077 molu 5-fluoruracilu a několik krystalů síranu amonného se uvede v suspenzi v 15 g 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazanu (DMDS) a směs se zahřeje na teplotu varu pod zpětným chladičem za stálého míchání. Po 50 minutách se volná látka rozpustí a přebytek HMDS se odpaří za sníženého tlaku, čímž se získá 15 sirup s obsahem volné látky, chráněné silylovými skupinami, jejíž struktura nebyla stanovena. Tento sirup se rozpustí v 80 ml 1,2-dichloroethanu a přidá se 0,4 ml bezvodého chloridu cínatého. Pak se přidá 0,007 mmolu 1,3-dibenzoyloxy-2-chlormethoxypropanu ze zásobního roztoku a výsledný roztok se zazátkuje a nechá se stát přes noc při teplotě místnosti.

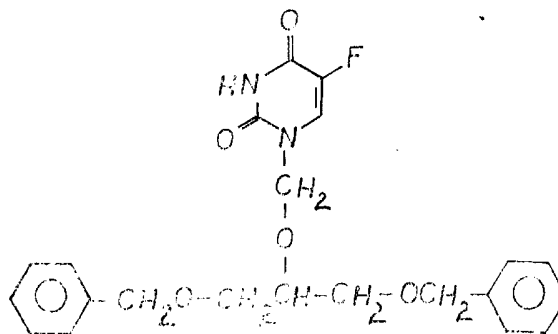
Reakční směs se pak protřepe s vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a obě fáze se oddělí. Vodná fáze se extrahuje chloroformem. Organické fáze se slíjí, promyjí se vodou, vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří dosucha za sníženého tlaku, čímž se získá 4,57 g materiálu. Podle NMR-spektra surového materiálu je možno usoudit, že obsah požadované látky ve směsi je 88 %. Materiál se smísí s 15 g kysličníku křemičitého (Fisher-S-662) a nanese se na sloupec kysličníku křemičitého o rozměrech 93 $\times$ 2,0 cm. Sloupec se pak promyje 250 ml 1% methanolu v chloroformu, 200 ml 3% methanolu v chloroformu a 700 mililitrů 5% methanolu v chloroformu.

Jakmile se objeví zbarvený materiál, odbírají se frakce a prvních 16 zkumavek obsahuje požadovaný materiál. Frakce se jednotlivě odpaří na sirupy, v nichž dojde ke stání přes noc ke krystalizaci. Přidá se methanol, krystaly se rozdrtí a rozpouštědlo se odstraní pipetou. Pak se krystaly promyjí methanolem, čímž se získá 0,886 gra-

mu krystalů a 2,231 g matečného louhu. Krystaly se nechají překrystalovat z tetrachlormethanu a matečný loup se nanese na preparativní desky pro chromatografii na tenké vrstvě, jako rozpouštědla se užije 5% methanol v chloroformu.

Tímto způsobem se získá ve výtěžku 62 % v tomto příkladě 1,81 g 0,0044 molu krystalického 1-[(2-benzoyloxy-1-benzyl-oxy)methyl/ethoxy)methoxy]-5-fluoruracilu. Protože při chromatografii na tenké vrstvě bylo stále ještě možno prokázat nečistoty, byl získán analytický vzorek překrystalováním tohoto materiálu z malého množství horkého ethanolu. Krystaly měly teplotu tání 84 až 86 °C a spektrum v ultrafialovém světle mělo maximální absorpci při 265 nm.

Výsledná sloučenina, dále uváděná jako 5F-benzyl-U* má následující strukturní vzorec:



Příklad 7

Způsob výroby 5-fluor-1-[(2-hydroxy-1-hydroxymethyl/ethoxy)methyl]uracilu

5F-benzyl-U*, připravený způsobem podle příkladu 6 (0,656 g, 0,00158 molu) se rozpustí ve 26 ml ethanolu. Pak se přidá 10 ml čerstvé paládiové černi a pak ještě 13 ml cyklohexanu. Po půl hodině je možno prokázat chromatografií na tenké vrstvě, že veškerý výchozí materiál byl spotřebován, je však přítomno ještě malé množství monobenzylované sloučeniny. Po 5 hodinách je možno chromatografií na tenké vrstvě prokázat ukončení reakce a směs se zfiltruje a paládiová čern se promyje ethanollem. Roztok se odpaří za sníženého tlaku na 0,413 g sirupu, který krystalizuje po přidání malého množství methanolu. Vzorek se rozpustí ve 3 ml horkého ethanolu a pak se jeho objem sníží na 1 ml probubláváním dusíkem.

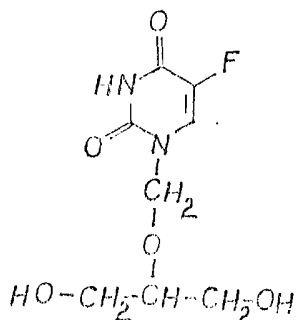
Výsledné krystaly v Gregově zkumavce se třikrát promyjí ethanollem a rozpouštědlo se odpaří odstředěním, čímž se ve výtěžku 50 % získá 185 g 0,0079 molu krystalů. Z matečného louhu se ještě ve výtěžku 24 % získá 0,089 g, 0,00038 molu dalších krysta-

lů. Po druhém překrystalování má materiál teplotu tání 126 až 128 °C a maximální absorpci v ultrafialovém světle v ethanolu 266 nm.

NMR-spektrum v DC_3OD a TMS poskytuje následující hodnoty:

3,58 (m, 5H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$),
5,28 (s, 2H, OCH_2N),
7,85 (d, 1H, $J_{\text{H6}} = 6,0 \text{ Hz}$, H-6).

Výsledná sloučenina, která bude dále nazývána 5FU* má následující strukturní vzorec



Příklad 8

Způsob výroby 5-aza-1-[(1-hydroxymethyl)-2-hydroxyethoxy]methylcytosinu

5,0 g, 0,0446 molu 5-azacytosinu a 100 mg krystalů síranu amonného se uvede v suspenzi ve 40 ml HMDS a pak se směs zahřívá za stálého míchání na teplotu varu pod zpětným chladičem. Po 20 minutách se přidá ještě malé množství síranu amonného a po dalších 20 minutách se směs vyčerpá. Přebytkový HMDS se odpaří za sníženého tlaku, čímž se získá bílá pevná látka, 5-azacytosin s ochrannými silylovými skupinami a tato látka se užije bez dalšího čištění. Rozpustí se ve 100 ml DCE a přidá se 3,5 ml bezvodého chloridu cínatého. Pak se přidá 0,040 molu 1,3 dibenzyloxy-2-chlormethoxypropanu a roztok se nechá stát přes noc při teplotě místnosti.

Pak se reakční směs vlije do vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného, rozpustí se v chloroformu a protřepe. Výsledná sraženina se oddělí filtrací přes celit. Obě fáze se oddělí a vodná fáze se extrahuje chloroformem. Organické fáze se slíjí, promyjí se vodou, vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří na 15 g sirupu. Tento sirup se rozpustí ve 20 ml chloroformu a nanese na sloupec kysličníku křemičitého o rozměrech 4,5 X 6,5 cm. Sloupec se vymyje 450 ml chloroformu. Pak se rozpouštědlo změní a užije se 5% methanol v chloroformu a odeberají se frakce po 10 až 15 ml.

Požadovaná sloučenina, 5-aza-1-[(2-benzyloxymethyl-1-benzyloxyethoxy)methyl]-

cytosin se nachází ve třech skupinách frakcí, a to:

40 až 42 (1,48 g),
43 až 62 (8,17 g) a
63 až 79 (0,42 g).

Tyto frakce se rozpustí v 2,3 ml, 12 ml a 1,5 ml horkého ethanolu a zahájí se krystalizace. Druhý vzorek obsahuje 5,292 g krystalů, v obou dalších vzorcích je možno pozorovat pouze několik krystalů. Z tohoto důvodu se první a třetí vzorek smísí s matečným louhem ze druhého vzorku a materiál se nanese na krátký sloupec kysličníku křemičitého o rozměrech 4,0 X 6,3 cm a nejprve se tento sloupec vymývá 125 ml chloroformu a pak 5% methanolem, v chloroformu, přičemž se odeberají frakce po 20 mililitrech. Výsledný materiál se nachází ve frakcích 7 až 8 (1,35 g) a ve frakcích 9 až 11 (1,9 g). Materiál s obsahem 1,9 g výsledné látky se rozpustí v ethanolu (3 ml) a získá se 0,917 g krystalů.

Celkem se ve výtěžku 39 % získá 6,209 g, 0,0157 molu výsledné látky. 6,209 g krystalů se doplní 1,461 g z jiného pokusu a materiál se nechá překrystalovat z 10 ml ethanolu, čímž se získá 6,95 g bílých krystalů. Vzorek se nechá překrystalovat dvakrát z ethanolu, výsledná teplota tání je 120 až 122,5 °C. Maximální absorpce v ultrafialovém světle v ethanolu je 228 a 236 nm, ve vodě 241 nm, při pH 251 nm, při pH 13 250 nm.

NMR-spektrum v CDCl_3 poskytuje následující hodnoty:

3,52 (d, 4H, $J = 5,5 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CHCH}_2-$),
4,02 (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2-$),
4,45 (s, 4H, $2 \times \text{PhCH}_2-$),
5,30 (s, 2H, OCH_2N),
5,95 (bs, 1H, HNH),
7,27 (m, 11H, $2 \times \text{PhCH}_2-$, HNH),
8,07 (s, 1H, H-6).

Svrchu uvedeným způsobem získaná sloučenina 5-aza-1-[(2-hydroxymethyl-1-hydroxyethoxy)methyl]cytosin v množství 6,432 gramu 0,0162 molu se rozpustí ve 200 ml teplého ethanolu. Pak se přidá 8 g kysličníku paládía a 100 ml cyklohexanu. Směs se za stálého míchání ohřeje na teplotu varu pod zpětným chladičem a po 3 hodinách je možno prokázat chromatografií na tenké vrstvě, že reakce probíhá příliš pomalu. Z tohoto důvodu se přidají ještě 2 g kysličníku paládía a směs se dále zahřívá na teplotu varu pod zpětným chladičem.

Po celkové době zahřívání 22 hodin se malé množství materiálu vysráží, avšak chromatografií na tenké vrstvě je možno prokázat, že směs stále obsahuje malé množství výchozí látky a monobenzylovaný analog. Materiál se zfiltruje a odparek se promyje horkým 95% ethanolem a promývá se

tak dlouho, až již neobsahuje směs žádnou sraženinu. Filtrát a ethanol po promývání se slíjí a odpaří, čímž se získá přibližně 4,5 gramu materiálu.

Tento materiál se nechá překrystalovat z horkého ethanolu a přidá se malé množství vody k usnadnění rozpouštění, čímž se ve výtěžku 23,3 % získá 0,816 g, 0,00377 molu zelenavých krystalů o teplotě tání 181 až 185 °C, filtrát má zelenou barvu. Filtrát se odpaří a odparek se rozpustí ve 3,5 ml ethanolu a zahájí se krystalizace. Krystaly se však nevytvoří. Materiál se protřepe s vodou a chloroformem a obě fáze se oddělí. Vodná fáze se odpaří současně s ethanolem, čímž se získají 2 g materiálu.

Krystalizace běžným způsobem nevede k úspěchu. Při chromatografii na tenké vrstvě je možno prokázat celou řadu složek, z čehož požadovaná látka tvoří přibližně 30 až 40 % směsi. Materiál se nanese na 4 plotny pro chromatografii na tenké vrstvě a jako rozpouštědla se užije 50% methanolu

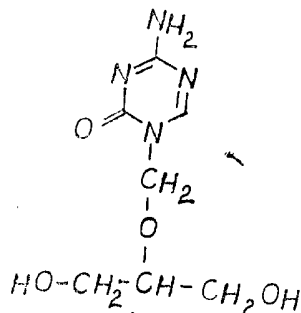
v chloroformu. Výsledný pás se vymývá 25% methanolem v chloroformu, čímž se získá 0,5 g materiálu. Krystalizací běžným způsobem se získají pouze stopy krystalů.

První podíl krystalů se nechá překrystalovat z 1 ml vody a 7 ml ethanolu, čímž se získají bílé krystaly o teplotě tání 189,5 až 191 °C. Maximální absorpce výsledné látky v ultrafialovém světle v ethanolu je při 220 nm, ve vodě 220 a 245 nm, při pH 1 250 nm a při pH 13 248 nm.

NMR-spektrum ($\text{CD}_3\text{OD} + 5$ kapek $\text{DMSO}-d_6 + \text{TMS}$) poskytuje následující hodnoty:

3,43 až 3,83 (m, 5H, $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2-$),
5,37 (s, 2H, OCH_2N),
8,27 (s, 1H, H-6).

Výslednou látkou je 5-aza-1-[(1-hydroxymethyl-2-hydroxy/ethoxy)methyl]cytosin, který bude dále uváděn jako 5-aza-C* a má strukturní vzorec:



Příklad 9

Způsob výroby 1-[(2-benzyloxy-1-/benzyloxymethyl)/ethoxymethyl]cytosin

5,0 g, 0,045 molu cytosinu 4 se uvede v suspenzi v 80 ml, 60 g HMDS 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazanu a přidají se krystalky síranu amonného. Tento postup byl popsán v publikaci G. Ritzmann a W. Pfeleiderer, Chem. Ber. **106**, 1401 (1973). Směs se za stálého míchání zahřívá na teplotu varu pod zpětným chladičem za nepřístupu vody tak dlouho, až vznikne čirý roztok.

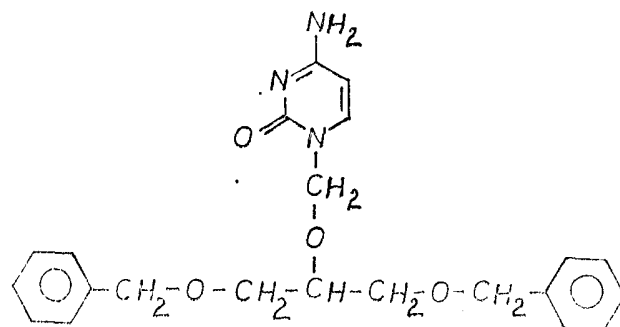
V případě, že po půl hodině zahřívání na teplotu varu pod zpětným chladičem čirý roztok nevznikne, je možno získat čirý roztok dalším přidáním síranu amonného.

V případě, že se horký roztok zpracovává

tak, že se přebytek HMDS opatrně odstraní na horké vodní lázni a současně se odvádí tvořící se voda, získá se bílá pevná látka, která se užije v dalším stupni bez předchozího čištění.

2,4-bis-(trimethylsilyl)cytosin se rozpustí ve 200 ml bezvodého DCE a přidá se 3,4 ml 29,1 molu bezvodého čerstvě destilovaného chloridu cínatého. Pak se přidá ještě 40 g, 40 molů zásobního roztoku chloridu 4 a žlutý roztok se nechá stát přes noc při teplotě místnosti, způsob je popsán v publikaci B. U. Niedballa a H. Verbruggen, Angew. Chem.

Výsledným produktem je 1-[(2-benzyloxy-1-/benzyloxymethyl/ethoxy)methyl]cytosin, který bude dále uváděn jako dibenzyl C* a má strukturní vzorec



Příklad 10

Způsob výroby 2-N-acetyl-9-[(2-benzyloxy-1-benzyloxymethyl)ethoxy]methylguaninu

1,93 g, 10 mmolů 2-N-acetylguaninu a 100 miligramů síranu amonného se uvede v suspenzi ve 20 ml HMDS. Směs se za stálého míchání zahřívá 3 hodiny na teplotu varu pod zpětným chladičem. V průběhu této doby se úplně vyčerpí. Přebytek HMDS se odstraní za sníženého tlaku na horké vodní lázni, čímž se získá bílá pevná látka, 2-N-acetylguanin se silylovými ochrannými skupinami, tento produkt se užije bez dalšího čištění. Bílá pevná látka se rozpustí v 50 ml DCE a přidá se 5 mmolů 1,3-dibenzyloxy-2-chlormethoxypropanu a pak 1 ml čerstvě destilovaného bezvodého chloridu cínatého.

Roztok se nechá stát přes noc při teplotě místnosti. Pak se roztok vlije do směsi vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a chloroformu a protřepe se. Směs se zfiltruje přes celit k odstranění sraženiny. Fáze se oddělí a vodná fáze se extrahuje chloroformem.

Organické fáze se slíjí, promyjí se vodou, vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří

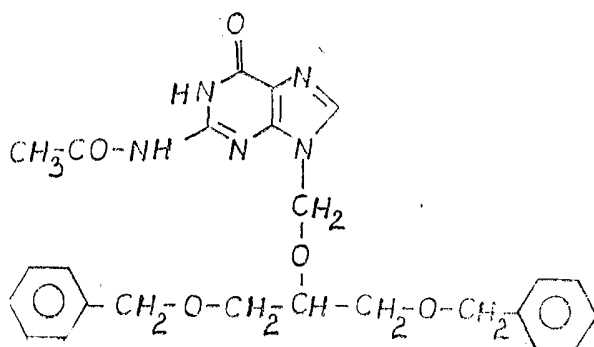
za sníženého tlaku na 2,19 g výsledného materiálu. Tento produkt se rozpustí v 5 ml chloroformu a nanese na sloupec kysličníku křemičitého o rozměrech 9 × 6,5 cm. Tento sloupec se promyje 60 ml chloroformu a pak se promývá 2% methanolem v chloroformu. Čisté frakce se získají ze zkumavek

15 (0,047 g),
19 až 20 (0,148 g) a
23 až 27 (0,43 g).

Každý ze vzorků se nechá krystalizovat z ethanolu, čímž se získá 20 mg, 64 mg a 250 mg materiálu. Na základě spektra v ultrafialovém světle obsahuje vzorek 250 miligramů materiálu převážně 2-N-acetyl-9-[(2-benzyloxy-1-benzyloxymethyl)ethoxy]methylguanin.

Po překrystalování z ethanolu má tato látka teplotu tání 142 až 144 °C. V ultrafialovém světle je maximální absorpce v ethanolu při 257 a 281 nm, minimální při 227 a 272 nm, ve vodě 259 a 278 nm, při pH 1 262 a při pH 13 263 nm.

Sloučenina bude dále uváděna jako N-acetylbenzyl 9* a má následující strukturní vzorec



Příklad 11

Způsob výroby 9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]guaninu

1,288 g, 0,00270 molu N-acetylbenzyl C* připraveného podle příkladu 10 se rozpustí v 1,5 ml pyridinu a přidá se 6 ml koncentrovaného hydroxidu. Nádoba se dobře uzavře a uloží se do vodní lázně při teplotě 55 stupňů Celsia. Po 15 hodinách dojde ke tvorbě krystalů, které se oddělí filtrací a promyjí se ethanolem. Krystaly mají teplotu tání 170 až 177 °C a nechají se překrystalovat ze 60 ml ethanolu, čímž se ve výtěžku 70,7 % získá 0,863 g, 0,0091 molu 9-[(2-benzyloxy-1-/benzyloxymethyl/ethoxy)methyl]guaninu o teplotě tání 180 až 182 °C.

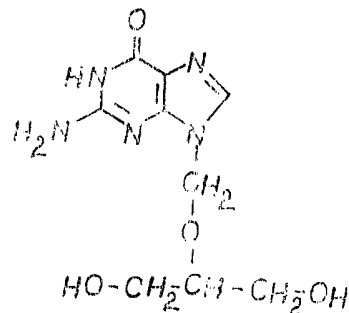
0,665 g, 0,00139 molu výsledné látky se rozpustí ve 40 ml ethanolu při teplotě varu pod zpětným chladičem. Přidá se 0,67 g kysličníku paládía a pak 20 ml cyklohexanu. Směs se dále zahřívá na teplotu varu pod zpětným chladičem a po 2 hodinách je možno prokázat chromatografií na tenké vrstvě, že reakční směs stále obsahuje velké množství výchozí látky.

Z tohoto důvodu se přidá ještě 0,6 g kysličníku paládía (Aldrich Gold Label). Po 5,5 hodinách reakce stále ještě probíhá pomalu a proto se přidá 0,5 g paládiové černi skladované několik měsíců pod vodou a nyní usušené filtrací a promytím ethanolem. Po 7 dalších hodinách se přidá ještě 15 ml cyklohexanu. Po 12 hodinách reakce stále ještě není ukončena, avšak po 22,5 hodinách je možno chromatografií na tenké vrstvě prokázat ukončení reakce.

Reakční směs se za horka zfiltruje a katalyzátor se promyje horkým 95% ethanolem. Při chlazení se tvoří krystaly, které se oddělí filtrací a promyjí se 95% ethanolem. Získá se 127 mg krystalů, které netají do teploty 360 °C, přestože se zbarví do tmavě hněda. Katalyzátor dosud absorbuje výsledný produkt a je nutno jej promýt horkým 75% ethanolem. Tento ethanol se pak slije s matečným louhem a odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rozpustí v horké směsi 2,5 ml vody a 2,5 ml ethanolu, načež se za stálého zahřívání přidá ještě 17,5 ml ethanolu. Roztok se nechá krystalizovat. 155 mg krystalů se oddělí filtrací a promyje se ethanolem. Krystaly netají do teploty 360 °C.

Z matečného louhu je možno získat 60 mg odparku. Celkem se tedy ve výtěžku 79 % získá 282 mg, 0,0010 molu výsledného produktu. V ultrafialovém světle v ethanolu je maximální adsorpce při 254 a 270 nm, ve vodě 252 a 269 nm, při pH 1 254 a 272 nm, při pH 13 252 nm.

Výsledným produktem je 9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]guanin, který bude dále uváděn jako G* a má strukturní vzorec



Příklad 12

Způsob výroby 9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]guaninu

3,1 g, (20,5 mmolu) guaninu a 250 mg síranu amonného se uvede v suspenzi ve 150 mililitrech 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazanu (dále bude uváděn jako HMDS) a směs se zahřívá na teplotu varu pod zpětným chladičem. Po 4 dnech, v průběhu nichž se přidá ještě 150 mg síranu amonného, se roztok vyčechří.

HMDS se odstraní za sníženého tlaku a odparek se rozpustí v acetonitrilu. Přidá se 80 mg tetra-n-butylamoniumjodidu a pak ještě 21,2 mmolu 1,3-dibenzyloxy-2-chlormethoxypropanu v acetonitrilu. Výsledný roztok se zahřívá 15 hodin na teplotu varu pod zpětným chladičem. Chromatografie na tenké vrstvě při použití směsi ethylacetátu a methanolu v objemovém poměru 4:1 prokazuje hlavní pás o $R_f = 0,30$, NMR-spektrum prokáže požadovaný produkt ve formě N-7-isomeru v poměru 7:3 vzhledem k normální sloučenině.

Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a odparek se rozpustí v 800 ml dichlormethanu. Tento roztok se postupně promyje 10% vodným roztokem uhličitanu draselného a vodou. Roztok v dichlormethanu se pak odpaří na malý objem. Přidá se 50 ml methanolu a rozpouštědla se odpaří za sníženého tlaku. 10 g odparku se rozpustí ve 200 ml dichlormethanu a roztok se nanese na sloupec silikagelu, eluát ze sloupce se analyzuje, NMR-spektrum prokazuje, že jde převážně o směs 9-[(2-benzyloxy-1-/benzyloxymethyl/ethoxy)methyl]guaninu a 7-[(2-benzyloxy-1-/benzyloxymethyl/ethoxy)methyl]guaninu.

Isomery se oddělí selektivní krystalizací a pak se přidá 9-[(2-benzyloxy-1-/benzyloxymethyl/ethoxy)methyl]guanin (20 g, 25,7 mmolu) ve 100 ml bezvodého tetrahydrofuranu k 1000 ml kapalného amoniaku, zchlazeného na lázni s acetone a suchým ledem. Teplota lázně se pak nechá stou-

pnout na -45 a -40 °C a za stálého míchání se po malých podílech přidá sodík tak dlouho, až se získá stálé modré zbarvení roztoku. Pak se přidává chlorid amonný po malých podílech tak dlouho, až modré zbarvení opět vymizí.

Všechny tyto postupy se provádějí v dusíkové atmosféře. Po odpaření amoniaku a tetrahydrofuranu v dusíkové atmosféře se získá bílý odparek, k odparku se přidá 300 mililitrů benzenu a roztok se zfiltruje. Takto získaná pevná látka se rozpustí v 500 ml vody a roztok se extrahuje třikrát 200 ml benzenu. Vodná vrstva se okyslí přes noc kyselinou octovou na pH 5 až 6 a po filtraci se získá bílá sraženina. Tato sraženina se rozpustí ve vroucí vodě a roztok se zfiltruje. Filtrát při stání krystalizuje, čímž se získá 7,6 g bílých krystalů. Matečný louh při stání poskytuje ještě 1,4 g dalších krystalů. Celkový výtěžek je 9,0 g, což je 77 % teoretického množství.

Produkt je homogenní při chromatografii na tenké vrstvě silikagelu při použití směsi propanolu, vody a hydroxidu amonného v poměru 7:2:1, teplota tání je 285 °C za rozkladu.

NMR-spektrum v D_2O má maxima:

3,57 (m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-$),
5,50 (s, 2H, OCH_2) a
7,78 (s, 1H, H-8).

Spektrum v ultrafialovém světle při pH 7 má maxima při 270 a 252 nm.

NMR-spektrum potvrzuje, že konfigurace produktu je G^* .

Příklad 13

Způsob výroby 9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]guaninu (G^*)

200 g (0,11 molu) 6-chlorguaninu, 200 ml HMDS a 300 mg síranu amonného se smísí a zahřeje za stálého míchání na teplotu varu pod zpětným chladičem. Po 1 $\frac{3}{4}$ hodině se přidá ještě další podíl síranu amonného.

Po další hodině vznikne čirá směs. Přebytek HMDS se oddestiluje za sníženého tlaku, čímž se získá pevná látka, která se rozpustí ve 200 ml bezvodého benzenu, přidá se 34 g (0,135 molu) kyanidu rtuťnatého a 0,110 molu 1,3-dibenzyloxy-2-chlormethoxypropanu. Pak se směs zahřeje na 5 hodin na teplotu varu pod zpětným chladičem, pak se zchladí a zfiltruje a pevný podíl se promyje benzenem. Filtrát a promývací kapalina se slíjí a odpaří za sníženého tlaku na sirup, který se rozpustí ve 400 ml methylenchloridu a roztok se postupně promývá 400 mililitry vody, 4 $\times$ 200 ml 30% vodného roztoku jodidu draselného, 200 ml vody a 2 $\times$ 200 ml vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného.

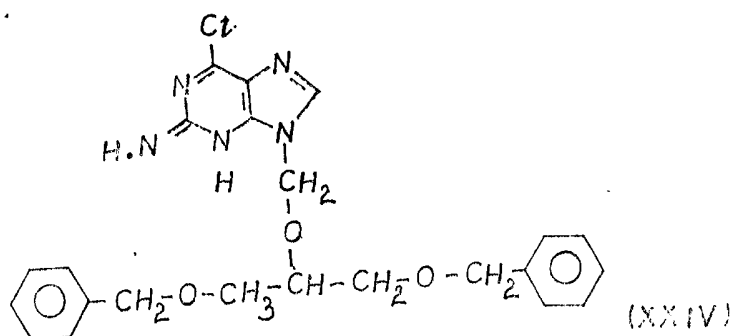
Methylenchloridová fáze se vysuší síranem sodným a odpaří se na 54 g sirupu. Sirup se rozpustí v 50 ml chloroformu a nanes se na sloupec silikagelu o rozměrech 19,5 $\times$ 6,3 cm. Sloupec se vymývá 1% methanolem v chloroformu a jednotlivé frakce se sledují na požadovaný výsledný produkt, který je možno poprvé prokázat ve frakci 37.

Príslušné frakce se slíjí následujícím způsobem:

37 až 46 (6,62 g), **A**,
47 až 56 (5,62 g), **B**,
57 až 90 (16,0 g), **C**,
91 až 130 (9,4 g), **D** a
131 až 150 (1,8 g), **E**.

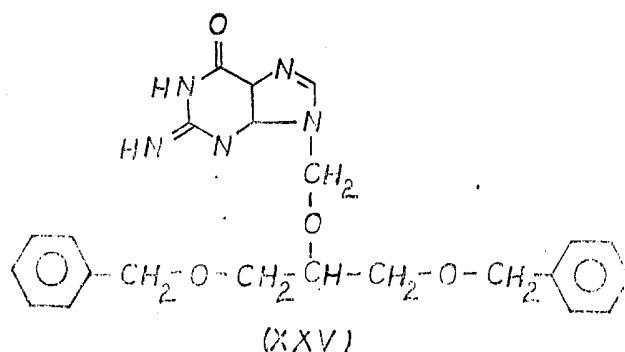
Podle NMR-spektra se ve frakci A nachází pouze 40 % požadovaného produktu. Ve frakcích B a C bylo možno prokázat pouze výsledný produkt, ve frakci D je možno prokázat také nečistotu, která se pohybuje pomaleji než výsledný produkt. Z tohoto důvodu byly spojeny frakce A a E, frakce B a C a frakce D byla oddělena.

Svrchu uvedené tři frakce se ještě jednou stejným způsobem dělí. Tímto způsobem se získá 9-[(2-benzyloxy-1-/benzyloxymethyl/ethoxy)methyl]-6-chlorguanidin vzorce XXIV



Vzorek (21 až 62 g) sloučeniny vzorce XXIV se rozpustí ve 360 ml methanolu. Přidá se 12 ml merkptoethanolu a 1,5 ml vody a pak ještě 160 ml 1N methoxidu sodíku a směs se zahřeje na teplotu varu pod zpět-

ným chladičem. V průběhu půl hodiny se vytvoří meziprodukt, který obsahuje thio skupinu. Směs se zahřívá ještě 4,5 hodiny, čímž se tento meziprodukt převede na požadovanou výslednou látku vzorce XXV:



Přibližně 300 ml roztoku se odpaří a výsledný viskózní roztok se vlije do 400 ml vody. Nejprve se vytvoří zakalená směs, která stáním vykrystalizuje. Oddělí se filtrací 22,5 g krystalů, které se promyjí ethanol. Filtrát se extrahuje chloroformem, chloroformová fáze se odpaří za sníženého tlaku na 6 g sirupu. Sirup se smísí s ethanol. a nechá se krystalizovat. 1 až 3 g krystalů se oddělí filtrací a promyjí se ethanol.

Podobným způsobem se získá ještě 5,2 g krystalů ze sloučeniny vzorce XXIV. Všechny tyto krystaly se spojí, rozpustí ve 30 ml horkého pyridinu a roztok se zfiltruje. Pak se filtrační papír promyje 30 ml horkého ethanolu přímo do pyridinového filtrátu, přidá se 10 ml vody, čímž se počnou vytvářet krystaly a směs se odloží. 15,6 g krystalů se oddělí filtrací a promyje se ethanol. Z matečného louhu se získá ještě 1,3 g krystalů. Tímto způsobem se ve výtěžku 35 % získá z 6-chlorguaninu celkem 16,9 g (0,0387 molu) sloučeniny vzorce XXV.

15,6 g (0,386 molu) sloučeniny vzorce XXV se rozpustí v 500 ml ethanolu, zahřátého na teplotu varu pod zpětným chladičem. Pak se přidá 400 ml cyklohexanu a pak ještě přibližně 15 g paládiové černi. Po 4 hodinách se většina sloučeniny vzorce XXV spotřebuje a po 15 hodinách je reakce ukončena, jak je možno prokázat chromatografií na tenké vrstvě. Směs se zchladí a zfiltruje. Filtrát se odpaří za sníženého tlaku, získá se méně než 1 g odparku. Paládium se uvede v suspenzi ve 200 ml dime-thylformamidu, zahřátého na vroucí vodní lázni a roztok se zfiltruje.

Postup se opakuje ještě 4X, načež se směs ještě 2X promyje horkým methanol. Organická fáze se slijí a odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rozpustí v horké směsi 200 ml vody a 200 ml ethanolu a roztok se zfiltruje přes celit s obsahem 0,5 gramu aktivního uhlí. Filtrát se odpaří do sucha za sníženého tlaku. Pevný odparek se

nechá překrystalizovat z horké směsi vody a ethanolu.

Tímto způsobem se ve výtěžku 81,7 % získá 7,52 g, 0,0294 molu krystalů, které se oddělí filtrací a promyjí se ethanol. Matečný louh se odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rozpustí ve směsi 5 ml horké vody a 5 ml horkého ethanolu a nechá se krystalizovat. Tímto způsobem se ve výtěžku 2 % získá 0,2 g (0,0008 molu) krystalů, které se oddělí filtrací a promyjí se ethanol.

NMR-spektrum je možno prokázat, že konfigurace produktu je G*.

Příklad 14

Způsob výroby 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guaninu (G*)

1,51 g (0,1 molu) guaninu a 300 mg síranu amonného se uvede v suspenzi ve 40 ml HMDS a směs se zahřeje za stálého míchání na teplotu varu pod zpětným chladičem. Po 2 dnech zahřívání na teplotu varu pod zpětným chladičem za občasných přidání síranu amonného se směs vyčerpá. Přebytek HMDS se oddělí za sníženého tlaku a odparek se rozpustí ve 40 ml benzenu. Pak se přidá 3 g (0,12 molu) kyanidu rtuťnatého a 0,01 molu zásobního roztoku chloridu sodného. Směs se zahřívá ještě 5 hodin na teplotu varu pod zpětným chladičem, pak se zředí 200 ml chloroformu a postupně se promývá třikrát 30% vodným roztokem jodu draselného a vodou.

Organická fáze se vysuší síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku na 5,8 g sirupu. Tento sirup se smísí se 150 ml ethanolu, načež se zahřeje a nechá se stát. Filtrací se získá 1,5 g krystalů, které se podrobí NMR-analýze, čímž se prokáže, že běží o směs 9-[(2-benzyloxy-1-(benzyloxymethyl)ethoxymethyl]guaninu a 7-[(2-benzyloxy-1-(benzyloxymethyl)ethoxymethyl]guaninu.

Složky směsi se oddělí na sloupci a 9-substituovaný guanin se uvede v reakci s paládiovou černí a cyklohexanem v ethanolu při teplotě varu pod zpětným chladičem tak, jak je popsáno v příkladu 12, čímž se získá výsledný produkt v konfiguraci G*.

Příklad 15

Způsob výroby 1-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]cytosinu (C*)

5,0 g (0,045 molu) cytosinu se uvede v suspenzi v 80 ml 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazanu a přidá se několik krystalů síranu amonného podle publikace G. Ritzman a W. Pfeleiderer, Chem. Ber. **106**, 1401 (1973). Míchaná směs se chrání před přístupem vody a zahřívá se na teplotu varu pod zpětným chladičem do vzniku čirého roztoku.

V případě, že se nezíská čirý roztok do ½ hodiny varu pod zpětným chladičem, přidá se další podíl síranu amonného a roztok se vyčeří do 10 minut dalšího varu pod zpětným chladičem. Čirý horký roztok se dále zahřívá při použití odlučovače vody a přebytek HMDS se opatrně odstraní na horké vodní lázni, čímž se získá bílá pevná látka, která se užije v dalším stupni bez předchozího čištění.

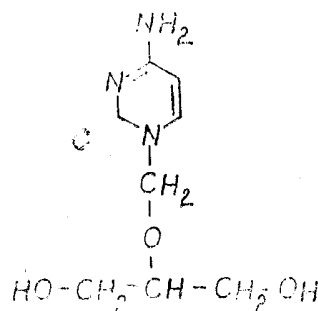
2,4-bis-(trimethylsilyl)cytosin se rozpustí ve 200 ml bezvodého DCE a přidá se 3,4 ml (29,1 molu) bezvodého, čerstvě destilovaného chloridu cínatého. Pak se přidá 40 g (40 molů) roztoku 1,3-dibenzoyloxy-2-chlor-methoxypropanu a žlutý roztok se nechá stát přes noc při teplotě místnosti.

5,59 g výsledného 1-[(2-benzoyloxy-1-/benzyloxymethyl/ethoxy)methyl]cytosinu se rozpustí ve 100 ml teplého ethanolu. Pak se přidá 18 ml ethanolové suspenze paládiové černi (80 ml ethanolu). Pak se přidá

ještě 90 ml cyklohexanu. Směs se zahřívá za stálého míchání 3 hodiny na teplotu varu pod zpětným chladičem, po této době je možno prokázat chromatografií na tenké vrstvě, že reakce je ukončena. Směs se zfiltruje a katalyzátor se promyje ethanollem.

Ethanolový roztok se odpaří za sníženého tlaku, čímž se získá sirup a krystalický podíl. Tento materiál se rozpustí v 15 ml horkého methanolu a krystalizace se zahájí přidáním malých krystalků. Krystaly se oddělí filtrací a promyjí se methanolem, čímž se získá 2,045 g krystalů. Matečný louh se zahustí, nechá se krystalizovat a zfiltruje, čímž se získá ještě 0,365 g krystalů.

Výsledná látka 1-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]cytosin má následující strukturní vzorec: (konfigurace C*)

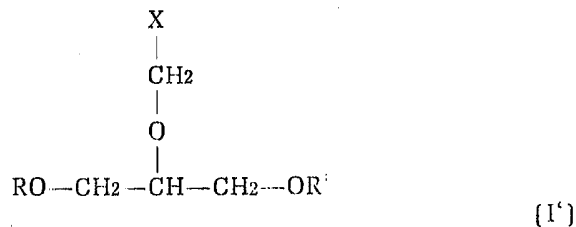


Sloučenina z příkladu 14 je účinná proti viru oparu typ 1.

Je zřejmé, že nukleosidy a jejich analogy s otevřeným řetězcem, vyrobené způsobem podle vynálezu, mají protivirové vlastnosti. Specifická účinnost některých analogů spočívá v tom, že tyto látky brzdí replikaci viru herpes simplex v organismu hostitele.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby purinových a pyrimidinových sloučenin obecného vzorce

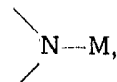
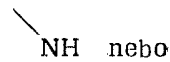


kde

X znamená:

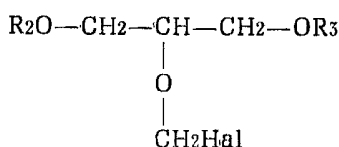
5-fluoruracilovou skupinu,
cytosinovou skupinu,
5-azacytosinovou skupinu,
adeninovou skupinu,
guaninovou skupinu nebo
2-N-acetylguaninovou skupinu a

R a R' znamenají nezávisle na sobě atom vodíku, benzyl nebo terc.butyldimethylsilyl, za předpokladu, že v případě, že X znamená adeninovou skupinu, má alespoň jeden ze substituentů R a R' odlišný význam od atomu vodíku, jakož i z farmaceutického hlediska přijatelné soli těchto sloučenin, vyznačující se tím, že se uvede v reakci purinová nebo pyrimidinová báze, odpovídající významům pro X, popřípadě chemicky chráněná na svých dalších reaktivních místech, avšak obsahující volnou skupinu



kde

M znamená atom chloru, atom bromu, atom jódu, trimethylsilyl nebo sůl rtuti, stříbra nebo cínu, v místě reakce, kterým je atom dusíku v poloze 9 v případě, že X znamená adeninovou, guaninovou nebo 2-N-acetylguaninovou skupinu, a atom dusíku v poloze 1 v případě, že X znamená 5-fluoruracilovou, 5-azacyklosinovou nebo cytosinovou skupinu, se sloučeninou obecného vzorce



kde

R₂ a R₃ mají stejný význam jako substituenty R a R',

Hal znamená atom halogenu, načež se v případě, že jeden nebo obě symboly R₂ a R₃ znamenají benzyl, debenzyluje výsledný produkt na sloučeninu obecného vzorce I, v němž R a R' znamenají atomy vodíku nebo se v případě, že jeden nebo oba symboly R₂ a R₃ znamenají atomy vodíku provádí silylace za vzniku sloučeniny obecného vzorce I, v němž jeden nebo oba symboly R a R' znamenají terc.butyl-dimethylsilyl a popřípadě se takto získaná volná látka převede na sůl, přijatelnou z farmaceutického hlediska.

2. Způsob podle bodu 1 pro výrobu 1-[(2-benzyloxy-1-/benzyloxymethyl/ethoxy)methyl]-5-fluoruracilu, vyznačující se tím, že se uvede v reakci 5-fluoruracil, popřípadě chráněný na reaktivních místech odlišných od polohy 1 s 1,3-dibenzyloxy-2-halogenmethoxypropanem a popřípadě se odstraní ochranné skupiny z 5-fluoruracilového jádra.

3. Způsob podle bodu 1 pro výrobu 5-fluor-1-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]uracilu, vyznačující se tím, že se působí na 1-[(2-benzyloxymethyl/ethoxy)methyl]-5-fluoruracil paládiem za hydrogenačních podmínek.

4. Způsob podle bodu 1 pro výrobu 5-aza-1-[(1-hydroxymethyl-/2-hydroxy/ethoxy)methyl]cytosinu, vyznačující se tím, že se uvede v reakci 5-azacytosin, popřípadě chráněný na svých reaktivních polohách, odlišných od polohy 1 s 1,3-dibenzyloxy-2-halogenmethoxypropanem s následnou debenzylací působením paládia za hydrogenač-

ních podmínek s případným odstraněním ochranných skupin.

5. Způsob podle bodu 1 pro výrobu 1-[(2-benzyloxy-1-/benzyloxymethyl/ethoxy)methyl]cytosinu, vyznačující se tím, že se uvede v reakci cytosin, popřípadě chráněný ve svých reaktivních polohách, odlišných od polohy 1 s 1,3-dibenzyloxy-2-halogenmethoxypropanem a popřípadě se odstraní ochranné skupiny z cytosinového jádra výsledné sloučeniny.

6. Způsob podle bodu 1 pro výrobu 2-N-acetyl-9-[(2-benzyloxy-1-/benzyloxymethyl/ethoxy)methyl]guaninu, vyznačující se tím, že se uvede v reakci 2-N-acetylguanin, popřípadě chráněný ve svých reaktivních polohách, odlišných od polohy 9 s 1,3-dibenzyloxy-2-chlormethoxypropanem a popřípadě se odstraní ochranné skupiny z guaninového jádra výsledné sloučeniny.

7. Způsob podle bodu 1 pro výrobu 9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]guaninu, vyznačující se tím, že se acetyluje 2-N-acetyl-9-[(2-benzyloxy-1-/benzyloxymethyl/ethoxy)methyl]guanin s následnou debenzylací výsledné látky.

8. Způsob podle bodu 1 pro výrobu 9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]guaninu, vyznačující se tím, že se uvede v reakci 6-chlorguanin, popřípadě chráněný ve svých reaktivních polohách, odlišných od polohy 9 s 1,3-dibenzyloxy-2-halogenmethoxypropanem za přítomnosti kyanidu rtuťnatého s následným odstraněním chloru z výsledného 6-chlor-1-[(2-benzyloxy-1-/benzyloxymethyl/ethoxy)methyl]guaninu a s následnou debenzylací těchto látek, přičemž se sloučenina popřípadě zbaví ochranných skupin.

9. Způsob podle bodu 1 pro výrobu 9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]guaninu, vyznačující se tím, že se uvede v reakci guanin, popřípadě chráněný ve svých reaktivních polohách, odlišných od polohy 9 s 1,3-dibenzyloxy-2-halogenmethoxypropanem za podmínek, vhodných pro kondenzační reakci s následnou debenzylací výsledného produktu a s případným odstraněním ochranných skupin.

10. Způsob podle bodu 1 pro výrobu 9-[(2-hydroxy-1-/hydroxymethyl/ethoxy)methyl]cytosinu, vyznačující se tím, že se uvede v reakci cytosin, popřípadě chráněný na svých reaktivních polohách, odlišných od polohy 1 s 1,3-dibenzyloxy-2-halogenmethoxypropanem s následnou debenzylací výsledného produktu, přičemž se sloučenina popřípadě zbaví ochranných skupin.