



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

210383

(II) (B1)

(22) Přihlášeno 28 06 79
(21) (PV 4491-79)

(40) Zveřejněno 29 05 81

(45) Vydáno 15 07 83

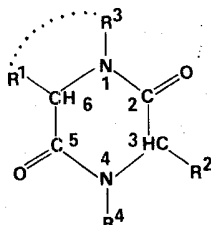
(51) Int. Cl.³
A 61 K 31/495//
C 07 D 241/08

(75)
Autor vynálezu

VANŽURA JIŘÍ RNDr., PALÁT KAREL doc. RNDr. PhMr. CSc.,
ČELADNÍK MILAN doc. RNDr. PhMr. CSc., HRADEC KRÁLOVÉ,
KLIMEŠ JIŘÍ RNDr., JEDOVNICE, ŠMEJKAL FRANTIŠEK RNDr. PhMr. CSc.,
PRAHA

(54) Léčivo virových infekcí

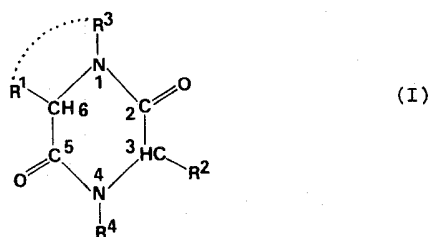
Vynález se týká léčiva virových infekcí, které jako účinnou složku obsahuje alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce



ve kterém R^1 je alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku, benzyl nebo fenyl, R^2 je alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku, hydroxyalkyl s 1 až 3 atomy uhlíku, fenyl nebo benzyl, R^3 a R^4 značí atomy vodíku nebo alkyly s 1 až 3 atomy uhlíku, přičemž substituenty R^1 a R^3 , popřípadě spojeny, mohou tvořit alkylenový řetězec s 2 až 4 methylenovými skupinami.

Látky jsou účinné proti různým druhům virů, zejména proti viru chřipky AWS, viru vakcinie a herpesu.

Vynález se týká léčiva virových infekcí, účinného proti RNA- a DNA-virům, zejména proti viru chřipky AWS, viru vakcinie a viru herpesu 2. Toto léčivo obsahuje jako účinnou složku alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I,



ve kterém značí R^1 alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku, benzyl nebo fenyl, R^2 alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku, hydroxyalkyl s 1 až 3 atomy uhlíku, fenyl nebo benzyl, R^3 a R^4 atomy vodíku nebo alkyly s 1 až 3 atomy uhlíku, přičemž substituenty R^1 a R^3 , popřípadě spolu spojeny, mohou tvořit alkylenový řetězec s 2 až 4 methylenovými skupinami.

Typickými příklady reprezentujícími látky obecného vzorce I jsou sloučeniny:

cyklo (L-Ala-L-Leu), chemický název 3-methyl-6-(2-methylpropyl)-2,5-piperazindion,
 cyklo (L-Ala-D-Val), chemický název 3-methyl-6-(1-methylethyl)-2,5-piperazindion,
 cyklo (D-Ala-L-Val), chemický název 3-methyl-6-(1-methylethyl)-2,5-piperazindion,
 cyklo (L-Ser-L-Val), chemický název 3-hydroxymethyl-6-(1-methylethyl)-2,5-piperazindion,
 cyklo (L-Pro-L-Leu), chemický název 1,6-trimethylen-3-(2-methylpropyl)-2,5-piperazindion,
 cyklo (D-Val-D-Phe), chemický název 3-(1-methylethyl)-6-benzyl-2,5-piperazindion,
 cyklo (L-Val-L-Leu), chemický název 3-(1-methylethyl)-6-(2-methylpropyl)-2,5-piperazindion.

Zájem o tyto látky byl vyvolán objevem fungicidní, baktericidní a antivirové aktivity skupiny přírodních látek typu gliotoxinu, sporidesminu, arantoinu a dalších, které obsahují jako základní skelet 3,6-epidithia-2,5-piperazindion. Zjednodušený symetrický analog tohoto typu, připravený Trownem (Trown P. W.: USA patent č. 3 562 253), substituovaný na atomech dusíku methyl-, ethyl- a propylskupinou, rovněž vykazoval antivirovou aktivitu proti některým RNA-virům. Stejně byl účinný i symetrický 3,6-difenyl-3,6-epidithia-1,4-dimethyl-2,5-piperazindion (Svokos S. G.: NSR pat. zveřej. spis č. 2 029 305).

Protivirovou aktivitu vykazovaly pouze deriváty s epi-polysulfidickým můstkem, zatímco výchozí symetrické 2,5-piperazindiony se jeví jako neúčinné. Proto byl vysloven předpoklad, že nositelem účinku je disulfidický můstek a odpovídající dithiol a základní struktura 2,5-piperazindionu byla označena jako antivirově neúčinná. Přehled vlastností jednoduchých i substituovaných 2,5-piperazindionů a jejich přírodně se vyskytujících analogů je uveden v souborných referátech (Sammes P. G.: Naturally Occuring 2,5-Dioxopiperazines and Related Compounds p. 51-107, in Progress in the Chemistry of Natural Products Vol. 32, Springer Verlag, Wien, New York, 1975; John S., Gröger D.; Pharmazie 32/H 1/, 1-16 (1977)).

Mezitím autoři Crescenci V., Cesaro A., Russo E., (Int. J. Peptide Protein Res. 5(6), 427-434 (1973)) prokázali denaturační efekt 2,5-piperazindionu na RNA-su a další autoři, Augustin M., Erfurt G., Mueller S. (NDR pat. 101 278; Ref. Chem. Abstr. 81, 146895q /1974/) fungicidní aktivitu jednoduchého N,N'-disubstituovaného 2,5-piperazindionu, resp. antikancerogenní aktivitu dalšího symetrického jednoduchého derivátu (Shen Tsung-Jing, Jensen N. P., Wagner A. F.: NSR pat. zveřej. spis č. 2 257 542; Ref. Chem. Abstr. 79 42551s /1973/).

Pro vyřešení otázky, při jakém zjednodušení molekuly se ještě projevuje antivirový účinek, byla běžnými metodami peptidové syntézy připravena řada asymetrických, symetrických opticky aktivních i racemických 2,5-piperazindionů vpředu uvedeného obecného vzorce, které byly testovány za standardních podmínek proti vybraným RNA- a DNA-virům. Protivirová účinnost byla hodnocena in vitro na tkáňových kulturách kuřecích fibroblastů pomocí inhibice tvorby plaků v agarovém difúzním testu za použití 6-azauridinu jako standardu účinnosti.

nosti. Výsledky in vitro testů některých vybraných sloučenin (400 a 403) jsou uvedeny v tabulce. Z výsledků vyplývá, že látky obecného vzorce I představované příklady v tabulce jsou shodně nebo více účinné než kontrolní 6-azauridin. Žádná z testovaných látek nevykazovala cytotoxicitu.

Účinek vybraných látek byl ověřen v testech in vivo, prováděných na myších samičích o hmotnosti 11 až 12 g, infikovaných tail-metodou podle Yoshimury (Yoshimura S., Christian R. T., Mayer C. D., Krueger R. F.: *progr. Antimicrob. Antibacter. Ther., Proc. 6th Inter. Congr. Chemother.* 1, 481-484 (1970); Univ. of Tokyo Press, Tokyo 1970), léčených subkutánně 2x denně po 0,2 ml roztoku nebo suspenze ve fyziologickém roztoku s Tweenem 80 v koncentraci 250 mg/kg po dobu pěti dnů. Myši byly léčeny preventivně terapeuticky, tzn. léčba byla zahájena 3 h před infekcí, druhá dávka byla aplikována 3 h po infekci, v dalších dnech vždy ráno a odpoledne. Oba testované deriváty snižovaly v průběhu 5. až 8. dne kožní reakce viru vakcinie 3 až 4x. Sedmého dne, kdy vrcholily kožní reakce u neléčené kontroly viru, potlačoval derivát 400 tyto příznaky ze 75 % a derivát 403 z 65 %.

Z výsledků vyplývá, že látky uvedeného obecného vzorce jsou antivirové účinné a přítomnost epidisulfidického, resp. epipolysulfidického můstku, nebo thiolových skupin v polohách 3,6 není nutnou podmínkou antivirové aktivity.

Následujícími příklady je příprava látek obecného vzorce I blíže objasněna, ale není nijak omezena.

Příklady provedení

P ř í k l a d 1

Methylester N-benzyloxykarbonyl-L-leucyl-L- α -alaninu

K suspenzi 7,0 g (0,05 mol) hydrochloridu methylesteru L- α -alaninu v minimálním množství chloroformu se za míchání a chlazení přidá 65 g 2% roztoku amoniaku v suchém chloroformu. Vyloučená sraženina chloridu amonného se odfiltruje. K filtrátu se přidá nasycený roztok 13,3 g (0,05 mol) N-benzyloxykarbonyl-L-leucinu v chloroformu, směs se ochladí na -15 stupňů Celsia a smísí s chloroformovým roztokem 11,0 g N,N-dicyklohexylkarbodiimidu. Po 12 hodinách stání při 4 °C se oddělí vyloučená N,N-dicyklohexylmočovina, čirý roztok se okyselí několika kapkami kyseliny octové. Eventuální zákal se odstraní další filtrací. Filtrát se šetrně vakuově zahustí, zbytek se rozpustí ve 40 ml ethylacetátu a promývá postupně malým množstvím 1 N kyseliny chlorovodíkové, 0,5 N uhličitanu sodného a vodou. Oddělená ethylacetátová vrstva se vysuší bezvodým síranem sodným a vakuově zahustí. Výtěžek 12,7 g bílých krystalů; po rekrystalizaci poskytnou produkt o t. t. 94 až 95 °C.

P ř í k l a d 2

Cyklo (L-Alanyl-L-Leucyl)

50,0 g 36% roztoku bromovodíku ve 100% kyselině octové se přidá ke 12,5 g methylesteru N-benzyloxykarbonyl-L-leucyl-L-alaninu do baňky chráněné chlorkalciovým uzávěrem a třepané tak dlouho, dokud se vyvíjejí bublinky kysličníku uhličitého. Potom se kyselina octová a přebytek bromovodíku vakuově oddestiluje a mazlavý odparek roztírá s etherem tak dlouho, dokud se neuvolní krystalky hydrobromidové soli lineárního dipeptidu. Etherová vrstva obsahující benzylbromid se opatrně dekantuje. Dekantace a roztírání s etherem se několikrát opakuje.

9,0 hydrobromidové soli methylesteru L-Leucyl-L- α -alaninu se nechá zreagovat s 30,0 g 2% chloroformového roztoku amoniaku, ochlazeného na -5 °C. Vyloučená sraženina bromidu amonného se oddělí centrifugací a čirý filtrát se za sníženého tlaku zahustí do sucha a rozpustí ve 20 ml suchého methanolu. Cyklizace probíhá spontánně po přidavku katalytického

množství suchého amoniaku. Takto se získá 3,1 g bílého mikrokrystallického produktu o t. t. 258 až 259 °C, sublimujícího při 163 °C bez rozkladu. Látka se rozpouští v kyselině octové, nižších alkoholech a ve vodě. $(\alpha)_D^{25} = -34,5^\circ$ (c = 1,2; 100% kyselina octová), $(\alpha)_D^{25} = -25,3^\circ$ (c = 0,9; MeOH).

Alternativním postupem je hydrogenolýza N-benzoyloxykarbonal-L-leucyl-L- α -alaninu v methanolu na paládiové černi, kterou se získá čistší produkt ve stejných výtěžcích a stejné čistotě.

Stejným postupem z odpovídajícího množství příslušných složek byly připraveny tyto látky:

Cyklo (L-Ala-D-Val): Bílá krystalická látka, snadno sublimující (počátek sublimace 159 °C). T. t. 272 až 274 °C. Dobře rozpustná v kyselině octové a methanolu, méně ve vodě. Nerozpustná v etheru a petroletheru. $(\alpha)_D^{25} = -23,9^\circ$ (c = 1; HAc).

Cyklo (D-Ala-L-Val): bílá krystalická látka, snadno sublimující (počátek sublimace 157 °C). T. t. 271 až 273 °C. Dobře rozpustná v kyselině octové a methanolu. Nerozpustná v etheru a petroletheru. $(\alpha)_D^{25} = +25,4^\circ$ (c = 0,8; HAc).

Cyklo (L-Ser-L-Val): bílá krystalická látka dobře rozpustná v methanolu, nerozpustná v etheru a petroletheru. T. t. 244 až 245 °C, $(\alpha)_D^{25} = -46,8^\circ$ (c = 0,9; HAc).

Cyklo (L-Pro-L-Leu): bílá krystalická látka, sublimující nad 130 °C. T. t. 157 až 159 stupňů Celsia. Rozpustná v methanolu a kyselině octové. Nerozpustná v etheru a petroletheru. $(\alpha)_D^{25} = -134^\circ$ (c = 1, MeOH).

Cyklo (D-Val-D-Phe): bílá krystalická látka, sublimující při 200 °C. T. t. 268 až 269 °C. Rozpustná v methanolu a kyselině octové, nerozpustná v etheru a petroletheru.

Cyklo (L-Val-L-Leu) bílá krystalická látka, sublimující při 250 °C. Rozpustná v kyselině octové, částečně v methanolu. Nerozpustná v petroletheru. $(\alpha)_D^{25} = -46,8^\circ$ (c = 1, HAc).

Cyklo (D-Phe-D-Val): bílá krystalická látka, snadno sublimující, t. t. 282 až 283 °C. $(\alpha)_D^{25} = -57 \pm 2^\circ$ (c = 0,05, MeOH). Velmi málo rozpustná v methanolu, lépe v kyselině octové.

Methylací obvyklým způsobem metyljodidem za přítomnosti kyslíčnicku stříbrného byla připravena tato látka:

N,N'-dimethyl-cyklo(L-Ala-L-Leu): bílá krystalická látka, velmi dobře rozpustná v polárních rozpouštědlech, krystalizovatelná z n-hexanu, t. t. 53 až 54 °C. $(\alpha)_D^{25} = 57,7^\circ$ (c = 1, MeOH).

Cyklo (L-Nva-D-Phe): bílá krystalická látka, t. t. 252 až 253 °C (rozklad). $(\alpha)_D^{25} = -85,6^\circ$ (c = 0,7, HAc).

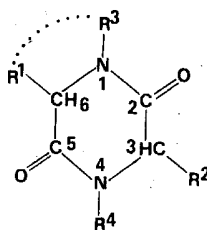
Cyklo (L-Nle-D-Phe): bílá krystalická látka, t. t. 252 až 254 °C (rozklad). $(\alpha)_D^{25} = -74,4^\circ$ (c = 0,7 HAc).

Cyklo (D-Phe-L-Ser): bílá krystalická látka, t. t. 255 až 258 °C (rozklad). $(\alpha)_D^{20} = -48,7^\circ$ (c = 0,4, HAc).

	Derivát 2,5-piperazin dionu	č.	RNA viry			DNA viry	
			AWS	NDV	WEE	vaccinia	herpes 2
			velikost inhibiční zóny v mm				
Látky	Cyklo (L-Ala-L-Leu)	400	35	0	0	30-35	0
účinnější	Cyklo (D-Ala-L-Val)	401	0	0	0	30	0
než 6-azur	Cyklo (L-Ser-L-Val)	404	21	0	0	25-30	21
Látky	Cyklo (L-Ala-D-Val)	403	0	0	0	20	0
shodně účinné	Cyklo (L-Pro-L-Leu)	407	0	0	0	20	0
	Cyklo (D-Val-D-Phe)	420	0	0	0	20	0
s 6-azur	Cyklo (L-Val-L-Leu)	423	0	0	0	20	0
6-AzUR	-	-	0	0	0	20-25	20-22

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Léčivo virových infekcí, vyznačující se tím, že obsahuje jako účinnou složku alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I,



(I)

ve kterém značí R^1 alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku, benzyl nebo fenyl, R^2 alkyl s 1 až 5 atomy uhlíku, hydroxyalkyl s 1 až 3 atomy uhlíku, fenyl nebo benzyl, R^3 a R^4 atomy vodíku nebo alkyly s 1 až 3 atomy uhlíku, přičemž substituenty R^1 a R^3 , popřípadě spolu spojeny, mohou tvořit alkylenový řetězec s 2 až 4 methylenovými skupinami.