



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

221103
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 07 H 19/12

(22) Přihlášeno 28 08 81
(21) (PV 6411-81)

(40) Zveřejněno 15 09 82

(45) Vydáno 15 01 86

(75)

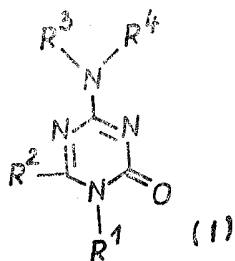
Autor vynálezu

PÍSKALA ALOIS RNDr. CSc., ČIHÁK ALOIS RNDr. CSc., VESELÝ JIŘÍ
MUDr. DrSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy 5-azacytosinových nukleosidů

1

Vynález se týká způsobu přípravy 5-azacytosinových nukleosidů obecného vzorce I



kde

R¹ značí volný nebo chráněný glykosyl, R² vodík, alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku, halogenalkyl s 1 až 6 atomy uhlíku, aralkyl se 7 až 12 atomy uhlíku, fenyl, R³ a R⁴ stejné nebo různé značí atomy vodíku, alkyly s 1 až 6 atomy uhlíku nebo aralkyl se 7 až 12 atomy uhlíku.

Nejvýznamnějšími látkami uvedeného typu jsou pyrimidinové antimetabolity 5-azacytidin[4-amino-1-β-D-ribofuranosyl-s-triazin-2(1H)-on] a 2'-deoxy-5-azacytidin[4-amino-1-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-s-triazin-2(1H)-on]. Obě látky brzdí růst bakterií již v nízkých koncentracích a mají výrazné kancerostatické účinky. U 5-

2

-azacytidinu byl zaznamenán také virostatický účinek. Biologické efekty a mechanismus účinku těchto látek, jakož i výsledky klinického výzkumu 5-azacytidinu jsou známy (Veselý a Čihák: Pharmac. Ther 2, A, 813 — 840 /1978/). 5-Azacytidin je v současné době používán zejména v USA k léčbě myelogenních forem leukémie. 2'-Deoxy-5-azacytidin je zkoušen i klinicky. Obě látky nacházejí také uplatnění jako nástroje biochemického, farmakologického a molekulárně biologického výzkumu. Významné jsou v poslední době objevené hypomethylační účinky těchto látek na nukleové kyseliny. Biologickou aktivitu, i když v menší míře jeví také 6 a N⁴-substituované deriváty 5-azacytidinu a 2'-deoxy-5-azacytidinu.

5-Azacytosinové nukleosidy se dají připravit podle československých patentů, případně autorských osvědčení č. 114 716, číslo 116 297, č. 139 542, č. 139 549, č. 142 531, č. 147 607, číslo 152 016, číslo 152 017 a AO č. 220 430. Syntéza těchto látek byla také předmětem řady publikací (Pískala, Šorm: Collect. Czech. Chem. Commun. 29, 2060 /1964/; Pliml, Šorm: tamtéž 29, 2576 /1964/; Winkley, Robins: J. Org. Chem. 35, 491 /1970/; Niedballa, Vorbrüggen: J. Org. Chem. 39, 3572 /1974/; Pískala a spol.: Nucleic Acids Res., Spec. Publ. No 1, s. 17 /1975/;

Pískala a spol.: Nucleic Acids Res., Spec. Publ. No 4, s. 109 /1978/; Pískala, Šorm: Nucleic Acid Chemistry, Part 1, 435 až 441 a 443 až 449 /1978/. 5-Azacytidin byl připraven také mikrobiální cestou (Hanka a spol.: Antimicrob. Ag. Chemother. 619 a 625 /1966/; US pat. 3 816 619). Mikrobiální příprava 5-azacytidinu není výhodná, jelikož tento nukleosid není stálý ve vodných roztocích a v důsledku toho je jeho izolace ze složitého média velice náročná a nehopodárná. Navíc je tento postup omezen pouze na toto antibiotikum a neumožňuje přípravu dalších sloučenin tohoto typu. Výhodnější jsou syntetické postupy, které umožňují pracovat za bezvodých podmínek a tudíž bez podstatných ztrát a mají také obecnější charakter. Při syntéze 5-azacytosinových nukleosidů je používáno různých variant dvou zásadně odlišných přístupů. První z nich vychází z chráněných glykosylisokyanátů, které jsou několikastupňovou syntézou převáděny na konečné produkty a druhé z nich spočívá v aplikaci konvenční přímé glykosylace silylovaných 5-azacytosinů.

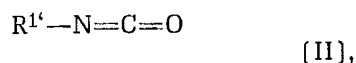
Nejkratší variantu isokyanátové metody popisuje československý patent č. 139 549. Podstata tohoto postupu spočívá v reakci chráněných glykosylisokyanátů s acylguanidiny a následné cyklizaci vznikajících chráněných N-acylamidino-N'-glykosylmočoviny na chráněné 5-azacytosinové nukleosidy, které se pak již obvyklými postupy dají převádět na volné nukleosidy. Kritickým bodem této jinak atraktivní syntézy je cyklizace chráněných N-acylamidino-N'-glykosylmočoviny, která probíhá v některých případech velmi pomalu i za zvýšené teploty a v přítomnosti sušidel a voda vznikající při cyklizaci navíc hydrolyticky štěpí necyclizovanou acylamidinomočovinu na sůl amidinium močoviny s odpovídající organickou kyselinou. Méně významnou měrou přispívá ke snížení celkových výtěžků také tvorba bis-aduktu při reakci isokyanátu s acylguanidinem v provedení dle citovaného patentu. Z těchto důvodů bylo aplikací tohoto postupu dosahováno nízkých výtěžků.

Dalším studiem tohoto přístupu k syntéze 5-azacytosinových nukleosidů bylo zjištěno, že cyklizace chráněných N-acylamidino-N'-glykosylmočoviny probíhá prakticky kvantitativně a velice rychle působením většího nadbytku silně bazických silylačních činidel v polárních inertních rozpouštědlech. Jako silylačních činidel lze použít také směsi halogentrialkylsilanů a trialkylaminů. Poměr obou komponent je nutno zvolit tak, aby trialkylamin ve směsi převládal. S výhodou bylo užíváno bis(trimethylsilyl)acetamidu, bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidu, případně směsi chlortrimethylsilanu a triethylaminu (1:1,1). Hexamethyldisilazan, který je často používán k silylaci heterocyklických sloučenin, je prakticky neúčinný. Osvědčilo se používat 6-ekvivalentů silylačního činidla a reakci provádět v ace-

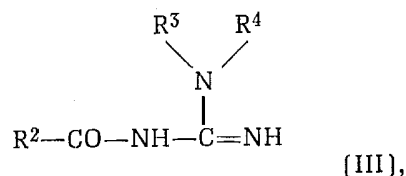
tonitrilu. Za těchto podmínek proběhne cyklizace do konce při teplotě místnosti během několika minut. V málo polárních rozpouštědlech, například v benzenu neproběhla cyklizace do konce za jinak stejných podmínek ani během 24 hodin. Konečně bylo zjištěno, že také nežádoucí tvorbě bis-aduktu při reakci isokyanátu s acylguanidinem lze zabránit pomalým přikapáváním roztoku isokyanátu v aprotickém inertním rozpouštědle k intenzívně míchané suspenzi acylguanidinu v témže rozpouštědle. Pro tuto reakci se jako rozpouštědlo velice osvědčil aceton.

Za uvedených podmínek bylo ve většině případů dosahováno 80 až 90 % celkových výtěžků chráněných nukleosidů. Po zásadním zlepšení cyklizace použitím silylačních činidel představuje tento postup nejefektivnější variantu isokyanátové metody pro přípravu 5-azacytosinových nukleosidů. Také ve srovnání s přímou glykosylací jsou ve většině případů dosahované výtěžky vyšší. S přihlédnutím k tomu, že zde odpadá příprava silylovaných 5-azacytosinů je tento postup také kratší než přímá glykosylace.

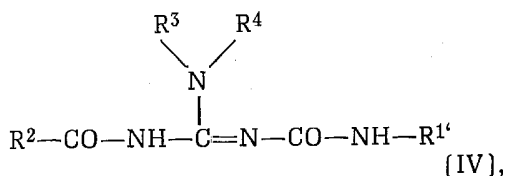
Podstatou předmětného vynálezu, tj. způsobu přípravy 5-azacytosinových nukleosidů obecného vzorce I spočívá v tom, že se roztok chráněného glykosylisokyanátu obecného vzorce II



kde R^1 je chráněný glykosyl v inertním aprotickém rozpouštědle, přidává k míchané směsi acylguanidinu obecného vzorce III



kde R^2 , R^3 a R^4 značí totéž co ve vzorci I, v inertním aprotickém rozpouštědle a získaná chráněná N-acylamidino-N'-glykosylmočovina obecného vzorce IV



kde

R^1 chráněný glykosyl a R^2 , R^3 a R^4 značí totéž co ve vzorci I, se podrobí cyklizaci v inertním aprotickém rozpouštědle působením nadbytku bis(trialkylsilyl)amidů, kde alkyl má 1 až 6 atomů uhlíku nebo směsi halogentrialkylsilanu a trialkylaminu, kde

alkyly těchto složek mají 1 až 6 atomů uhlíku, v níž převládá trialkylamin, za vzniku sloučeniny obecného vzorce I, kde R^1 je chráněný glykosyl a R^2 , R^3 a R^4 mají výše uvedený význam, která se případně převede známým způsobem na volný 5-azacytosinový nukleosid obecného vzorce I, kde R^1 značí volný glykosyl a R^2 , R^3 a R^4 mají výše uvedený význam.

Adice isokyanátu obecného vzorce II na acylguanidin obecného vzorce III se provádí v inertních aprotických rozpouštědlech jako je aceton, benzen, 1,2-dichlorethan, chloroform, acetonitril, dimethylformamid, dimethylsulfoxid a podobně. Reakce probíhá velmi rychle již při teplotě místnosti a je ukončena během několika minut. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití acetonu jako rozpouštědla. Reakce se v zásadě provádí v ekvimolárních poměrech obou složek, avšak u málo rozpustných acylguanidinů jako je formyl nebo acetylguanidin je vhodné použít menšího nadbytku acylguanidinu a nezreagovaný materiál po skončení reakce odstranit filtrací. Většina vznikajících chráněných N-acylamidino- N^4 -glykosylmočovín nejeví sklon ke krystalizaci a získávají se ve formě tenkých pěn, které po případném chromatografickém přečištění na sloupci silikagelu jsou analyticky čisté i chromatograficky čisté. Z preparativního hlediska však nemá izolace těchto meziproductů žádný význam, a proto se cyklizace provádí bez izolace těchto látek, což značně zkracuje celý postup. Cyklizace acylamidinomočovín se provádí také v inertním aprotickém rozpouštědle, které může v jednotlivých případech být shodné s rozpouštědlem použitým v předchozím stupni syntézy a tudíž se dá celý postup provést v jedné baňce. Cyklizace probíhá velmi dobře v rozpouštědlech s vysokou dielektrickou konstatou jako je acetonitril. Překvapivě příznivý účinek silylačních činidel spočívá pravděpodobně v aktivaci acylového karbonylu acylamidinomočovín obecného vzorce III tvorbou silyloxyalkylenderivátů, které zřejmě podléhají snadněji cyklizaci než acylamidinomočoviny. Dalším příznivým faktorem je skutečnost, že za silylačních podmínek je vznikající voda (případně trialkylsilanol) převáděna velmi rychle na inertní hexaalkyldisiloxan. Cyklizaci může dále usnadňovat předchozí silylace lineárního intermediátu na některém z atomů dusíku. Tato možnost je zejména pravděpodobná u acylamidinomočovín obecného vzorce III, kde R^3 a R^4 znamenají vodík. V těchto případech se totiž získají chráněné 5-azacytosinové nukleosidy ve formě N^4 -silylderivátů, které jsou dobře rozpustné v alkoholu, v němž dochází poměrně rychle k odštěpování silylových skupin a vznikající nesilylovaný chráněný nukleosid se vylučuje zpravidla v čisté krystalické formě. Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo při použití 6 ekvivalentů silylačního činidla při teplo-

tě 0 až 50 °C, s výhodou při teplotě místnosti. Větší nadbytek již nevedl k zlepšení výsledků. Při použití menšího nadbytku silylačního činidla neprobíhá cyklizace do konce. Preferovanými silylačními činidly jsou bis(trimethylsilyl)acetamid, bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid nebo směs chlorotrimethylsilanu a triethylaminu v poměru 1:1,1. Odstraňování chránicích skupin se provádí obvyklými postupy. Pro přípravu 5-azacytosinových nukleosidů je výhodnější používat acylových skupin k chránění hydroxylů, jelikož tyto se dají dobře odstraňovat alkoholýzou, přednostně methanolýzou bez podstatného rozkladu triazinové části molekuly. Amonolýza je méně vhodná, protože při ní v některých případech dochází k částečnému rozevření triazinového jádra. Benzylové chránicí skupiny jsou podstatně méně vhodné, neboť při jejich odstraňování je napadána silně také triazinová část molekuly.

V dalším je vynález blíže objasněn v příkladech provedení, aniž se na tyto jakkoliv omezuje.

Příklad 1

Příprava 2',3',5'-tri-O-benzoyl-5-azacytidinu.

Roztok surového 2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribosylisokyanátu (připravený známým postupem z 1,01 g 1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribosy) v 5 ml suchého acetonu se během 30 minut přikape k intenzivně magneticky míchané směsi 0,174 g formylguanidinu v 10 ml suchého acetonu za vyloučení vnější vlhkosti při teplotě místnosti. Směs se ještě 30 minut míchá při teplotě místnosti a nepatrná část nerozpuštěného formylguanidinu se odfiltruje. Filtrát se odpaří ve vakuu při 40 °C (teplota lázně) a zbytek se rozpustí ve 20 ml suchého acetonitrilu. K roztoku se pak za vnějšího chlazení ledovou vodou přidá postupně 1,5 ml chlortrimethylsilanu a 1,5 ml triethylaminu. Směs se ponechá za nepřístupu vnější vlhkosti 1 h při teplotě místnosti. Pak se zředí 50 ml benzenem, málo rozpustný triethylamoniumchlorid, který se bohatě vylučuje ze směsi ihned po přidání triethylaminu se odsaje, promyje důkladně benzenem a filtrát se odpaří ve vakuu. Zbytek se suší asi hodinu ve vakuu vodní vývěvy při teplotě místnosti. Zbytek se rozpustí v 5 ml ethanolu a roztok se ponechá přes noc krystalovat. Získá se 0,9 g, tj. 81 % 2',3',5'-tri-O-benzoyl-5-azacytidinu; t. t. 182 až 184 °C (rozklad).

Příklad 2

Surový meziproduct připravený dle příkladu 1 adicí isokyanátu na formylguanidin

se rozpustí ve 20 ml acetonitrilu a k roztoku se přidají 3 ml bis(trimethylsilyl)-

acetamidu. Směs se ponechá v uzavřené baňce 1 hodinu při teplotě místnosti a pak se odpaří ve vakuu při 40 °C (teplota lázně), zbytek se vysuší ve vakuu vodní vývěvy při teplotě místnosti, rozpustí v 5 ml ethanolu a nechá přes noc krystalovat. Získá se 1,0 g, tj. 90 % 2',3',5'-tri-O-benzoyl-5-azacytidinu; t. t. 182 až 184 °C (rozklad). Stejného výtěžku bylo dosaženo při použití 3,5 ml bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidu za jinak stejných podmínek.

Příklad 3

Příprava 2',3',5'-tri-O-benzoyl-6-methyl-5-azacytidinu

Reakcí surového 2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribosylisokyanátu s 0,2 g acetylguanidinu se postupem dle příkladu 1 získá 0,91 g, tj. 80 % 2',3',5'-tri-O-benzoyl-6-methyl-5-azacytidinu; t. t. 234 až 237 °C (rozklad).

Příklad 4

Příprava 3',5'-di-O-p-toluoyl-2'-deoxy-5-azacytidinu a jeho α -D-anomeru

Reakcí surové směsi anomerů 2-deoxy-3,5-di-O-toluoyl-D-erythro-pentosylisokyanátu (připravené známým postupem z 1,94 gramu odpovídající halogenózy) s formylguanidinem (0,435 g) se postupem dle příkladu 2 získá 2,14 g, tj. 92 % směsi 3',5'-di-O-p-toluoyl-2'-deoxy-5-azacytidinu a jeho α -D-anomeru.

Příklad 5

Příprava 2',3',5'-tri-O-benzoyl-6-fenyl-5-azacytidinu

Reakcí 1 g surového 2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribosylisokyanátu s 0,326 g benzoylguanidinu v 10 ml acetonu a následnou cyklizací v 15 ml acetonitrilu působením 3,5 mililitru N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidu při teplotě místnosti po dobu 24 h se získá krystalizací z 10 ml ethanolu 1,05 g (80 %) 2',3',5'-tri-O-benzoyl-6-fenyl-5-azacytidinu, t. t. 116 až 119 °C.

Příklad 6

Příprava 2',3',5'-tri-O-benzoyl-6-benzyl-5-azacytidinu

Reakcí 1 g surového 2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribosylisokyanátu s 0,345 g fenylacetylguanidinu v 10 ml acetonu a následnou cyklizací v 10 ml acetonitrilu působením směsi 1,6 ml chlortrimethylsilanu a 1,6 ml triethylaminu při teplotě místnosti po dobu 45 minut se získá krystalizací ze 4 ml ethanolu 1,06 g (80 %) 2',3',5'-tri-O-benzoyl-6-benzyl-5-azacytidinu, t. t. 218 až 222 °C (rozklad).

Příklad 7

Příprava 2',3',5'-tri-O-benzoyl-6-chlormethyl-5-azacytidinu

Reakcí 1 g surového 2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribosylisokyanátu s 0,271 g chloracetylguanidinu v 10 ml acetonu a následnou cyklizací v 10 ml acetonitrilu působením směsi 1,6 ml chlortrimethylsilanu a 1,6 ml triethylaminu po dobu 40 minut při teplotě místnosti se postupem dle příkladu 1 získá 1,01 g (84 %) 2',3',5'-tri-O-benzoyl-6-chlormethyl-5-azacytidinu, t. t. 206 až 210 °C (rozklad) (ethanol). Rekrytalizací ze směsi methanol-1,2-dichlorethan se teplota tání zvýší na 218 až 220 °C (rozklad).

Příklad 8

Příprava 2',3',5'-tri-O-benzoyl-N⁴,N⁴-dimethyl-5-azacytidinu

Reakcí 1 g surového 2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribosylisokyanátu se surovým N-formyl-N⁴,N⁴-dimethylguanidinem (připraven obvyklým postupem ze 2 mmolů dimethylguanidinu a 2 mmolů mravenčanu ethylnatého) v 10 ml acetonu a následnou cyklizací v 10 ml acetonitrilu působením 3,0 ml N,O-bis(trimethylsilyl)acetamidu se po chromatografickém zpracování na sloupci silikagelu a krystalizací z ethanolu získá 0,21 g (18 %) 2',3',5'-tri-O-benzoyl-N⁴,N⁴-dimethyl-5-azacytidinu, t. t. 218 až 220 °C (rozklad).

Příklad 9

Příprava 6-methyl-3',5'-di-O-p-toluoyl-2'-deoxy-5-azacytidinu a jeho α -D-anomeru

Reakcí 2 g surového 3,5-di-O-p-toluoyl-2-deoxy-D-erythro-pentosylisokyanátu s 0,5 gramu acetylguanidinu se postupem dle příkladu 2 získá 2,1 g (88 %) surové směsi 2'-deoxy-6-methyl-3',5'-di-O-p-toluoyl-5-azacytidinu a jeho α -D-anomeru. Chromatografií na sloupci silikagelu ve směsi chloroform-methanol se získá čistý β -anomer, t. t. 199 až 201 °C (rozklad) (acetonitril) a čistý α -anomer, t. t. 228 až 231 °C (rozklad) (1,2-dichlorethan-methanol).

Příklad 10

Příprava 6-methyl-5-azacytidinu

Směs 0,571 g 2',3',5'-tri-O-benzoyl-6-methyl-5-azacytidinu, 5 ml methanolu a 0,2 ml roztoku 1M-Na-OCH₃ v methanolu se magneticky míchá v uzavřené baňce přes noc při teplotě místnosti. Po okyselení ledovou kyselinou octovou se produkt odsaje a promyje methanolem. Získá se 0,240 g (93 %) 6-methyl-5-azacytidinu, t. t. 142 až 147 °C (rozklad).

Příklad 11

Příprava 2'-deoxy-6-methyl-5-azacytidinu

Postupem dle příkladu 10 se z 0,478 g 2'-deoxy-6-methyl-3',5'-di-O-p-toluoyl-5-azacytidinu získá 0,21 g (87 %) 2'-deoxy-6-methyl-5-azacytidinu, t. t. 190 až 195 °C (rozklad).

Příklad 12

Příprava 6-benzyl-5-azacytidinu

Postupem dle příkladu 10 se z 0,647 g 2',3',5'-tri-O-benzoyl-6-benzyl-5-azacytidinu získá krystalizací z ethanolu 0,25 g (75 %) 6-benzyl-5-azacytidinu; t. t. 206 až 208 °C (rozklad).

Příklad 13

Příprava 6-fenyl-5-azacytidinu

Postupem dle příkladu 10 se z 0,633 g 2',3',5'-tri-O-benzoyl-6-fenyl-5-azacytidinu získá po dekarboxylizaci pomocí slabě kyselého iontoměniče a krystalizací z isopropylalkoholu 0,23 g (71 %) 6-fenyl-5-azacytidinu, t. t. 200 až 201 °C (rozklad).

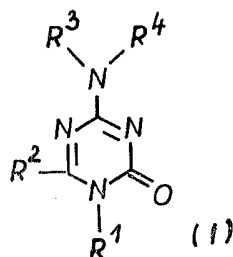
Příklad 14

Příprava 1-(2-deoxy- α -D-erythro-pentofuranosyl)-6-methyl-5-azacytosinu

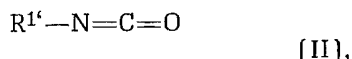
Postupem dle příkladu 10 se z 0,478 g 1-(3,5-di-O-p-toluoyl-2-deoxy- α -D-erythro-pentofuranosyl)-6-methyl-5-azacytosinu získá 0,17 g (70 %) 1-(2-deoxy- α -D-erythro-pentofuranosyl)-6-methyl-5-azacytosinu, t. t. 182 až 185 °C (rozklad) (methanol).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

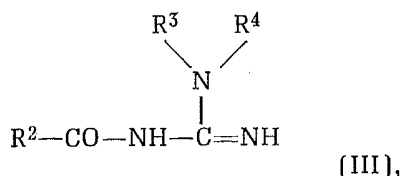
1. Způsob přípravy 5-azacytosinových nukleosidů obecného vzorce I



kde R¹ značí volný nebo chráněný glykosyl, R² vodík, alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku, halogenalkyl s 1 až 6 atomy uhlíku, aralkyl se 7 až 12 atomy uhlíku, fenyl, R³ a R⁴ stejné nebo různé značí atomy vodíku, alkyly s 1 až 6 atomy uhlíku nebo aralkyly se 7 až 12 atomy uhlíku, vyznačený tím, že se roztok chráněného glykosylisokyanátu obecného vzorce II

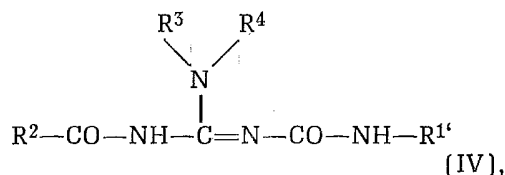


kde R¹ je chráněný glykosyl v inertním aprotickém rozpouštědle, přidává k míchané směsi acylguanidinu obecného vzorce III



kde R², R³ a R⁴ značí totéž co ve vzorci I,

v inertním aprotickém rozpouštědle a získaná chráněná N-acylamidino-N'-glykosylmochovina obecného vzorce IV



kde R¹' je chráněný glykosyl a R², R³ a R⁴ značí totéž co ve vzorci I, se podrobí cyklizaci v inertním aprotickém rozpouštědle působením nadbytku bis(trialkylsilyl)amidů, kde alkyl má 1 až 6 atomů uhlíku, nebo směsi halogentrialkylsilanu a trialkylaminu, kde alkyly těchto složek mají 1 až 6 atomů uhlíku, v níž převládá trialkylamin, za vzniku sloučeniny obecného vzorce I, kde R¹ je chráněný glykosyl a R², R³ a R⁴ mají výše uvedený význam, která se případně převede známým způsobem na volný 5-azacytosinový nukleosid obecného vzorce I, kde R¹ značí volný glykosyl a R², R³ a R⁴ mají výše uvedený význam.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se jako inertního rozpouštědla pro adici chráněných glykosylisokyanátů s acylguanidiny používá acetonu.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se cyklizace provádí v acetonitrilu působením 6 ekvivalentů silylačního činidla při teplotách 0 až 50 °C.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se jako silylačního činidla používá bis(trimethylsilyl)acetamidu nebo bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu nebo směsi chlortrimethylsilanu a triethylaminu v poměru 1:1,1.