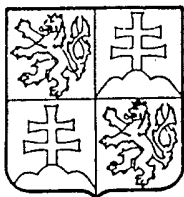


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU 270 067

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(21) PV 5245-88.T
(22) Přihlášeno 21 07 88

(40) Zveřejněno 13 10 89
(45) Vydáno 27 02 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 07 F 9/65

(75)

Autor vynálezu

HOLÝ ANTONÍN RNDr. Dr Sc.,
ROSENBERG IVAN ing. CSc., PRAHA,
GELBIČ IVAN RNDr. CSc., ČESKÉ BUDĚJOVICE

(54)

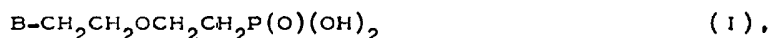
N-[2-(2-Fosfonylethoxy)ethyl] deriváty hetero-
cyklických bází a způsoby jejich přípravy

(57) Předmětem řešení jsou N-[2-(2-fosfonyl-ethoxy)ethyl]deriváty purinových a pyrimidinových heterocyklických bází a způsoby jejich chemické syntézy. Tyto látky patří do oboru biochemikálií a látek s využitelným biologickým účinkem. Tato nová skupina látek ze skupiny acyklických analogů nukleotidů se připraví reakcí sodné soli příslušné heterocyklické báze s dialkylestery kyseliny 2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonové. Intermediárně vzniklé diethylestery se převedou na výsledné produkty buď přímo reakcí s halogentrimethylsilanem nebo se nejprve parciálně hydrolyzují alkalickými hydroxidy na monoethylestery, poskytující předmětné látky rovněž reakcí s halogentrimethylsilanem.

Předmětem vynálezu jsou N-[2-(2-fosfonylethoxy)ethyl]deriváty heterocyklických bází a způsoby jejich přípravy.

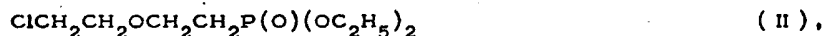
Mezi skupinou N-fosfonylalkoxyalkylderivátů heterocyklických bází jsou četné významné látky s možnostmi praktického použití. Tak např. N-(2-fosfonylmethoxyethyl)deriváty purinových bází (adeninu, 2,6-diaminopurinu a guaninu) jsou významná virostatika (čs. autorská osvědčení č. 263951, č. 263952 a 264222) se specifickým účinkem proti DNA virům. O-Fosfonylmethylethery 9-(2,3-dihydroxypropy)adeninu mají také chemosterilizační účinek na některé druhy hmyzu (autorské osvědčení č. 230341). Všechny dosud zmíněné látky obsahují charakteristickou fosforylmethoxylovou funkční skupinu $(-\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2)$.

Podstatou vynálezu jsou nové látky, N-[2-(2-fosfonylethoxy)-ethyl]deriváty heterocyklických bází obecného vzorce I

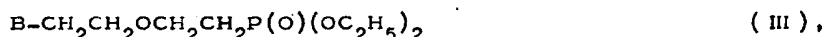


kde B je zbytek purin-9-ylový nebo purin-7-ylový, substituovaný v poloze 6 hydroxy-, amino-, methylthioskupinou nebo atomem chloru a v poloze 2 atomem vodíku nebo aminoskupinou, či zbytek uracil-1-ylový nebo cytosin-1-ylový.

Dále je předmětem vynálezu způsob přípravy látek vzorce I, spočívající v tom, že se sodná sůl připravená reakcí heterocyklické báze buď samotné nebo chráněné acylací, s výhodou benzylací, aminoskupin nebo O-alkylací, s výhodou methylací, hydroxyskupin, s ekvimolárním množstvím hydridu sodného v aprotickém rozpouštědle, s výhodou v dimethylformamidu, uvede v témže rozpouštědle při teplotách 20 °C až 140 °C do reakce s jedním až třemi molárními ekvivalenty diethylesteru kyseliny 2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonové vzorce II



vzniklý meziprodukt obecného vzorce III



kde B má stejný význam jako ve vzorci I,

se izoluje krystalizací nebo s výhodou chromatografií na sílikagelu, uvede do reakce s bromtrimethyl silanem v aprotickém rozpouštědle, s výhodou v dimethylformamidu, acetonitrilu nebo chlorovaných uhlovodících, a to při teplotě 20 °C až 40 °C, po odpaření rozpouštědla se směs rozloží vodou a produkt obecného vzorce I se izoluje s výhodou chromatografií na ionexu nebo hydrofobizovaném sílikagelu.

Dále je předmětem vynálezu způsob přípravy látek obecného vzorce I, spočívající v tom, že se látky obecného vzorce III uvedou do reakce s 0,5 až 2 M roztokem hydroxidů alkalických ve vodě nebo jejich směsích s methanolem, ethanolom nebo dioxanem s obsahem nejméně 50 objemových procent vody, a to při teplotách 20 °C až 100 °C, směs se neutralizuje minerální nebo organickou kyselinou, nebo s výhodou katexem v kyselé formě a monoestery obecného vzorce IV



kde B má stejný význam jako ve vzorci I,

izolované ionexovou chromatografií se uvedou do reakce s bromtrimethylsilanem za výše uvedených podmínek a látky obecného vzorce I se izolují způsobem uvedeným výše.

Klíčovou sloučeninou pro postup přípravy látek obecného vzorce I podle vynálezu je diethylester fosfonové kyseliny vzorce II. Tato látka se s výhodou připraví reakcí triethylfosfitu s přebytečným bis(2-chlorethyl)etherem za teploty varu směsi a s oddestilováváním vznikajícího ethylchloridu. Tato látka byla také popsána v literatuře (L. Marier, M. M. Crutchfield, Phosphorus Sulfur 5, 45 (1978)). Po skončení reakce se diester II izoluje frakční destilací ve vakuu. Je dostatečně stálý a může být uchováván při teplotě místnosti.

Heterocyklická báze se pro reakci používá ve formě sodné soli, kterou lze připravit s výhodou přímo ze suspenze báze v příslušném rozpouštědle (nejlépe dimethylformamidu) přidáním jednoho molárního ekvivalentu hydridu sodného (lze použít přímo komerční 50 až 60 % disperzi hydridu sodného v parafínu). Ve většině případů se báze použije bez předchozí úpravy; ve zvláštních případech (např. pro zvýšení rozpustnosti nebo tehdy, může-li docházet při reakci ke vzniku více možných N-isomerů) se doporučuje použít heterocyklické báze vhodně substituované chránicemi skupinami nebo báze jinak modifikované, která po provedení reakce může další chemickou reakcí buď vzniklého meziproductu nebo příslušné látky vzorce I poskytnout konečný produkt žádané struktury. Tak např. deriváty adeninu nebo 6-methylthiopurin poskytují v dimethylformamidu za těchto podmínek téměř výhradně N(9)-isomery látek vzorce I a příslušné báze mohou být použity přímo; hypoxanthin však dává přednostně N(7)-isomer, takže jeho N(9)-substituovaný derivát vzorce I se nejnázve připraví deaminací adeninového fosfonátu vzorce I kyselinou dusitou nebo jejím esterem. Cytosin a jeho 5-substituované deriváty mohou být sice pro reakci s látkou vzorce II použity přímo, ale výhodnější se jeví např. předchozí benzoylace 4-aminoskupiny. U uracilu a thyminu, případně dalších 4-oxypyrimidinových bází dochází za výše uvedených podmínek ke vzniku směsi N(1)- a N(3)-isomerů látky I. Pro přípravu N(1)-isomerů těchto bází je proto výhodné použít k reakci s látkou II sodných solí příslušných 4-methoxy-2-pyrimidonů, které jsou snadno dostupné a po izolaci příslušného produktu vzorce I lze odštěpit chránici 4-O-methylskupinu kyselinou hydrolyzou. Rovněž u guaninu je použití samotné báze či jejího N²-acetylderivátu nevhodné nejen proto, že je výtěžek látky vzorce III (B-guanin-9-yl) celkově nízký, ale především proto, že při reakci vzniká směs N(9)- a N(7)-isomeru látek vzorce III. Mnohem účelnější je použít místo guaninu sodné soli 2-amino-6-chlorpurinu; v tomto případě probíhá alkylace látkou vzorce II přednostně do polohy N(9) a vzniklý diester vzorce III (B=2-amino-6-chlorpurin-9-yl) lze snadno hydrolyzou zředěnou kyselinou (např. kyselinou chlorovodíkovou) a následující reakcí s bromtrimethylsilanem převést na guaninový derivát vzorce I (B-guanin-9-yl).

Po provedení kondenzace a odpaření dimethylformamidu ve vakuu lze surový produkt vzorce III snadno extrahovat např. chloroformem a v některých případech získat v čistém stavu přímou krystalizací, např. z methanolu. Ve všech případech se dá použít chromatografie na sílícím gelu. Meziproduct vzorce III je obvykle krystalický, dobře charakterizovatelný jak UV-spektrém, NMR-spektrém, tak i teplotou tání. Jeho výtěžky se pohybují kolem 50 %, v některých případech jsou vyšší. Zvýšení výtěžku lze někdy dosáhnout použitím přebytku činidla II, zvláště v těch případech, kdy reakce probíhá pomalu a může být doprovázena částečným rozkladem látky vzorce II (eliminací chlorovodíku).

Při použití dimethylesteru obdobného látky vzorce II v postupu přípravy látek vzorce I uvedeným způsobem může docházet ke vzniku N-methylderivátů příslušné heterocyklické báze. Proto je vždy výhodnější užívat pro tuto reakci diethylester vzorce II. Reakce není ovšem omezena pouze na tuto látku; stejně mohou být připraveny i jiné dialkyl- nebo aralkylestery vzorce III z odpovídajících synthonů vzorce II.

Štěpení ethylesterových vazeb v látkách vzorce III se nejvýhodněji provede reakcí s bromtrimethylsilanem (A. Holý, I. Rosenberg, Collect. Czech. Chem. Commun. 47, 3447 (1982)). Tuto reakci je možné provádět v chloroformu, dichlormethanu nebo dalších chlorovaných uhlovodících nebo v dimethylformamidu, ale jako prakticky nejvhodnější vzhledem k chemickému charakteru,

rozpouštěcím vlastnostem a teplotě varu se jeví acetonitril. Pro reakci se používá slabého přebytku činidla (cca 20 %) a provádí se při teplotě místnosti. Po odpaření rozpouštědla ve vakuu a odstranění přebytku činidla k destilací s acetonitrilem nebo jiným inertním rozpouštědlem se zbytek rozloží vodou (s výhodou v přítomnosti amoniaku nebo těžkého pufru, např. triethylamoniumhydrogenkarbonátu). Získá se příslušná sůl látky obecného vzorce I, kontaminovaná bromidem. Odsolení a purifikace látky vzorce I se nejvhodněji provede ionexovou chromatografií buď přímo na anexi nebo postupnou chromatografií na katexu a anexu (postup je určen vlastnostmi heterocyklické báze v látce vzorce I). Proveďte-li se konečná chromatografie např. na anexu v acetátové formě a látka vzorce I se eluuje kyselinou octovou, získá se po odpaření eluátu produkt ve formě kyseliny, který je možno v řadě případů čistit dodatečnou krystalizací z vody. V ostatních případech, kdy se po chromatografii získá látka vzorce I ve formě soli (např. amonné nebo triethylamonné), je-li vhodné převést na alkalickou (sodnou, lithnou) sůl nejlépe chromatografií na katexu v příslušném cyklu. Tyto soli se získají srážením koncentrovaných vodných roztoků acetonem nebo ethanolem a jsou při uchovávání zcela stálé. Dostatečně stálé jsou i látky vzorce I ve formě volných krystalických kyselin (obvykle tvoří hydráty), pokud vlivem kyselosti nedochází k chemickým změnám na heterocyklické bázi látek vzorce I.

Ke stejnému účelu lze místo bromtrimethylsilanu užít i jodtrimethylsilan za zcela analogických podmínek provedení reakce i zpracování. Z praktických důvodů (cena a dostupnost jodderivátu) však tato varianta není výhodná.

Hydrolyza jedné z esterových vazeb může být provedena i v alkalickém prostředí. Za těchto podmínek, tj. reakcí látek vzorce III ve vodném hydroxidu alkalickém nebo jeho směsích s ethanolem, methanolem, dioxanem apod. při teplotě místnosti nebo zvýšené teplotě se však odštěpuje pouze jedna z obou esterových funkcí, takže produktem reakce je látka obecného vzorce IV.

Tato cesta má své opodstatnění v těch případech, kdy látka obecného vzorce III obsahuje acylové (např. benzoylové) chránicí skupiny, které se touto reakcí současně odštěpí. Látky vzorce IV však již nelze dobře izolovat chromatografií na silikagelu a k jejich čištění je zapotřebí použít ionexové chromatografie za obdobných podmínek jako je uvedeno u čištění látek obecného vzorce I. Pro odštěpení zbývajících esterově vázaných skupin je nutné provést reakci s bromtrimethylsilanem stejně, jak je popsáno výše. Před reakcí je třeba látku vzorce IV dobře vysušit. I v tomto případě je třeba použít nadbytek (20 až 25 %) činidla k dosažení úplné konverze.

Na rozdíl od N-(2-fosfonylmethoxyethyl)derivátů, z nichž mnohé mají protivirový účinek (čs. autorská osvědčení č. 263951 a č. 264222), neprojevují látky obecného vzorce I žádnou významnou účinnost proti virům. Mohou však najít uplatnění např. jako chemosterilanty hmyzu. Při perorálním podání zředěných vodných roztoků látek obecného vzorce I ad libitum např. některým druhům ploščic (*Pyrrhocoris apterus* L.), a to jak nymfám posledního instaru, tak i dospělým, dojde v závislosti na koncentraci látky k výraznému snížení počtu vykladených vajíček, až k úplné zástavě kladení a současně k výraznému omezení až úplnému poškození jejich líhňivosti. Tento účinek je závislý na struktuře látek vzorce I (charakteru heterocyklické báze) a je odlišitelný od prosté toxicity. Přehled tohoto účinku je uveden v tabulce 1. Chemosterilační účinek u tohoto druhu hmyzu byl nalezen rovněž u látek formálně obdobných sloučeninám obecného vzorce I, tj. fosfonylmethyletherům glycerolu a 9-(2,3-dihydroxypropyl)adeninu (čs. autorské osvědčení č. 233626). Uvedený účinek u látek obecného vzorce I však není v žádném ohledu předvídatelný, protože látky vzorce I se od výše uvedené skupiny zásadně liší jak přítomností charakteristické fosfonylmethyletherové funkce, tak především tím, že neobsahují asymetrický uhlíkový atom, jehož přítomnost je nezbytná pro vyvolání biologických účinků u fosfonylmethylderivátů.

Významnou vlastností látek obecného vzorce I je jejich stálost chemická i biologická. Vazba fosfonové kyseliny je neodštěpitelná běžnými enzymy, degradujícími např. monoestery kyselin fosforečné, a je stálá vůči působení zředěných organických a minerálních kyselin, i proti amoniaku, aminům a zředěným vodným louhům.

V dalším je vynález osvětlen příklady způsobů provedení výroby a použití látek obecného vzorce I, aniž se tím jakkoli omezuje.

Příklad 1

Směs bis(2-chlorethyl)etheru (60 ml) a triethylfosfitu (18 ml) se zahřívá 10 h při 160 °C v 250 ml baňce, rozpustí v 100 ml benzenu a vnese na sloupec 500 g silikagelu. Sloupec se eluuje směsí benzen-ethanol (99 : 1) a jednotlivé frakce (po 30 ml) se testují chromatografií na destičkách silikagelu v benzenu. Frakce obsahující produkt (detekce postřikem p-nitrobenzylpyridiniumbromidu a následujícím vystavením parám amoniaku) se spojí, odpaří ve vakuu a suší při 13 Pa nad oxidem fosforečným. Získá se 52 % diethylesteru kyseliny 2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonové jako bezbarvého oleje. Pro $C_8H_{18}ClO_4P$ (244,7) vypočteno 14,49 % Cl, 12,66 % P; nalezeno 14,30 % Cl, 12,80 % P. Hmotnostní spektrum : 245 ($M^+ + 1$).

Suspenze 13,5 g adeninu a 3,4 g hydridu sodného v 700 ml dimethylformamidu se míchá při 80 °C 1 h za vyloučení vlhkosti, poté se během 2 h přikape roztok 22,5 g diethylesteru kyseliny 2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonové ve 200 ml dimethylformamidu a směs se míchá 12 h při 80 °C za vyloučení přístupu vlhkosti. Poté se směs odpaří při 50 °C/2 kPa a zbytek odpaří za stejných podmínek dvakrát s 200 ml toluenu. Odparek se extrahuje vroucím chloroformem (1 l), filtruje přes vrstvu křemeliny, promyje 200 ml chloroformu a filtrát se zahustí ve vakuu při 30 °C na objem cca 200 ml. Tento roztok se vnese na sloupec 500 g silikagelu (30 až 40) a sloupec se promyje chloroformem (1 l). Elucí směsí chloroformu a methanolu (9 : 1), odpařením spojených frakcí produktu (podle chromatografie na destičkách silikagelu ve směsí chloroform-methanol, 4 : 1; R_F 0,55) a krystalizací odparku z etheru (petrolether do zákalu) se získá 9-[2-(2-diethoxyfosfonylethoxy)ethyl]adenin (III, B=adenin-9-yl) ve výtěžku 19,5 g (62 %). T.l. 60 °C. Pro $C_{13}H_{22}N_5O_4P$ (343,4) vypočteno 45,46 % C, 6,46 % H, 20,40 % N, 9,04 % P; nalezeno 45,10 % C, 6,50 % H, 20,25 % N, 8,93 % P.

Tento produkt se rozpustí v 600 ml acetonitrilu, přidá se 38 ml bromtrimethylsilanu a směs se ponechá stát v uzavřené baňce 24 h při teplotě místnosti. Odpaří se při 40 °C/2 kPa, přidá se 200 ml acetonitrilu a znovu odpaří za týchž podmínek. K odparku se přidá 500 ml 0,4 M vodného roztoku triethylamoniumhydrogenkarbonátu (pH 7,5) a pH roztoku se udržuje přidáváním triethylaminu mezi 8 až 9 do konstantní hodnoty (cca 1 h). Poté se směs odpaří při 40 °C/2 kPa a zbytek za stejných podmínek odpaří s vodou (třikrát po 100 ml). Tento odparek se rozpustí v 300 ml vody a vnese na sloupec 500 ml katexu (např. Dowexu 50 X 8) (H^+ -forma). Sloupec se promývá vodou do poklesu kyselé reakce eluátu a ztráty UV-absorbce při 260 nm. Pak se eluuje 2,5 % vodným amoniakem a jímá se eluát absorbující při 260 nm. Po odpaření ve vakuu se zbytek rozpuštěný v 100 ml vody vnese na sloupec 400 ml středně bazického anexu (např. Sephadexu A-25 (HCO_3^- -forma)). Sloupec se eluuje vodou do poklesu UV-absorbce eluátu při 260 nm a potom gradientem 0 až 0,4 M triethylamoniumhydrogenkarbonátu (pH 7,5) (po 2 l). Průběh eluce se sleduje kontinuálním měřením UV-absorbce při 260 nm. Frakce produktu se odpaří ve vakuu, zbytek se odpaří s vodou (třikrát 100 ml) a v 100 ml vody vnese na sloupec 200 ml katexu (např. Dowexu 50 X 8) (H^+ -forma). Sloupec se eluuje vodou, eluát absorbující při 260 nm se odpaří ve vakuu a ke zbytku rozpuštěnému v 20 ml vody se přidá 200 ml acetonu a 200 ml etheru. Vyloučený produkt se odsaje, promyje etherem (200 ml) a suší při 13 Pa nad oxidem fosforečným. Získá se 17 g (84 %) sodné soli 9-[2-(2-fosfonylethoxy)ethyl]adeninu (I, B=adenin-9-yl). Elektroforetická pohyblivost $E_{Up} = 0,75$ (vztaženo na uridin-3-fosfát) (pH 7,5). Pro $C_9H_{12}N_5O_4PNa_2$ (313,4) vypočteno 21,14 % N, 9,37 % P; nalezeno 20,86 % N, 9,12 % P. UV-Spektrum (pH 2) : max 257,7 nm ($\epsilon_{max} = 11400$). R_F 0,17 (2-propanol-vodný amoniak-voda, 7 : 1 : 2).

Příklad 2

K suspenzi 4,3 g N^4 -benzoylcytosinu v 80 ml dimethylformamidu se přidá 460 mg hydridu sodného a směs se míchá 1 h při 20 °C. Přidá se roztok 6 g diethylesteru kyseliny 2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonové (viz příklad 1) v 20 ml dimethylformamidu a směs se míchá 20 h při 100 °C

pod chlorkalciovým uzávěrem. Výsledný roztok se odpaří při 40 °C/13 Pa dosucha a zbytek se extrahuje 500 ml vroucího chloroformu. Tento extrakt se odpaří dosucha ve vakuu a rozpustí v 200 ml 0,1M methoxidu sodného v methanolu. Roztok se ponechá stát přes noc při 20 °C, neutralizuje přidáním katexu (např. Dowexu 50 X 8) v H⁺-formě, suspenze alkalizuje triethylaminem, odsaje a ionex se promyje 300 ml methanolu. Filtrát se odpaří ve vakuu, odparek rozpustí v 200 ml vody a extrahuje 3 x 50 ml etheru, vodná vrstva se zahustí ve vakuu na poloviční objem a roztok se vnese na sloupec 300 ml katexu (např. Dowexu 50 X 8) (H⁺-forma). Sloupec se eluuje vodou (500 ml) a směsí methanol-voda (3 : 7) do poklesu UV-absorbce při 260 nm na původní hodnotu. Potom se eluuje 2,5% vodným amoniakem a jímá se eluát absorbující při 260 nm. Ten se odpaří ve vakuu, zbytek se odpaří s ethanolem (2x50 ml) a nakonec suší při 20 °C/13 Pa nad oxidem fosforečným 24 h. Získá se 4,2 g (66 %) monoesteru vzorce IV (B=cytosin-1-yl). Elektroforetická pohyblivost E_{Up} (viz příklad 1) 0,10, R_F = 0,34 (TLC, chloroform-methanol, 4 : 1).

K tomuto odparku se přidá 100 ml acetonitrilu a 10 ml bromtrimethylsilanu, směs se ponechá stát 48 h při 20 °C a odpaří ve vakuu. Zbytek se znovu odpaří se 100 ml acetonitrilu, rozpustí v 200 ml 0,4M triethylamoniumhydrogenkarbonátu a po 2 h se odpaří ve vakuu. Odparek se odpaří s methanolem (3x100 ml) a rozpustí v 100 ml vody. Tento roztok se vnese na sloupec 200 ml katexu (např. Dowexu 50 X 8) (H⁺-forma), eluuje vodou do poklesu kyselé reakce eluátu a potom 2,5 % vodným amoniakem. Amoniakální eluát se odpaří dosucha ve vakuu, rozpustí v 50 ml vody, alkalizuje amoniakem a vnese na sloupec 200 ml silně zásadického anexu (např. Dowexu X 2) (acetát). Sloupec se eluuje vodou (500 ml) a pak 1M kyselinou octovou. UV-absorbující kyselý eluát se odpaří dosucha, zbytek kodesťluje vodou ve vakuu (4 x 20 ml), rozpustí v malém množství horké vody, přidá se 5 objemových dílů ethanolu a ether do zákálu. Produkt, který vykřystaluje v lednici, se odsaje, promyje etherem a vysuší při 13 Pa nad oxidem fosforečným. Získá se 2,0 g 1-[2-(2-fosfonylethoxy)ethyl]cytosinu (I, B=cytosin-1-yl). R_F = 0,17 (2-propanol-konc. amoniak-voda, 7 : 1 : 2) E_{Up} = 0,85. T.l. 180 °C. Pro C₈H₁₄N₃O₅P (263,3) vypočteno 36,49 % C, 5,36 % H, 15,96 % N, 11,79 % P; nalezeno 34,46 % C, 6,36 % H, 15,97 % N, 10,57 % P. UV-Spektrum (pH 2) : λ_{max} = 280 nm (ε_{max} = 10000).

Příklad 3

Suspenze 3,0 g 2,6-diaminopurinu a 0,48 g hydridu sodného ve 100 ml dimethylformamidu se míchá 1 h při 100 °C a poté se přidá 6,2 g diethylesteru kyseliny 2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonové (viz příklad 1) v 20 ml dimethylformamidu. Směs se míchá 18 h při 100 °C pod chlorkalciovým uzávěrem a odpaří při 60 °C/13 Pa. Odparek se kodesťluje dvakrát 50 ml toluenu za týchž podmínek a zbytek se extrahuje 200 ml vroucího chloroformu. Suspenze se filtruje přes vrstvu křemelinu a filtrát se odpaří ve vakuu. Zbytek se nanese v 50 ml chloroformu na sloupec 400 ml silikagelu a sloupec se eluuje směsí chloroformu s rostoucí koncentrací methanolu. Produkt III (B=2,6-diaminopurin-9-yl), který se eluuje směsí chloroform-methanol (92,5 : 7,5), se získá odpařením ve vakuu a vysušením ve formě amorfni pěny ve výtěžku 4,6 g (64 %). R_F = 0,40 (TLC na silikagelu, chloroform-methanol, 4 : 1).

Tato látka se rozpustí v 100 ml acetonitrilu, přidá se 10 ml bromtrimethylsilanu a směs se ponechá stát 48 h při teplotě místnosti. Odpaří se při 40 °C/2 kPa, kodesťluje s 50 ml acetonitrilu za stejných podmínek a zbytek se rozpustí v 200 ml 0,4M triethylamoniumhydrogenkarbonátu pH 7,5. Po 30 min se odpaří ve vakuu dosucha a zbytek se odpaří ve vakuu s methanolem (3 x 100 ml). Odparek se v 50 ml vody nanese na sloupec 200 ml katexu (např. Dowexu 50 X 8) (H⁺-forma) a sloupec se vymyje vodou do ztráty kyselé reakce eluátu a UV-absorbce při 260 nm. Pak se sloupec eluuje 2,5 % vodným amoniakem a jímá se UV-absorbující eluát. Po odpaření ve vakuu se surový produkt v 25 ml vody alkalizované amoniakem na p.pH 8,5 nanese na sloupec 200 ml silně zásadického anexu (např. Dowexu 1X2) (acetát) a sloupec se eluuje vodou do poklesu UV-absorbce při 260 nm na původní hodnotu. Ionex se suspenduje v 1 l 2M kyselinu mravenčí a suspenze se uvede za míchání do varu. Za horka se filtruje a ionex

se promyje 1 l vroucí 2M kyseliny mravenčí. Spojené filtráty se odpaří ve vakuu a zbytek se kdestiluje vodou (5 x 100 ml) ve vakuu. Odparek se rozpustí ve vroucí vodě, přidá se 6 objemových dílů ethanolu a ether do vzniku stálého zákalu. V lednici vykřystaluje produkt, který se odsaje, promyje etherem a suší ve vakuu. Výtěžek 3,0 g 9-[2-(2-fosfonylethoxy)ethyl]-2-aminoadenin, netaje do 260 °C. Pro $C_9H_{15}N_6PO_4$ (302,3) vypočteno 35,75 % C, 5,00 % H, 27,80 % N, 10,27 % P; nalezeno 35,46 % C, 4,80 % H, 27,75 % N, 10,34 % P. E_{up} (viz příklad 1) 0,66, R_F 0,07 (PC, 2-propanol-konc. vodný amoniak-voda, 7 : 1 : 2). UV-Spektrum (pH 2) : λ_{max} 256 nm, 287,6 nm; λ_{min} 267,6 nm.

Příklad 4

K roztoku 3,32 g 6-methylthiopurinu v 80 ml dimethylformamidu se přidá 0,48 g hydridu sodného a směs se míchá 1 h při 50 °C. Přidá se 6,4 g diethylsteru 2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonové kyseliny (viz příklad 1) a směs se zahřívá 18 h při 100 °C za vyloučení vlhkosti. Odpaří se při 40 °C/13 Pa, extrahuje 400 ml horkého chloroformu a extrakt se odpaří ve vakuu. Zbytek se nanese na sloupec 400 ml sílikagelu v chloroformu, sloupec se eluuje nejprve chloroformem (1 l) a potom směsí chloroform-methanol, 95 : 5). Frakce produktu (podle TLC ve směsi chloroform-methanol, 9 : 1, R_F = 0,68) se spojí, odpaří ve vakuu a vysuší při 13 Pa nad oxidem fosforečným. Výtěžek amorfni pěny látky III (B=6-methylthiopurin-9-yl) je 4,0 g (53,5 %). Tento produkt se rozpustí v 80 ml acetonitrilu a po přidání bromtrimethylsilanu (8 ml) se směs ponechá stát 48 h při teplotě místnosti. Odpaří se při 40 °C/2 kPa, kdestiluje se za týchž podmínek s 50 ml acetonitrilu a zbytek se rozpustí v 100 ml 0,4M triethylamoniumhydrogenkarbonátu (pH 7,5). Po 30 min stání se odpaří ve vakuu, kdestiluje methanolem (4 x 50 ml) a odparek v 50 ml vody se vnese na sloupec 200 ml katexu (např. Dowexu 50 X 8) (H^+ -forma). Sloupec se eluuje vodou do poklesu kyselé reakce a UV-absorbce eluátu. Pak se sloupec promývá 2,5% vodným amoniakem a jímá se UV-absorbující frakce při 260 nm. Odparek tohoto eluátu se rozpustí v 20 ml vody a vnese na sloupec 100 ml katexu (např. Dowexu 50 X 8) (Na^+ -forma). Sloupec se promývá vodou, UV-absorbující eluát se odpaří ve vakuu na objem cca 10 ml, přidá se 200 ml ethanolu a 200 ml etheru, vyloučený produkt se odsaje, promyje etherem a vysuší při 13 Pa nad oxidem fosforečným. Získá se 2,8 g sodné soli 9-[2-(2-fosfonylethoxy)ethyl]-6-methylthiopurinu (I, B=6-methylthiopurin-9-yl). Netaje do 260 °C. E_{up} (viz příklad 1) = 0,73. Pro $C_{10}H_{13}N_4PO_4SNa_2$ (362,4) vypočteno 33,14 % C, 3,61 % H, 15,47 % N, 8,57 % P, 8,85 % S; nalezeno 33,34 % C, 3,75 % H, 15,44 % N, 8,93 % P, 9,07 % S.

Příklad 5

Směs 2,52 g 4-methoxy-2-pyrimidonu a 0,48 g hydridu sodného v 80 ml dimethylformamidu se míchá 1 h při 20 °C a přidá se roztok 6,2 g diethylsteru 2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonové kyseliny v 20 ml dimethylformamidu. Směs se míchá pod chlorkalciovým uzávěrem 20 h při 100 °C a poté se odpaří při 50 °C/13 Pa dosucha. Zbytek se kdestiluje toluenem (2 x 50 ml) za týchž podmínek a extrahuje vroucím chloroformem (500 ml). Extrakt se odpaří ve vakuu a zbytek chromatografuje na sloupci 300 g sílikagelu chloroformem a poté směsí chloroform-methanol (98 : 2). Odpařením frakcí produktu ve vakuu a vysušením při 13 Pa nad oxidem fosforečným se získá 2,8 g látky III (B=4-methoxy-2-pyrimidon-1-yl) jako bezbarvého oleje, R_F = 0,70 (TLC, chloroform-methanol, 9 : 1). Tento produkt se rozpustí v 60 ml acetonitrilu, přidá se 6 ml bromtrimethylsilanu a směs se ponechá stát 24 h při teplotě místnosti. Odpaří se při 40 °C/2 kPa, zbytek kdestiluje 50 ml acetonitrilu a rozpustí v 100 ml 0,4M triethylamoniumhydrogenkarbonátu pH 7,5. Po 1 h se tento roztok odpaří ve vakuu a kdestiluje methanolem (4 x 50 ml). Odparek se ve 100 ml 80% vodné kyseliny octové vaří pod zpětným chladičem 8 h, odpaří se při 40 °C/2 kPa a kdestiluje vodou (5 x 50 ml) za týchž podmínek. Zbytek se v 20 ml vody vnese na sloupec 150 ml katexu (např. Dowexu 50 X 8) (Li^+ -forma) a sloupec se eluuje vodou. Jímá se frakce eluátu absorbující při 260 nm, odpaří se ve vakuu a zbytek se rozmíchá v 80 ml ethanolu. Přidá se 80 ml acetonu a míchá se 1 h. Produkt se odsaje, promyje etherem a vysuší při 13 Pa nad oxidem fosforečným. Získá se 1,6 g lithné soli 1-[2-(2-fosfonylethoxy)ethyl]uracilu

(I, B=uracil-1-yl), $R_F = 0,21$ (PC, 2-propanol-konc.vodný amoniak-voda, 7 : 1 : 2), $E_{Up} = 0,96$ (viz příklad 1). UV-Spektrum (pH 2) : λ_{max} 260 nm ($\epsilon_{max} = 10000$). Pro $C_8H_{11}N_2O_6PNa_2$ (276,1) vypočteno 34,80 % C, 4,02 % H, 10,15 % N, 11,24 % P; nalezeno 34,52 % C, 4,21 % H, 10,06 % N, 11,20 % P.

Příklad 6

Směs 3,4 g 2-amino-6-chlorpurinu, 5,6 g uhličitanu draselného, 6 g diethylesteru 2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonové kyseliny a 100 ml dimethylformamidu se míchá 30 h při 100 °C a za horka zfiltruje. Sraženina se promyje 50 ml dimethylformamidu a filtrát odpaří při 50 °C/2 kPa. Zbytek se extrahuje vroucím chloroformem (3 x 200 ml), filtrát odpaří při 40 °C/2 kPa a zbytek v 50 ml chloroformu se vnese na sloupec 200 ml silikagelu v chloroformu. Sloupec se promývá chloroformem a průběh eluce se sleduje tenkovrstvou chromatografií na destičkách silikagelu v soustavě chloroform-methanol (9 : 1). Získá se frakce 9-[2-(2-diethoxyfosfonylethoxy)ethyl]-2-amino-6-chlorpurinu ($R_F = 0,40$), která se odpaří a vysuší při 13 Pa nad oxidem fosforečným. Výtěžek 3,2 g (42 %) bezbarvé pěny. Další elucí kolony chloroformem se obdobně získá 1,0 g (13 %) 7-[2-(2-diethoxyfosfonylethoxy)ethyl]-2-amino-6-chlorpurinu ($R_F = 0,28$).

Odparek 9-isomeru (3,2 g) se rozpustí v 30 ml dioxanu, přidá se 30 ml 1M hydroxidu sodného a směs se ponechá stát 24 h při teplotě místnosti. Neutralizuje se přidáním katexu (např. Dowexu 50 X 8) (H^+ -forma), alkalizuje se triethylaminem, zfiltruje, promyje 50 ml vody a odpaří ve vakuu dosucha. Zbytek se zahřívá v refluxu s 80 ml 1M chlorovodíkové kyseliny, neutralizuje vodným amoniakem a odpaří ve vakuu dosucha. Tento odparek v 20 ml vody se vnese na sloupec 200 ml katexu (např. Dowexu 50 X 8) (H^+ -forma) a eluuje se vodou do ztráty kyselé reakce a absorpce eluátu při 260 nm. Pak se sloupec eluuje 2,5% vodným amoniakem a jímá se eluát absorbující při 260 nm. Po odpaření ve vakuu se zbytek vysuší při 13 Pa nad oxidem fosforečným, suspenduje v 60 ml acetonitrilu, přidá se 6 ml bromtrimethylsilanu a směs se ponechá stát 24 h při teplotě místnosti v uzavřené baňce. Směs se odpaří ve vakuu, zbytek se rozpustí ve 100 ml 0,4M triethylamoniumhydrogenkarbonátu, odpaří se ve vakuu a kodesťluje methanolem (4 x 50 ml). Tento zbytek se v 25 ml vody nanese na sloupec 200 ml slabě bazického aneksu (např. Sephadexu A-25) (HCO_3^- -forma) a eluuje se vodou do poklesu UV-absorbce eluátu při 260 nm. Pak se sloupec eluuje lineárním gradientem triethylamoniumhydrogenkarbonátu, pH 7,5 (0 až 0,3M po 1 l), a jímá se hlavní frakce eluátu, absorbující při 260 nm (eluuje se při 0,15 až 0,25M). Po odpaření ve vakuu se zbytek kodesťluje methanolem (5 x 50 ml), rozpustí ve vodě a vnese na sloupec 50 ml katexu (např. Dowexu 50 X 8) (Na^+ -forma). Eluuje se vodou, jímá se eluát absorbující při 260 nm a odpaří se ve vakuu. Zbytek se kodesťluje ethanolem (2 x 50 ml) a sráží z methanolu (10 ml) etherem (200 ml). Odsaje se, promyje etherem a suší ve vakuu. Získá se 1,4 g sodné soli 9-[2-(2-fosfonylethoxy)ethyl]guaninu (I, B=guanin-9-yl), $E_{Up} = 0,86$, $R_F = 0,09$ (papír.chromatografie v soustavě 2-propanol-konc. amoniak-voda, 7 : 1 : 2). Pro $C_9H_{12}N_5O_5PNa_2$ (347,3) vypočteno 31,12 % C, 3,48 % H, 20,17 % N, 8,94 % P; nalezeno 31,30 % C, 3,76 % H, 19,82 % N, 8,79 % P.

Stejným způsobem byl z 1,0 g 7-isomeru (viz výše) připraven ve formě sodné soli 7-[2-(2-fosfonylethoxy)ethyl]guanin (I, B= guanin-7-yl). Výtěžek 0,36 g, E_{Up} a R_F hodnoty jsou stejné jako u 9-isomeru. Pro $C_9H_{12}N_5O_5Na_2$ (347,3) vypočteno 31,12 % C, 3,48 % H, 20,17 % N, 8,94 % P; nalezeno 30,85 % C, 3,61 % H, 20,06 % N, 8,82 % P.

Příklad 7

K roztoku 1,0 g sodné soli 9- 2-(2-fosfonylethoxy)ethyl -adeninu v 50 ml 80% vodné kyseliny octové se přidá 4 ml 3-methylbutylnitritu a směs se míchá přes noc v uzavřené bance při teplotě místnosti. Odpaří se ve vakuu a zbytek kodesťluje vodou (5 x 25 ml). Zbytek se v 20 ml vody vnese na sloupec 150 ml katexu (např. Dowexu 50 X 8) (H^+ -forma) a sloupec se eluuje vodou. Jímá se frakce produktu absorbující při 260 nm, odpaří se ve vakuu a za horka se rozpustí v právě potřebném množství vody. Přidá se desetnásobný objem ethanolu a ether (stejný objem jako ethanol). V lednici vykřystaluje produkt, který se odsaje, promyje směsí ethanolu a

etheru (1 : 1), etherem a vysuší ve vakuu. Získá se 0,56 g 9- 2-(2-fosfonylethoxy)ethyl hypoxanthinu, $E_{Up} = 0,96$ (viz příklad 1), $R_F = 0,16$ (papírová chromatografie v soustavě 2-propanol-konc. amoniak-voda, 7 : 1 : 2). Pro $C_9H_{13}N_4O_5P$ (288,3) vypočteno 37,50 % C, 4,54 % H, 19,44 % N, 10,77 % P; nalezeno 37,87 % C, 4,85 % H, 19,41 % N, 11,07 % P.

Příklad 8

Stanovení chemosterilačního účinku látek.

Plošnice *Pyrrhocoris apterus* L. byla chována v konstantních podmínkách při teplotě $26 \pm 1^\circ C$ ve fotoperiodě 18 h světla + 6 h tmy a při relativní vlhkosti $75 \pm 10\%$. Jako potrava byla použita lipová semínka a pitná voda. Základní chovy v 0,5 l zavařovacích sklenicích. Pro testy byly odebírány nymfy posledního instaru ve stádiu o až 6 h. Roztoky testovaných látek obecného vzorce I (sodných solí) byly připravovány v pitné vodě a byly podávány v průběhu testu místo pitné vody.

Vlastní test probíhal na Petriho miskách o průměru 12 až 15 cm s pěti páry zvířat nebo na miskách o průměru 6 až 10 cm s jednotlivými páry. Dna misek byla pokryta filtračním papírem, misky obsahovaly pitítko se zkoumaným roztokem látek obecného vzorce I a lipová semínka. U pokusu byla hodnocena toxicita, délka posledního instaru, průběh imaginární ekdyse, zahájení oviposice a množství vykladených vajíček v jednotlivých snůškách. Vykladená vajíčka byla odebírána a umístěna na Petriho misky k inkubaci za výše uvedených podmínek. Líhnivost byla sledována v době líhnutí u kontrolních pokusů, druhý odečet byl prováděn o 5 dnů později (k vyloučení případného prodloužení embryogeneze).

Za uvedených podmínek byla délka posledního instaru kontrolních jedinců průměrně 8 dnů; tato délka nebyla ovlivněna žádnou ze sledovaných látek. Průběh svlékání do dospělce nebyl ovlivněn. Snížení plodnosti a líhnivosti pro jednotlivé látky obecného vzorce I je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1

Působení látek obecného vzorce I (sodné soli) na plodnost plošnice *Pyrrhocoris apterus* L. po kontinuální orální aplikaci na nymfy posledního instaru

Č.	B (koncentrace, %)	Průměrný počet vykladených vajíček na samici	Průměrný počet vyvířelých vajíček na samici	Líhnivost (%)
	Kontrola	166,1 + 14,4	143,9 + 16,1	86,6
1	Adenin-9-yl			
	10^{-5}	0	0	0
	10^{-6}	92,3 + 10,8	42,7 + 7,7	46,3
2	2,6-Diaminopurin-9-yl			
	10^{-8}	0	0	0
3	Guanin-9-yl			
	10^{-6}	0	0	0
	10^{-7}	139,3 + 17,8	121,1 + 15,4	86,9
4	6-Methylthiopurin-9-yl			
	10^{-7}	0	0	0
	10^{-8}	112,8 + 16,4	86,1 + 12,1	76,3
5	Uracil-1-yl			
	10^{-4}	0	0	0
	10^{-5}	93,6 + 15,3	31,5 + 10,5	33,7

6 Cytosin-1-yl

 10^{-4} 10^{-5}

O

112,1 + 11,8

O

79,7 + 14,8

O

71,1

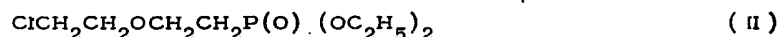
P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. N-[2-(2-Fosfonylethoxy)ethyl]deriváty heterocyklických bází obecného vzorce I

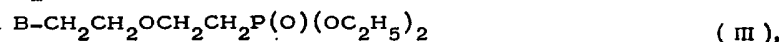


kde B je zbytek purin-9-ylový nebo purin-7-ylový, substituovaný v poloze 6 hydroxy-, amino-, methylthioskupinou nebo atomem chloru a v poloze 2 atomem vodíku nebo aminoskupinou, či zbytek uracil-1-ylový nebo cytosin-1-ylový.

2. Způsob přípravy látek obecného vzorce I podle bodu 1, vyznačený tím, že se sodná sůl připravená reakcí heterocyklické báze buď samotné nebo chráněné acylací, s výhodou benzo-ylací, aminoskupin nebo O-alkylací, s výhodou methylací, hydroxyskupin, s ekvimolárním množstvím hydridu sodného v aprotickém rozpouštědle, s výhodou v dimethylformamidu, uvede v témže rozpouštědle při teplotách 20 °C až 140 °C do reakce s jedním až třemi molárními ekvivalenty diethylesteru kyseliny 2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonové vzorce II



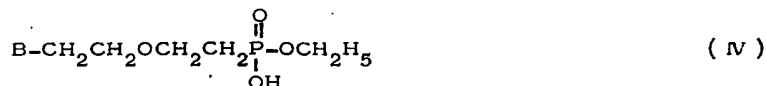
vzniklý meziprodukt obecného vzorce III



kde B má stejný význam jako ve vzorci I,

se izoluje krystalizací nebo s výhodou chromatografií na silikagelu, uvede při teplotě 20 až 40 °C do reakce s bromtrimethylsilanem v aprotickém rozpouštědle, s výhodou v dimethylformamidu, acetonitrilu nebo chlorovaných uhlovodících, po odpaření rozpouštědla se směs rozloží vodou a látka obecného vzorce I se izoluje, s výhodou chromatografií na ionexu nebo hydrofobizovaném silikagelu.

3. Způsob příprav látek obecného vzorce I podle bodu 1, vyznačený tím, že se látky obecného vzorce III podle bodu 2 uvedou do reakce s 0,5 až 2,0M roztokem hydroxidů alkalických ve vodě nebo jejích směsích s methanolem, ethanolem nebo dioxanem s obsahem nejméně 50 objemových procent vody, a to při teplotách 20 °C až 100 °C, směs se neutralizuje minerální nebo organickou kyselinou, nebo s výhodou katexem v kyselé formě, a monoestery obecného vzorce IV



kde B má stejný význam jako ve vzorci I,

izolované ionexovou chromatografií, se uvedou do reakce s bromtrimethylsilanem, a látky obecného vzorce I se dále izolují způsobem podle bodu 2.