



GRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

248005

(11)

(B2)

[51] Int. Cl.⁴
C 07 D 473/18

[22] Přihlášeno 24 02 78

[21] (PV 4396-79)

[32] [31] [33] Právo přednosti od 24 12 77
(53905/77) Velká Británie

[40] Zveřejněno 12 06 86

[45] Vydáno 15 08 88

[72]

Autor vynálezu

SCHAEFFER HOWARD JOHN, RALEIGH, NORTH CAROLINA
(Sp. st. a.)

[73]

Majitel patentu

THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED, LONDÝN (Velká Británie)

(54) Způsob výroby derivátů 9-hydroxyethoxymethylguaninu

1

2

Způsob výroby derivátu 9-hydroxyethoxymethylguaninu obecného vzorce I, kde W a Z mají významy stejné nebo různé a znamenají vodíkový atom nebo farmaceuticky vhodný kation, vyznačený tím, že se sloučenina obecného vzorce II, kde G znamená atom nebo skupinu, která se dá selektivně amonolyzovat, amonolyzuje a případně se dále převede sloučenina vzorce I, kde W a Z znamenají v obou případech vodík na sloučeninu, kde jeden ze symbolů W a Z nebo oba tyto symboly znamenají farmaceuticky vhodný kation reakcí s bází nebo s jinou solí obsahující odpovídající kation.

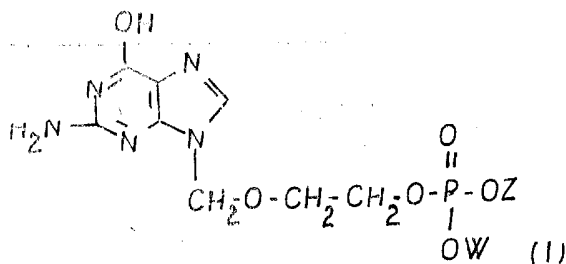
Sloučeniny vzorce I lze použít k léčení virových onemocnění u savců.

Předložený vynález se týká monofosforečného esteru 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guaninu a zejména odpovídajících farmaceuticky vhodných solí. Popisovány jsou také farmaceutické přípravky obsahující výše uvedené látky.

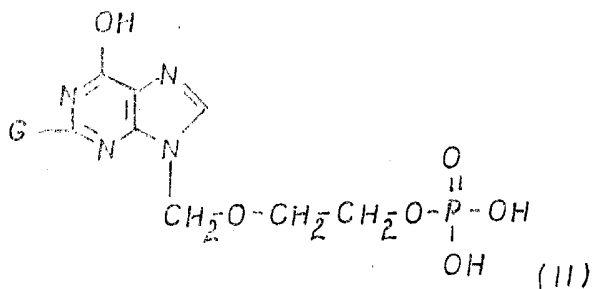
Je známo, že 9-(2-hydroxyethoxymethyl)deriváty purinových látek se vyznačují antivirovou účinností proti virům typu deoxyribonukleových kyselin i ribonukleových kyselin, a to jak in vitro, tak in vivo, viz britský patent č. 1 523 865. Tyto sloučeniny se vyznačují zvláštní účinností jako antivirová činidla proti Vacciniím a virům oparů, počítaje v to herpes simplex, zoster a varicella u savců, přičemž tyto viry způsobují onemocnění, jako je herpetická keratitis u králíků a herpetická encefalitis myši.

Nyní bylo nalezeno, že monofosforečný ester 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guaninu je nejen tak účinný jako nefosforylová sloučenina, ale vyznačuje se navíc selektivní výhodou potud, že je mnohem rozpustnější alespoň za pH v rozsahu 1 až 7,5 při srovnávání s nefosforylovanou sloučeninou.

Předmětem vynálezu je způsob výroby derivátu 9-hydroxyethoxymethylguaninu obecného vzorce I



kde W a Z mají významy stejné nebo různé, a znamenají atom vodíku nebo farmaceuticky vhodný kation, který se vyznačuje tím, že se sloučenina obecného vzorce II



kde G znamená atom nebo skupinu, která se dá selektivně amonolyzovat, amonolyzuje a případně se dále převede sloučenina vzorce I, kde W a Z znamenají v obou případech vodík, na sloučeninu, kde jeden ze symbolů W a Z nebo oba tyto symboly znamenají farmaceuticky vhodný kation reakcí s bází nebo s jinou solí obsahující odpovídající kation.

Farmaceuticky vhodné kationty jsou voleny ze skupiny zahrnující sodík, draslík,

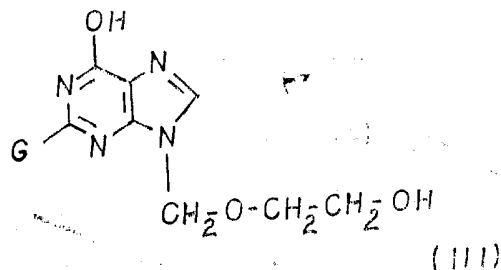
lithium, ekvivalent vápníku, hořčíku nebo hliníku, nebo amoniový kation.

Sloučeniny obecného vzorce I, kde Z znamená sodík, draslík nebo amonium, a W znamená vodík, je třeba označit za výhodné, a zvláště jsou výhodnými sloučeniny obecného vzorce I, kde Z znamená sodík nebo amonium, a W znamená vodík.

Polyvalentní kationty ve smyslu symbolů W a Z jsou rovněž označovány jako Ca/2, Mg/2 a Al/3, a tím se má naznačit, že se jedná o kation v poměru mocnosti tedy Ca²⁺/2, Mg²⁺/2 a Al³⁺/3, a to odpovídá skutečnosti, kdy kationty vápníku nebo hořčíku jsou iontově vázány na 2 fosforečnanové kyselky a hliník na 3.

Výchozí sloučeninu obecného vzorce II, kde G je atom halogenu, merkaptoskupina nebo nižší alkylthioskupina, jako je methylthioskupina, je možno převést na sloučeninu obecného vzorce I amonolýzou. Tento postup je popsán v „Heterocyclic compounds — Fused Pyrimidines, Part II, Purines“, vydavatel D. J. Brown (1971), nakladatelství Wiley-Interscience.

Výchozí sloučeniny obecného vzorce II se mohou připravovat reakcí sloučeniny vzorce III



s fosforylačním činidlem, jako jsou deriváty kyseliny fosforečné, které mají jednu až tři hydroxyskupiny nahrazené za atomy halogenu, například chloru. Například nejvýhodnější je fosforylchlorid. Až dvě hydroxyskupiny mohou být také nahrazeny za alkoxykupiny, které mohou případně obsahovat další substituenty, například ve formě benzyloxyskupin. Tyto deriváty kyseliny fosforečné se mohou aplikovat za běžných neutrálních nebo alkalických podmínek, přičemž posledně uvedené vyžadují aktivaci, například karbodiimidem, například dicyklohexylkarbodiimidem, pokud tyto nejsou přítomné ve formě anhydridu.

Jestliže alespoň dvě hydroxyskupiny v derivátu kyseliny fosforečné jsou nahrazeny za atom halogenu, pak po reakci se sloučeninou vzorce III je nutné odstranit volné atomy halogenu mírnou vodnou hydrolýzou, například použitím molárního ekvivalentu vody v rozpouštědle mísitelném s vodou, jako je alkohol.

Substituované nebo nesubstituované alkoxykupiny zavedené na fosfát se mohou hydrolyzovat ve vhodném vodném médiu v přítomnosti báze v následujícím stupni. Aromatic-

ky substituované alkokyskupiny, jako je benzyloxyskupina, se mohou také podrobit hydrogenolyze, s výhodou v přítomnosti katalyzátoru, běžně známým reduktivním štěpením. Sloučeniny vzorce III se mohou připravovat způsobem popsaným v britském patentu č. 1 523 865.

Farmaceuticky vhodné soli monofosforečného esteru 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guaninu je možno připravit neutralizací kyselých formy zmíněného monofosforečného esteru ekvivalentní množství báze, jako je například hydroxid, hydrogenuhličitán, uhličitán atd., který obsahuje vhodný kation, jako je kation sodíku, draslíku, amonia, vápníku, lithia, hořčíku nebo hliníku. Jinak se mohou takové soli připravit použitím výměnných reakcí, kdy se na sůl monofosforečného esteru působí roztokem, s výhodou vodným roztokem soli, obsahující vhodný jiný kation. Takže je možno působit na málo rozpustnou barnatou sůl monofosforečného esteru 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guaninu vodnou suspenzí síranu sodného; baryum se tím odstraní ve formě nerozpustného síranu barnatého, a v roztoku zůstane sodná sůl monofosforečného esteru 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guaninu.

Popisují se rovněž farmaceutické přípravky, obsahující sloučeninu obecného vzorce I spolu s farmaceuticky vhodným nosičem.

Farmaceuticky vhodnými nosiči jsou materiály, použitelné pro úpravu účinné látky do podávané formy, a mohou být pevné, kapalné nebo i plynné, pokud jsou jinak inertní, z lékařského hlediska nesporné a jsou kompatibilní s aktivní složkou. Farmaceutické přípravky je možno podávat orálně, parenterálně nebo ve formě čípků, případně se mohou používat lokálně ve formě mastí, krémů, aerosolů nebo prášků, nebo je lze podávat jako oční či nosní kapky, vždy v závislosti na tom, zda se přípravek používá k léčbě interního nebo externího virového onemocnění.

Při interních infekcích se podávají sloučeniny obecného vzorce I v dávkách od 0,1 do 250 mg na 1 kg, přepočteno na volný monofosforečný ester, a s výhodou se podávají v rozmezí od 1,0 až do 50 mg na 1 kg hmotnosti těla savce a u lidí se mohou používat ve formě jednotkových dávek, podávaných jednou nebo ve více dávkách, například několikrát denně v množství 1 až 800 mg na jednu dávku, s výhodou 1 až 250 mg na 1 dávku, nejvýhodněji 10 až 200 mg na 1 dávku.

Při parenterálním podávání nebo lokálním podáváním ve formě kapek, například při očních infekcích, může být sloučenina obecného vzorce I ve vodném roztoku v koncentraci od asi 0,1 na 10 % (hmotnost na objem), s výhodou 0,1 až 7 % a nejvýhodněji 0,2 až 5 % (hmotnost na objem).

Jinak se mohou při infekcích očí nebo jiných zevních orgánů, například úst a kůže, používat roztoky, masti nebo krémy jako lo-

kální přípravky, které lze označit za výhodné. Koncentrace se pohybuje v rozmezí 0,1 až 10 %, s výhodou 0,3 až 6 %, nejvýhodněji 3 %.

Sloučeniny podle předloženého vynálezu se používají pro léčení virových onemocnění savců, které spočívá v podávání účinného a netoxického antivirového množství sloučeniny obecného vzorce I. Výraz „účinné a netoxické antivirové množství“ znamená předem určené množství antivirové působící látky, účinné proti viru za použití in vivo.

Účinek sloučenin podle předloženého vynálezu byl prokázán inhibičním testem na deskách.

Inhibiční test na deskách byl prováděn na VERO buňkách, při kterém se stejnoměrný jednovrstvý povlak buněk infikuje dostatečným množstvím viru tak, že vznikne jeho stejnoměrné rozvrstvení na desce. Po přidání pevného překryvného povlaku se na střed tohoto povlaku umístí kotouček filtračního papíru impregnovaný roztokem testované sloučeniny (50 µg na kotouček). Kultury se pak inkubují 96 až 120 hodin při 37 °C v atmosféře 5 % kyslíčnicku uhličitého. Po této době se buňky fixují 10 % formalinu a pak se barví 0,05 % methylové violeti.

Výsledky testů byly hodnoceny podle následující stupnice:

- ++ zóna větší než 25 mm v průměru
- + zóna 5 až 25 mm v průměru
- ± zóna 0 až 5 mm v průměru
- negativní.

Sloučeniny podle předloženého vynálezu vykazovaly účinek „++“.

Při použití redukčního testu na deskách byly připraveny stejnoměrné jednovrstvé povlaky buněk infikované virem jako při inhibičním testu, ale testovaná sloučenina se přidávala do pevného překryvného povlaku v dvojích zředěních. ED₅₀, to je účinná dávka, která u 50 % desek příslušného zředění nevykazovala žádný virus na desce, byla 0,2 µmolární.

Vynález je blíže popsán formou příložených příkladů.

Příklad 1

Monofosforečný ester

9-(2-hydroxyethoxymethyl)guaninu

Do míchané suspenze 20 mg 2-chlor-9-(2-hydroxyethoxymethyl)hypoxanthinu v 0,3 ml triethylesteru fosforečné kyseliny se za chlazení na -8 °C přidá najednou 0,03 ml chloridu fosforylu a během 30 minut se teplota reakční směsi nechá vystoupit na 0 °C. Za této teploty se reakční směs míchá 40 minut, dále 50 minut při +5 °C, vlije se na led a přidáním 2 N roztoku hydroxidu draselného se hodnota pH upraví na 7. Výsledný roztok se extrahuje dvěma díly chlo-

roformu po 2 ml. Hodnota pH vodného podílu se přidáním 2 N roztoku hydroxidu draselného upraví na 8 až 8,5, přidá se 105 mg octanu barnatého a vysrážený fosforečnan barnatý se odfiltruje. Ke kapalině nad sedimentem se přidá velký nadbytek ethanolu, a tím se vysráží surová barnatá sůl monofosforečného esteru 2-chlor-9-(2-hydroxyethoxymethyl)hypoxanthinu. Pevné podíly se odfiltrují, suspendují se v ethanolu, tato suspenze se zahřívá na parní lázni několik minut, načež se ochladí a filtruje. Odfiltrovaná sraženina se promyje bezvodým etherem, načež se sušením získá 26 mg barnaté soli monofosforečného esteru 2-chlor-9-(2-hydroxyethoxymethoxy)hypoxanthinu.

Do míchané suspenze 7 mg právě uvedené barnaté soli v 0,5 ml vody se přidá 3,96 mg síranu amonného, reakční směs se míchá za teploty místnosti 15 minut, načež se ochladí v ledové lázni. Vysrážený síran barnatý se odfiltruje, promyje se vodou (1 ml) a pak za použití 10 ml ethanolu. Filtrát se spojí s podíly z promývání, a po oddestilování rozpouštědel za sníženého tlaku se zbytek rozpustí v 3 ml methanolu. Roztok v methanolu se vlije do tlakových lahví z nerezové oceli, vyložených teflonem, přidá se 8 ml methanolu, nasyceného za chlazení ledem amoniakem, a uzavřená tlaková láhev se zahřívá 4 hodiny na 122 °C. Po ochlazení a otevření se rozpouštědlo

oddestiluje tak, aby zbytek měl co nejmenší objem, a zbytek se testuje chromatografickým na listech tenké vrstvy celulózy za vyvíjení soustavou n-propylalkohol—voda (70 : 30, objemově). Pásky o R_f 0,16 a 0,34 se vystříhají, suspendují se v Tris-pufu (0,6 ml) o hodnotě pH 8, a celulóza se odfiltruje.

Bylo zjištěno za použití enzymatické defosforylace pomocí alkalické fosfatázy, že tyto pásky obsahují monofosforečný ester 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guaninu a monofosforečný ester 2-chlor-9-(2-hydroxyethoxymethyl)hypoxanthinu, protože zmíněnou defosforylací vzniká 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanin a 2-chlor-9-(2-hydroxyethoxymethyl)hypoxanthin. Reakce se provádí tak, že se k filtrátu přidá alkalická fosfatáza z *Escherichia coli* (2 μ l), a směs se zahřívá dvě hodiny na 32 °C. Potom se testuje chromatografií na tenké vrstvě celulózy ve 3 systémech rozpouštědel:

- (a) n-propylalkohol a voda (70 : 30, objemově),
- (b) voda
- (c) n-propylalkohol — konc. amoniak — voda (60 : 30 : 10, objemově).

V každé soustavě odpovídají 2 skvrny 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guaninu [A] a 2-chlor-9-(2-hydroxyethoxymethyl)hypoxanthinu [B].

Soustava rozpouštědel	R_f [A]	R_f [B]	R_f reakčního produktu
(a)	0,51	0,64	0,51 a 0,65
(b)	0,68	0,97	0,67 a 0,97
(c)	0,51	0,71	0,51 a 0,71

Příklad 2

Amonná sůl monofosforečného esteru 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guaninu

V 30 ml vody se rozpustí 0,28 g monofosforečného esteru 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guaninu a přidáním 6 N roztoku chlorovodíkové kyseliny se pH roztoku upraví na 6. Produkt se adsorbuje na 14 ml aktivního uhlí v koloně, velikost částic 50 až 200 mesh, po promytí kyselinou a deaktivování toluenem. Aktivní uhlí se dobře promyje vodou a kolona se eluuje za použití 70 ml 50% vodného ethylalkoholu, obsahujícího 2 % koncentrovaného vodného roztoku amoniaku. Po oddestilování rozpouštědla za sníženého tlaku se získá takto 0,048 g amonné soli monofosforečného esteru 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guaninu o hodnotě R_f 0,30 na celulóze v soustavě n-propylalkohol—voda (70 : 30, objemově).

Příklad 3

Složení tablety

	mg
sodná sůl monofosforečného esteru 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guaninu	100
laktóza	200
škrob	50
polyvinylpyrrolidon	5
hořečnatá sůl esterové kyseliny	4
celková hmotnost	359

Příklad 4

Oftalmický roztok

sodná sůl monofosforečného esteru 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guaninu	1,0 g
--	-------

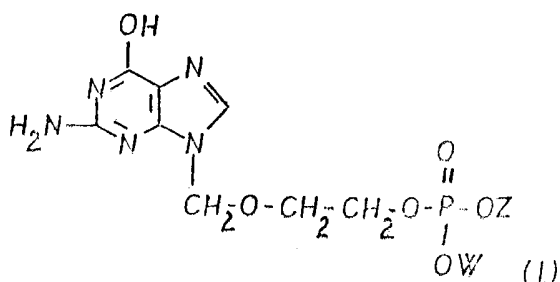
chlorid sodný, p. a. 0,9 g
 thimerosal 0,001 g
 čištěná voda, doplnit na 100 ml
 pH upravit na 5,5 až 7,5

Příklad 5
 Injekční roztok

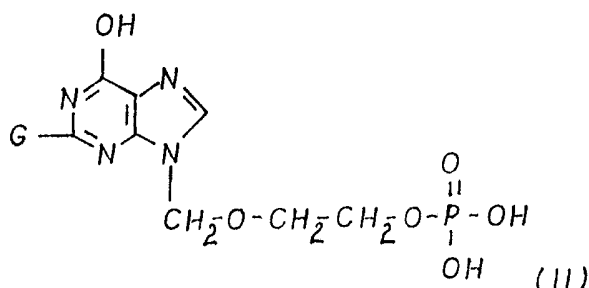
sodná sůl monofosforečného
 esteru 9-(2-hydroxyethoxy-
 methyl)guaninu 0,775 g
 sterilní, apyrogenní fosfátový
 pufr, pH 7, doplnit na 25 ml.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby derivátu 9-hydroxyethoxymethylguaninu obecného vzorce I



kde W a Z mají významy stejné nebo různé a znamenají vodíkový atom nebo farmaceuticky vhodný kation, vyznačený tím, že se sloučenina obecného vzorce II



kde G znamená atom nebo skupinu, která se dá selektivně amonolyzovat, amonolyzuje a případně se dále převede sloučenina vzorce I, kde W a Z znamenají v obou případech vodík na sloučeninu, kde jeden ze symbolů W a Z nebo oba tyto symboly znamenají farmaceuticky vhodný kation reakcí s bází, nebo s jinou solí obsahující odpovídající kation.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se vychází ze sloučeniny obecného vzorce II, kde G je atom halogenu, merkaptoskupina nebo nižší alkylthioskupina.

3. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačený tím, že se jako báze, kterou se působí na sloučeninu obecného vzorce I, kde jak W, tak Z znamenají vodíky, používá hydroxid, hydrogenuhlíčan nebo uhlíčan obsahující odpovídající farmaceuticky vhodný kation.

4. Způsob podle bodu 3, vyznačený tím, že se jako vhodný kation používá sodík, draslík, amonium, vápník, hořečík nebo hliník.

5. Způsob podle bodu 3, vyznačený tím, že se jako vhodný kation používá lithium.