



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

246075
(11) (B2)

(22) Přihlášeno 08 03 84

(21) (PV 1667-84)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 10 03 83
(473883) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 13 02 86

(45) Vydáno 15 12 87

[51] Int. Cl.⁴
C 07 H 19/06
//A 61 K 31/68

(72)

Autor vynálezu

HERTEL LARRY WAYNE, INDIANAPOLIS, INDIANA (Sp. st. a.)

(73)

Majitel patentu

ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, INDIANA (Sp. st. a.)

(54) Způsob výroby 2,2-difluornukleosidu

1

Vynález se týká způsobu výroby fluorovaných nukleosidů s protivirovým účinkem.

Je dlouho známo, že některé nukleosidy mají protivirový účinek. Například 5-(2-bromvinyl-2'-deoxyuridin je účinný proti viru oparu. V publikaci De Clercq et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2 947—51 (1979) je tento účinek popsán. V J. Med. Chem. 22, str. 21—24 (1979) a v US patentovém spisu č. 4 211 773 popsali Watanabe a další řadu nukleosidů, které byly vyrobeny vazbou 2-fluor-2-deoxyarabinofuranosy s citosinem a thyminem. Z těchto látek byl nejvýhodnější 5-jodcytosin.

Sloučenina, která se popisuje jako acyklický nukleosid, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanin je účinnou protivirovou látkou proti viru oparu a byla předmětem symposia, které pořádal American Journal of Medicine v červenci 1982.

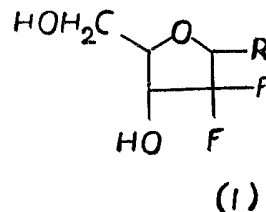
Byly také studovány fluorované uhlohydráty. Souhrnná zpráva o těchto výzkumech byla podána v publikaci Penglis, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 38, 195 až 285 (1981). 2,2-difluorhexóza byla popsána v publikaci Adamson a další, Carbohydrate Research 18, 345—47 (1971).

2

Wright a Taylor, Carbohydrate Research 6, 347—54 (1968) popsali způsob výroby 9-(3-deoxy-3-fluor- α -D-arabinofuranosyl)adenin.

V poslední době se stala předmětem výzkumu syntéza některých uhlohydrátů, která vyžaduje stereospecifické metody, zejména šlo o asymetrickou epoxidaci a asymetrické aldolové reakce, které byly zvláště úspěšné. Tyto reakce byly popsány v publikaci Masamune, Sharpless a další, J. Org. Chem. 47, 1 373—81 (1982).

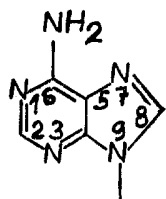
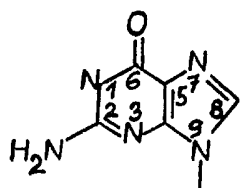
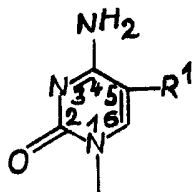
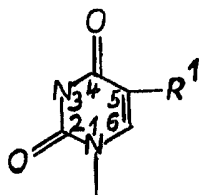
Předmětem vynálezu je způsob výroby nukleosidů obecného vzorce I



kde

R znamená některou ze skupin

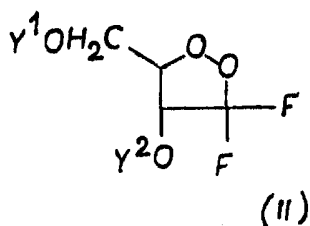
3



kde

R¹ znamená atom vodíku, methylový zbytek, atom fluoru nebo jodu,

jakož i soli těchto sloučenin, přijatelných z farmaceutického hlediska tak, že se uvede v inertním organickém rozpouštědle při teplotě místnosti až teplotě 200 °C v reakci sloučenina obecného vzorce II



kde

Q znamená skupinu CHX, kde X znamená snadno odštěpitelnou skupinu, a

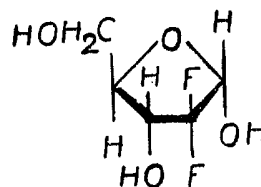
Y¹ a Y² znamená nezávisle na sobě atom vodíku nebo ochrannou skupinu na hydroxyskupině

se zásadou R—H, kde R má svrchu uvedený význam, a popřípadě se odstraní ochranné skupiny.

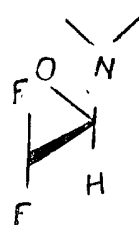
V průběhu přihlášky budou všechny teploty uvedeny ve stupních Celsia.

4

Svrchu uvedené strukturální vzorce nejsou charakteristické pro stereochemii uvedených sloučenin. Je možno užít sloučeniny všech konfigurací a stereochemie sloučenin neznámá proto žádné omezení. Nejvýhodnější je však sloučenina, která obsahuje konfiguraci přírodně se vyskytující ribózy následujícího typu.



Další výhodnou strukturou je následující spojení mezi ribózou a bází.



Je sice zřejmé, které báze je možno užít při syntéze protivirových látek podle vynálezu, pro větší ilustraci však budou dále uvedeny specifické nukleosidy.

1-[5-methyl-2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl]-2-desoxy-2,2-difluorribóza,

1-(2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorribóza,

1-[5-brom-2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl]-2-desoxy-2,2-difluorribóza,

1-[5-chlor-2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl]-2-desoxy-2,2-difluorribóza,

1-[5-jod-2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl]-2-desoxy-2,2-difluorribóza,

1-(4-amino-5-chlor-2-oxo-1H-pyrimidin-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorribóza,

1-(4-amino-5-brom-2-oxo-1H-pyrimidin-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorribóza,

1-(4-amino-2-oxo-1H-pyrimidin-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorribóza,

1-(4-amino-5-jod-2-oxo-1H-pyrimidin-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorribóza,

1-(4-amino-5-methyl-2-oxo-1H-pyrimidin-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorribóza,

- 1-(2-amino-6-oxo-1H,9H-purin-9-yl)-
-2-desoxy-2,2-difluorribóza,
- 1-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2-desoxy-
-2,2-difluorribóza,
- 1-(5-fluor-2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl)-
-2-desoxy-2,2-difluorribóza,
- 1-(2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl)-2-
-desoxy-2,2-difluorxylóza,
- 1-(5-brom-2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl)-
-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
- 1-(5-chlor-2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl)-
-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
- 1-(5-jod-2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl)-
-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
- 1-(4-amino-5-fluor-2-oxo-1H-pyrimidin-1-yl)-
-2-desoxy-2,2-difluorribóza,
- 1-(4-amino-5-chlor-2-oxo-1H-pyrimidin-
-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
- 1-(4-amino-2-oxo-1H-pyrimidin-1-yl)-
-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
- 1-(4-amino-5-fluor-2-oxo-1H-pyrimidin-
-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
- 1-(4-amino-5-methyl-2-oxo-1H-pyrimidin-
-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
- 1-(2-amino-6-oxo-1H,9H-purin-9-yl)-
-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
- 1-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2-desoxy-
-2,2-difluorxylóza,

nebo soli těchto látek, přijatelných z farmaceutického hlediska.

Reakce podle vynálezu, při níž se nové 2-desoxy-2,2-difluoruhlohydráty váží na báze, jsou často takové povahy, že je zapotřebí chránit hydroxylovou skupinu, aby nedošlo k její reakci s dalšími reakčními činidly v reakční směsi. Užívají se ochranné skupiny, které jsou běžné v organické chemii. Odborník snadno zvolí skupinu, kterou je možno účinně použít pro ochranu hydroxylové skupiny a pak opět snadno odstranit po dovršení reakce. Je možno užít skupin, uvedených v běžných učebnicích, například v kapitole 3 publikace *Protective Groups in Organic Chemistry*, Mc Omie, vydavat., Plenum Press, New York (1973) a v kapitole 2 *Protective Groups in Organic Synthesis*, Greene, John Wiley & Sons, New York (1981).

Ochrannými skupinami na hydroxylové skupině mohou být například formyl, 2-chloracetyl, benzyl, difenylmethyl, trife-

nylmethyl, 4-nitrobenzyl, fenoxycarbonyl, terc.butyl, methoxymethyl, tetrahydropyranylyl, allyl, tetrahydrothienyl, 2-methoxyethoxymethyl, methoxyacetyl, fenoxycetyl, isobutyryl, ethoxycarbonyl nebo benzyloxykarbonyl. Silylové ochranné skupiny na hydroxylové skupině jsou zvláště vhodné, protože většinu z nich je možno snadno odštěpit stykem s vodou a alkoholem. Z těchto skupin je možno užít zejména trimethylsilyl, ale také isopropylidimethylsilyl, methylidisopropylsilyl nebo triisopropylsilyl. Zvláštní skupinou je terc.butylidimethylsilylová skupina jako ochranná skupina při tomto způsobu syntézy. Nejsemněji se štěpí a k jejímu odštěpení je zapotřebí užít odlišných reakčních činidel, například halogenvodíkových kyselin.

Ribóza nebo xylóza obsahují hydroxylovou skupinu v poloze 1 svého kruhu. Při reakci uhlohydrátu s bázi za vzniku protivírových sloučenin podle vynálezu je nutno do polohy 1 zavést ochrannou skupinu. Jde obvykle o skupinu, běžně užívanou při výrobě organických sloučenin. Výhodnou ochrannou skupinou je zbytek sulfonátu, zejména methansulfonátu, ale také toluensulfonátu, ethansulfonátu, isopropansulfonátu, 4-methoxybenzensulfonátu, 4-nitrobenzensulfonátu, 2-chlorbenzensulfonátu, ale také atom chloru nebo bromu.

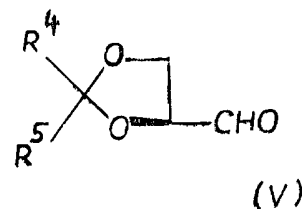
K další ilustraci použitelných sloučenin je možno uvést následující 2-desoxy-2,2-difluoruhlohydráty:

- 2-desoxy-2,2-difluorribóza,
- 3,5-bis(trimethylsilyloxy)-2-desoxy-2,2-
-difluorribóza,
- 3,5-dibenzyloxy-2-desoxy-2,2-difluorribóza,
- 3,5-bis(chloracetoxy)-2-desoxy-2,2-
-difluorribóza,
- 3,5-bis(2-chlorbenzyloxy)-1-methansulfo-
nyloxy-2-desoxy-2,2-difluorribóza,
- 3,5-bis(4-nitrobenzyloxy)-1-(4-toluensul-
fonyloxy)-2-desoxy-2,2-difluorribóza,
- 1-chlor-3,5-bis(fenoxycetoxy)-1,2-
-desoxy-2,2-difluorxylóza,
- 1-(2,4-dibromfenylsulfonyloxy)-3,5-bis(2,2-
-dimethylpropionyloxy)-2-desoxy-2,2-
-difluorxylóza,
- 3,5-bis(benzoyloxy)-1-(o-toluensulfonyl-
oxy)-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
- 1-brom-3,5-bis(methoxykarbonyloxy)-
-1,2-desoxy-2,2-difluoroxylóza,
- 3,5-bis(allyloxykarbonyloxy)-1-chlor-
-1,2-desoxy-2,2-difluoroxylóza,

3,5-bis(benzyloxykarbonyloxy)-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 1-brom-3,5-bis(4-nitrobenzyloxykarbonyloxy)-1,2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 1-brom-3,5-bis(tetrahydrothienyloxy)-1,2-desoxy-2,2-difluorribóza,
 1-brom-3,5-bis(isopropyldimethylsilyloxy)-1,2-desoxy-2,2-difluorribóza,
 1-(2-chlorfenylsulfonyloxy)-3,5-bis(methoxymethoxy)-2-desoxy-2,2-difluorribóza,
 3,5-bis(benzyloxymethoxy)-2-desoxy-2,2-difluorribóza,
 1-(4-nitrofenylsulfonyloxy)-3,5-bis(trityloxy)-2-desoxy-2,2-difluorribóza,
 3,5-bis(allyloxy)-1-chlor-1,2-desoxy-2,2-difluorribóza,
 2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 3,5-bis(trimethylsilyloxy)-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 3,5-dibenzyloxy-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 3,5-bis(chloracetoxy)-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 3,5-bis(2-chlorbenzyloxy)-1-methansulfonyloxy-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 3,5-bis(4-nitrobenzyloxy)-1-(4-toluen-sulfonyloxy)-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 1-brom-3,5-bis(tetrahydrothienyloxy)-1,2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 1-brom-3,5-bis(isopropyldimethylsilyloxy)-1,2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 3,5-bis(terc.butylidifenylsilyloxy)-2-desoxy-2,2-difluorribóza,
 3,5-bis(formyloxy)-1-isopropylsulfonyloxy-2-desoxy-2,2-difluorribóza,
 3,5-bis(trichloracetoxy)-1-methansulfonyloxy-2-desoxy-2,2-difluorribóza,
 1-chlor-3,5-bis(fenoxyacetoxy)-1,2-desoxy-2,2-difluorribóza,
 1-(2,4-dibromfenylsulfonyloxy)-3,5-bis(2,2-dimethylpropionyloxy)-2-desoxy-2,2-difluorribóza,
 3,5-bis(benzyloxy)-1-(o-toluensulfonyloxy)-2-desoxy-2,2-difluorribóza,

1-brom-3,5-bis(methoxykarbonyloxy)-1,2-desoxy-2,2-difluorribóza,
 1-(2-chlorfenylsulfonyloxy)-3,5-bis(methoxymethoxy)-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 3,5-bis(benzyloxymethoxy)-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 1-(4-nitrofenylsulfonyloxy)-3,5-bis(trityloxy)-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 3,5-bis(allyloxy)-1-chlor-1,2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 3,5-bis(terc.butylidifenylsilyloxy)-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 3,5-bis(formyloxy)-1-isopropylsulfonyloxy-2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 3,5-bis(trichloracetoxy)-1-methansulfonyloxy-2,2-desoxy-2,2-difluorxylóza,
 3,5-bis(allyloxykarbonyloxy)-1-chlor-1,2-desoxy-2,2-difluorribóza,
 3,5-bis(benzyloxykarbonyloxy)-2-desoxy-2,2-difluorribóza,
 1-brom-3,5-bis(4-nitrobenzyloxykarbonyloxy)-1,2-desoxy-2,2-difluorribóza.

Uhlohydráty, užívané při provádění způsobu podle vynálezu, je možno získat reakcí D-glyceraldehydketonidu obecného vzorce V:



kde

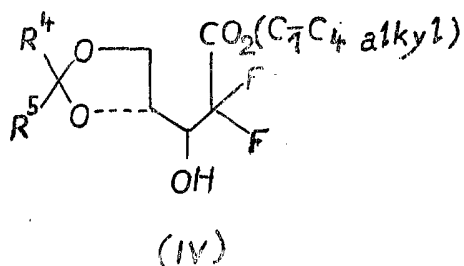
R⁴ a R⁵ znamenají nezávisle na sobě alkylové zbytky o 1 až 3 atomech uhlíku, s alkylbromdifluoracetátem o 1 až 4 atomech uhlíku v alkylové části, s výhodou s ethylesterem této látky.

Výhodným glyceraldehydketonidem je acetonid, v němž R⁴ i R⁵ znamenají methylové zbytky, jak bylo popsáno v publikaci Fischer a Baer, *Helv. Chim. Acta*, 17, 622 (1934). Ethylbromdifluoracetát byl poprvé připraven podle publikace Morel a Dawans, *Tet. 33*, 1445 (1977). Reakce ketonidu a halogenacetátu se provádí za přítomnosti aktivovaného kovu, s výhodou hořčíku nebo zinku. Aktivace je možno dosáhnout nejsná-

ze použitím ultrazvuku, kterým se zpracuje reakční směs. Jde o kompenzaci malého množství vody, takže pak není zapotřebí udržovat bezvodé podmínky a rovněž není zapotřebí připravovat a skladovat aktivované kovy. V případě potřeby však je možno kov aktivovat běžným způsobem. Užívá se obvykle ekvimolární množství kovu.

Reakce se provádí v etherech, například v tetrahydrofuranu nebo diethyletheru při mírně zvýšené teplotě. Je možno užít i jiná organická rozpouštědla, která jsou inertní za reakčních podmínek, včetně halogenovaných alkanů, jako chloroformu, dichlormethanu, trichlorethanu nebo aromatických rozpouštědel, jako je benzen, toluen a xyleny. Teploty v rozmezí teploty místnosti až 150 °C jsou použitelné, výhodné rozmezí je teplota místnosti až 80 °C. Ekonomicky přijatelné výtěžky byly získány v rozmezí několika minut až hodin. Je třeba uvést, že reakce je exotermní a směs může být zapotřebí chladit v závislosti na rychlosti, s níž se přidávají reakční složky.

Produktem první reakce je alkyl-3-dioxolanyl-2,2-difluor-3-hydroxypropionát obecného vzorce IV

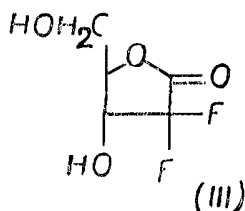


kde

R⁴ a R⁵ mají svrchu uvedený význam.

Poměr 3-R-hydroxymeziproductu k jeho 3-S-hydroxyenantiomeru se obvykle pohybuje v blízkosti poměru 3:1. Enantiomer má stereochemii typu, při níž dochází k výrobě derivátu ribózy v jeho přírodní konfiguraci a jde tedy o výhodný enantiomerní produkt prvního stupně. Tuto látku je možno oddělit od 3-S-enantiomeru chromatografií na silikagelu, sloupec se vymývá chloroformem s obsahem 0,5 % methanolu.

Hydroxypropionát ve kterékoliv formě se hydrolyzuje za velmi mírných podmínek za vzniku laktonu vzorce III



Při správném řízení hydrolyzy se ketonidová funkce odštěpí a neočekávaně obvykle dochází rovněž k odštěpení esterové skupiny za vzniku laktonu v jediném stupni. K hydrolyze se obvykle užije mírně kyselé iontoměničové pryskyřice, velmi výhodná je pryskyřice Dowex 50W-X12 (Dow Chemical Company). Způsob je možno provádět i při použití jiných mírně kyselých reakčních činidel, obvykle se však získá větší množství vedlejších produktů. Například je možno užít vodný roztok kyseliny octové nebo jiných poměrně silných kyselin, například kyseliny propionové, mravenčí, chloroctové nebo šťavelové.

Hydroxylové skupiny laktonu by měly být chráněny dříve, než dojde k redukci atomu kyslíku ketonové skupiny. Užije se běžných reakčních podmínek v závislosti na zvolených ochranných skupinách. Například terc.butyl-dimethylsilylová skupina se obvykle užívá ve formě svého trifluormethansulfonátu a zavedení ochranné skupiny se provádí za přítomnosti zásady, například lutidinu, pyridinu apod. Je možno také zavádět acylové ochranné skupiny, například acetyl, benzoyl apod. reakci laktonu s acylačním činidlem, například s chloridem, bromidem, kyanidem, azidem nebo příslušným anhydridem kyseliny. Reakce se obvykle provádí v zásaditém rozpouštědle, například pyridinu, chinolinu nebo isochinolinu nebo terciárním aminu, například triethylaminu, tributylaminu nebo methylpiperidinu. Reakci je možno rovněž provádět v inertním rozpouštědle za přítomnosti látky, která váže kyselinu, například terciárního aminu. Při reakci je také možno užít katalyzátoru acylace, například 4-dimethylaminopyridin nebo 4-pyrrolidinpyridin. Acylační reakce, jimiž se zavádí ochranná skupina na hydroxylovou skupinu, se provádí při teplotě -25 až 100 °C. Tato acylace se rovněž může provádět jako reakce, katalyzovaná kyselinou za přítomnosti příslušné karboxylové kyseliny v inertním organickém rozpouštědle. Kyselinou, užitou jako katalyzátor, může být kyselina sírová, polyfosforečná nebo methansulfonová.

Acylové ochranné skupiny je rovněž možno zavádět tak, že se vytvoří aktivní ester příslušné kyseliny, například při použití dicyklohexylkarbodiimidu, acylimidazolů, nitrofenolů, pentachlorofenolu, N-hydroxysukcinimidu a 1-hydroxybenzotriazolu.

Ochranné skupiny etherového typu je možno získat reakcí laktonu například s příslušnou diazosloučeninou, jako diazomethanem, fenyldiazomethanem nebo silyldiazomethanem. Reakce tohoto typu se obvykle provádějí v rozpouštědle včetně etherů, například v ethylacetátu, halogenovaném rozpouštědle včetně dichlormethanu a chloroformu nebo v etherech včetně diethyletheru a tetrahydrofuranu. Postup se obvykle provádí při nižších teplotách v rozmezí -50

až 0 °C. Tvorba etheru se rovněž může provádět za přítomnosti vhodného činidla, například trimethyloxosulfoniumhydroxidu, trimethylsulfoniumhydroxidu a trimethylselemoniumhydroxidu v rozpouštědlech, například v dimethylsulfoxidu, dimethylformamidu, hexamethylfosforamidu, acetonu nebo acetonitrilu.

Svrchu uvedené silylové ochranné skupiny se zavádějí na hydroxyskupiny běžným způsobem, například reakcí s příslušným silylkarboxamidem nebo bis(substituovaný silyl)karboxamidem nebo s příslušně substituovaným silazanem. Je možno užít také vhodně substituované silylmethansulfonáty, toluensulfonáty apod. Obvykle je zapotřebí užít ekvivalentní množství zásady, pokud není užito zásaditého rozpouštědla, jak bylo uvedeno svrchu.

Po zavedení ochranné skupiny na hydroxylovou skupinu se redukuje atom kyslíku ketonové skupiny laktonu na alkohol, přičemž se vytváří chráněná 2-desoxy-2,2-difluoribóza nebo xylóza podle vynálezu. Nejvýhodnějším redukčním činidlem je diisobutylaluminiumhydrid, který se užívá při teplotě -100 až -20 °C. Redukci je nutno provádět velmi opatrně, aby nedošlo k otevření kruhu u atomu kyslíku. Je možno užít také i jiné hydridy kovů, včetně běžně užívaných sloučenin, například lithialuminiumhydridu, je však zapotřebí užít nízké teploty a zajistit rozložení hydridu před stoupnutím teploty na teplotu místnosti. Při redukci je zapotřebí užít rozpouštědla s nízkou teplotou tuhnutí. Vhodným rozpouštědlem je toluen, je ovšem možno užít i jiná rozpouštědla, včetně nižších alkanolů, zvláště ethanolů nebo etherů, například diethyletheru.

K uskutečnění dostatečné reakce se zásadou je zapotřebí užít v poloze 1 uhlohydrátu vhodnou odštěpitelnou skupinu. Výhodnou skupinou tohoto typu je methansulfonolová skupina, která se zavádí methansulfonylchloridem za přítomnosti ekvivalentního množství vhodné sloučeniny, která váže kyselinu, například triethylaminu apod. Další sulfonolové skupiny je možno zavádět obdobným způsobem reakcí s příslušným sulfonylhalogenidem.

V případě, že odštěpitelnou skupinou je atom chloru nebo bromu, je často výhodné vytvořit nejprve 1-acetát, například reakcí s anhydridem kyseliny octové nebo jiným zdrojem acetylové skupiny za přítomnosti ekvivalentního nebo většího množství sloučeniny, která váže kyselinu. Acetátová skupina se pak nahradí při nižší teplotě, například -50 až 0 °C, použitím bromovodíku nebo chlorovodíku. Protože při použití plynného halogenovodíku může dojít k odstranění ochranných skupin, zvláště silylových skupin, provádí se tento postup při nižší teplotě a halogenovodík se přidává velmi pomalu po jednotlivých podílech.

Báze, užívané k výrobě protivirových slou-

čenin podle vynálezu, jsou známé a jejich výrobu není nutno popisovat. Je však zapotřebí chránit primární aminoskupiny, které jsou přítomné na některých těchto sloučeninách před reakcí s uhlohydrátem. Obvyklými ochrannými skupinami na aminoskupině jsou například silylové skupiny a ostatní uváděné skupiny, typickými skupinami jsou terc.butoxykarbonyl, benzyloxykarbonyl, 4-methoxybenzyloxykarbonyl, formyl nebo acetyl.

Je žádoucí, převést atom kyslíku ketoskupiny na enolovou formu, aby byla báze vysoce aromatická a snadno reagovala s uhlohydrátem. Enolyzace se nejlépe provádí při použití silylových ochranných skupin. K tomuto účelu je možno užít obvyklé silylové ochranné skupiny, tak jak byly uvedeny svrchu.

Reakce mezi chráněným uhlohydrátem a zásadou se s výhodou provádí bez použití rozpouštědla při vyšší teplotě v rozmezí 50 až 200 °C. Výhodné je použití poměrně vysokovroucích rozpouštědel, například dimethylformamidu, dimethylacetamidu nebo hexamethylfosforamidu. V případě, že se reakce provádí při vyšším tlaku k zamezení destilace nízkovroucích rozpouštědel, je možno užít jakékoliv běžné rozpouštědlo, inertní za reakčních podmínek.

Reakci je možno provádět při nižší teplotě v případě, že se užije iniciátoru reakce, například trifluormethansulfonyloxysilanu. Obvyklá reakční rozpouštědla, inertní za podmínek reakce, se užívají při teplotách místnosti až teplotě 100 °C.

Konečným stupněm je odstranění ochranných skupin. Většina silylových ochranných skupin se snadno odštěpí za přítomnosti vody nebo alkoholu. K odstranění terc.butyl-dimethylsilylové ochranné skupiny je nutno užít kyselé podmínky, například plynného halogenovodíku.

Acylové ochranné skupiny je možno odstranit jednoduchou hydrolýzou působením silné nebo středně silné zásady, například hydroxidu alkalického kovu při teplotě místnosti až teplotě 100 °C. Užije se alespoň jednoho ekvivalentu zásady pro každou ochrannou skupinu. Tuto hydrolýzu je možno provádět v rozpouštědle, které obsahuje hydroxylovou skupinu, zejména ve směsi vody a alkoholu. Reakci je však možno provádět i v jiném rozpouštědle, například v polyolech, jako ethylenglykolu, etherech, jako tetrahydrofuranu, ketonech, jako acetonu a methylethylketonu a v jiných polárních rozpouštědlech, například dimethylsulfoxidu. Odštěpení acylové ochranné skupiny je rovněž možno provést působením jiných zásad, například methoxidu sodíku, terc.butoxidu draslíku, hydrazinu, hydroxylaminu, amoniaku, amidu alkalického kovu a sekundárních aminů, například diethylaminu. Acylové ochranné skupiny je rovněž možno odstranit za přítomnosti kyseliny jako kata-

lyzátoru, například kyseliny methansulfonové, chlorovodíkové, bromovodíkové, sírové nebo použitím kyselých iontoměničkových pryskyřic. Výhodné je provádění této hydrolýzy při poměrně vysoké teplotě, například teplotě varu reakční směsi pod zpětným chladičem, v případě použití silných kyselin je možno užít i teploty místnosti.

Odstranění ochranných etherových skupin se provádí známým způsobem, například ethanthiolem nebo chloridem hlinitým.

Žádný z reakčních stupňů nevyžaduje velký přebytek reakčního činidla. Jak je obvyklé při organických reakcích, je výhodné užít mírného přebytku v rozmezí 1,05 až 2.

Protivirové sloučeniny, získané způsobem podle vynálezu, mohou tvořit adiční soli, přijatelné z farmaceutického hlediska. Tyto soli jsou například hydrobromidy, hydrochloridy, estery monofosfátu, difosfátu a trifosfátu a sodové soli těchto fosfátů, sírany, soli sodné, draselné, lithné nebo amonné a další známé soli. Soli, přijatelné z farmaceutického hlediska, jsou ty soli, které je možno užít k léčbě teplokrevných živočichů.

Protivirové nukleosidy, získané způsobem podle vynálezu, je možno užít proti virovým infekcím běžným způsobem. Sloučeniny jsou účinné pro obecnou léčbu virových infekcí, zejména proti virům, které způsobují různé druhy oparů.

Sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu nebo jejich soli, přijatelné z farmaceutického hlediska, je možno podávat perorálně, místně nebo parenterálně. Obvyklé dávky se pohybují v rozmezí 5 až 500 mg/kg. Výhodné rozmezí dávek je 10 až 100 mg/kg.

Uvedené sloučeniny se obvykle užívají ve formě farmaceutických prostředků, které se vyrábějí běžným způsobem. Při místním podání se účinná látka zpracovává například na krém nebo mazání. Krémy jsou emulze olejové a vodné fáze, v níž je nukleosid rozpuštěn nebo uveden do suspenze. Mazání jsou tukovité nebo voskovité prostředky, v nichž může být nukleosid rozpustný, avšak může být také uveden do suspenze v případě, že je v požadované koncentraci nerozpustný.

Farmaceuticky přijatelnými prostředky nebo fyziologicky přijatelnými prostředky se rozumí ty prostředky, které je možno užít k léčbě teplokrevných živočichů.

Prostředky pro parenterální podání jsou obvykle zpracovány tak, že nukleosid nebo jeho sůl, přijatelná z farmaceutického hlediska, jsou rozpuštěny v injekčním roztoku, většina nukleosidů však má malou rozpustnost ve vodě. Je tedy běžnější připravit prostředek pro parenterální podání tak, že jde o suchý prášek, který je směsí nukleosidu a běžného činidla, které napomáhá vzniku suspenze, například škrobu, cukru apod., po přidání sterilní vody vznikne suspenze, vhodná pro injekční podání. Prostředky pro parenterální podání mohou mít jako základ

vodu s malým množstvím rozpouštědel, přijatelných z fyziologického hlediska, například propylglykolu apod., v roztocích mají nukleosidy být rozpustné v požadované koncentraci.

Obvyklým prostředkem pro perorální podání jsou tablety, kapsle a také kapalné formy, například suspenze. Obvykle jsou nejvýhodnější dávky, které obsahují dávku, určenou pro jednotlivé podání, v jedné tabletě nebo kapsli nebo v malém množství tablet nebo kapslí. Tablety se vyrábí běžným způsobem při použití obvyklých kluzných látek, nosičů a činidel, která napomáhají rozpadu tablety. Při výrobě kapslí se pouze nukleosid zředí příslušným podílem inertního prášku, například laktózy a pak se získanou směsí plní kapsle příslušného rozměru. Suspenze pro perorální podání se získají mletím nukleosidu a pak jeho důkladným promísením s poměrně viskózní směsí vody a další kapaliny. Viskozitu je možno upravit zahušťovadlem nebo činidlem, které vytváří gel, například rostlinnou pryž, chemicky modifikovaným derivátem celulózy apod. Je možno užít také vhodné chuťové nebo vonné látky.

Vynález bude osvětlen následujícími přípravami a příklady.

Příprava 1

Ethyl-2,2-difluor-3-hydroxy-3-(2,2-dimethylthiodioxolan-4-yl)propionát

K 10,2 g aktivovaného zinku se přidá malý podíl roztoku, který sestává z 31,8 g ethylbromdifluoracetátu a 22,6 g 4-formyl-2,2-dimethylthiodioxolanu v 53 ml tetrahydrofuranu a 53 ml diethyletheru. Reakční směs nemá obsahovat vodu. Roztok se sám zahřeje pod zpětným chladičem na teplotu varu po přidání prvního podílu k aktivovanému zinku. Zbytek roztoku se přidává po kapkách po dobu přibližně 30 minut tak, aby se reakční směs nevařila příliš prudce. Pak se směs míchá ještě 30 minut za mírného varu pod zpětným chladičem. Pak se reakční směs vlije do 200 ml 1N kyseliny chlorovodíkové a 200 g ledu a směs se míchá do rozpuštění ledu. Pak se vodná směs extrahuje čtyřikrát vždy 70 ml diethyletheru, organické vrstvy se slíjí a promyjí se 50 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného a 50 ml nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného, vysuší se síranem hořečnatým a odpaří ve vakuu, čímž se získá 26 g světležlutého oleje. Surový produkt se chromatografuje na 1000 g silikagelu ve sloupci, který se vymývá chloroformem s obsahem 0,5 % methanolu k oddělení hlavního 3-R-hydroxyderivátu od menšího podílu 3-S-hydroxyderivátu. Poměr množství obou produktů byl 3:1, první produkt se vymývá později.

Odpařením frakcí s obsahem 3-R-hydro-

xyderivátu se získá 12,6 g tohoto produktu v podstatě v čisté formě. Produkt byl identifikován hmotovou spektrometrií, přičemž byl prokázán fragment o molekulové hmotnosti 239, což souhlasí s molekulovou hmotností požadovaného produktu bez methylové skupiny, která byla odstraněna z acetonidové funkce při spektrometrickém měření. NMR-spektrum 3-R-hydroxyderivátu při 90 MHz v CDCl_3 má

$\delta = 3,94 - 4,45$ (m, 5H);
3,13 (d, $J = 4,5\text{Hz}$, 1H);
1,2 — 1,47 (m, 9H).

Při analýze 3-S-hydroxyderivátu, který byl získán v množství 4,68 g odpařením příslušných chromatografických frakcí, byly získány hodnoty:

3,75 — 4,47 (m, 6H);
2,95 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H);
1,25 — 1,5 (m, 9H).

Příprava 2

2-desoxy-2,2-difluor-1-oxoribóza

50 g 3-R-hydroxyderivátu, získaného způsobem podle příkladu 1, se rozpustí ve směsi 500 ml methanolu a 250 ml vody, a přidá se 250 g pryskyřice Dowex 50W—X12. Směs se míchá 4 dny při teplotě místnosti a pak se směs filtruje přes vrstvu infusiové hlinky. Filtrát se odpaří do sucha ve vakuu, čímž se získá 33,0 g požadovaného produktu, který byl identifikován NMR-spektrém při použití 90 MHz v CD_3OD :

$\delta = 3,6 - 4,6$ (série m, 4H);
4,8 (bs, 2H).

Příprava 3

3,5-bis(terc.butyldimethylsilyloxy)-2-desoxy-2,2-difluor-1-oxoribóza

Ke 13 g produktu, získaného podle přípravy 2, se přidá 60 ml dichlormethanu, 22,5 ml 2,6-lutidinu a 48,2 ml trifluormethylsulfonyloxy terc.butyldimethylsilanu v dusíkové atmosféře za mírného chlazení při udržování teploty pod hodnotou 25°C . V průběhu 15 minut po smísení reakčních složek se stane reakce exotermní a směs se snadno míchá. Směs se míchá přes noc, načež se zředí 150 ml ethylacetátu, a pak se postupně promývá 40 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 1N, 40 ml nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a 40 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného. Pak se směs suší síranem hořečnatým a odpaří se do sucha ve vakuu, čímž se získá 32,1 g surového produktu, který se chromatografuje na 260 g silikagelu o průměru částic 100 mesh, sloupec se vymývá směsí chloroformu a diethyletheru v poměru 10:1. Frakce s obsahem požadovaného produktu se slíjí a odpaří ve vakuu, čímž se získá 7,8 g čistého produktu. Slitím dalších frakcí a jejich od-

pařením se získá ještě 10 g surového produktu, který nebyl dále čištěn. Při analýze čistého produktu byly získány následující výsledky: absorpční maximum v intračerveném světle 1820 cm^{-1} , NMR spektrum CDCl_3 , 90 MHz,

$\delta = 0,1 - 0,22$ (m, 12H);
0,83 — 0,98 (m, 18H);
3,63 — 4,7 (série m, 4H);
hmotová spektroskopie $m/e = 339 = p\text{-terc.butyl}$.

Příklad 1

3,5-bis(terc.butyldimethylsilyl)-2-desoxy-2,2-difluorribóza

10,3 g 3,5-bis(terc.butyldimethylsilyloxy)-2-desoxy-2,2-difluor-1-oxoribózy, získané podle přípravy 3, se rozpustí ve 120 ml bezvodého toluenu a roztok se zchladí na teplotu -84°C . K roztoku se přidá 26 g diisobutylaluminiumhydridu v průběhu 20 minut za stálého míchání. Teplota reakční směsi se přitom stále udržuje pod hodnotou -65°C . Dvě hodiny po prvním přidání hydridu se do reakční směsi přidá methanol při teplotě -20°C po jednotlivých podílech tak, až již nedochází k dalšímu vývoji plynu. Methanol se chladí předem na -20°C . Směs se pak nechá pomalu zteplat na teplotu místnosti a pak se promyje 100 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,1N. Vodná vrstva se pak promyje 100 ml diethyletheru a pak ještě třikrát vždy 50 ml diethyletheru. Organické vrstvy se slíjí, promyjí se 100 ml nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného, vysuší se síranem hořečnatým a odpaří do sucha ve vakuu, čímž se získá 8,2 g požadovaného produktu v surové formě.

Tento materiál je popřípadě možno chromatografovat na silikagelu v množství 25 g silikagelu na 1 g surového produktu, k eluci se užije 100% dichlormethan.

NMR spektrum (CDCl_3 , 90 MHz),
 $\delta = 0,1 - 0,24$ (m, 12H);
0,85 — 1,0 (m, 18H);
3,33 — 4,63 (série m, 5H);
5,0 — 5,27 (dd, 1H);
Hmotové spektrum $m/e = 341 = P\text{-terc.butyl}$;
 $[\alpha]_D^{25} = +25,1^\circ$.

Příklad 2

3,5-bis(terc.butyldimethylsilyloxy)-1-methansulfonyloxy-2-desoxy-2,2-difluorribóza

0,5 g 3,5-bis(terc.butyldimethylsilyloxy)-2-desoxy-2,2-difluorribózy se rozpustí v 5 mililitrech bezvodého dichlormethanu a 0,17 g triethylaminu. K roztoku se přidá za mírného chlazení 0,11 ml methansulfonylchloridu. Po 3 hodinách míchání v dusíko-

vé atmosféře při teplotě 25 °C se směs odpaří ve vakuu a odparek se smísí s 10 ml ethylacetátu. Roztok se extrahuje 3 ml nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a pak postupně 3 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 1N, 3 ml vody a 3 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného. Organický roztok se vysuší síranem sodným a odpaří ve vakuu, čímž se získá 0,59 g požadovaného výsledného produktu.

NMR spektrum (CDCl_3 , 90 MHz) = δ 0,05 až 0,16 (m, 12H);
0,78 — 0,90 (m, 18H);
3,0 (s, 3H);
3,63 — 4,59 (série m, 4H);
5,67 — 5,9 (dd, 1H);
hmotové spektrum $m/e = 419 = \text{P-terc-butyl}$.

Příklad 3

1-[5-methyl-2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl]-1,2-desoxy-2,2-difluorribóza

V dusíkové atmosféře se přidá 2,59 g 3,5-bis(terc.butyldimethylsilyloxy)-1-methansulfonyloxy-2-desoxy-2,2-difluorribóze, 1,60 g 5-methyl-2,4-bis-(trimethylsilyloxy)pyrimidinu a 45 ml bezvodého 1,2-dichlorethanu. K této směsi se přidá 1,45 g trifluormethansulfonyloxytrimethylsilanu, a čirý roztok se míchá při teplotě varu pod zpětným chladičem 2 až 3 hodiny. Pak se reakční směs zchladí na teplotu místnosti, přidá se 1,35 ml methanolu a suspenze se míchá 30 minut. Sraženina se oddělí filtrací a filtrát se zahustí ve vakuu na polovinu svého objemu a pak se zředí stejným objemem dichlormethanu. Pak se roztok promyje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, pak nasyceným vodným roztokem chloridu sodného a pak se vysuší bezvodým síranem sodným. Roztok se zfiltruje a filtrát se nasatí bezvodým bromovodíkem. Reakční směs se 30 minut míchá a pak se odpaří ve vakuu. Odparek se rozpustí v methanolu a roztok se odpaří do sucha ve vakuu. Odparek se rozpustí ve vodě a roztok se dvakrát extrahuje diethyletherem. Pak se vodná vrstva odpaří do sucha. Odparek se smísí s ethanolem a opakovaně se odpaří, čímž se azeotropně odstraní veškerá voda. Tímto způsobem se získá 1 g surového produktu, který se chromatografuje na 30 g silikagelu (Woelm), sloupec se vymývá ethylacetátem, čímž se získá 0,76 g požadovaného produktu, který se dále čistí překrystalováním z ethylacetátu, čímž se získá 0,37 g bílého krystalického produktu.

NMR spektrum (CD_3OD , 90 MHz) = δ 1,93 (s, 3H);
3,5 — 4,67 (série m, 4H);
4,83 (bs, 3H);
6,3 (t, $J = 9\text{Hz}$, 1H);

7,47 (m, 1H);
hmotová spektroskopie $m/e = 278$.

Příklad 4

1-[4-amino-2-oxo-1H-pyrimidin-1-yl]-2-desoxy-2,2-difluorribóza

V dusíkové atmosféře se přidá k 5,0 g 3,5-bis(terc.butyldimethylsilyloxy)-1-methansulfonyloxy-2-desoxy-2,2-difluorribózy ve 100 mililitrech bezvodého dichlorethanu celkem 4,68 g bis-trimethylsilyl-N-acetylcytosinu a pak 3,96 g trifluormethansulfonyloxytrimethylsilanu. Roztok se zahřívá 3 až 15 hodin na teplotu varu pod zpětným chladičem. Pak se reakční směs zchladí na teplotu místnosti, přidají se 2 ml methanolu a vzniklá suspenze se míchá přibližně 30 minut. Sraženina se oddělí filtrací a filtrát se odpaří ve vakuu do sucha. Odparek se rozpustí v methylenchloridu, nasatí se bezvodým bromovodíkem a míchá 45 minut při teplotě místnosti. Směs se odpaří ve vakuu do sucha, odparek se smísí s nasyceným methanolvým roztokem amoniaku a míchá přibližně 15 hodin při teplotě místnosti. Pak se roztok odpaří do sucha ve vakuu. Odparek se rozetře s vodou a podíl rozpustný ve vodě se nanese na sloupec silikagelu v reversní fázi, čímž se po promytí sloupce vodou získá 100 mg požadovaného produktu.

NMR (CD_3OD , 90 MHz) δ 3,7 — 4,65 (série m, 4H);
4,83 (bs, 4H);
5,97 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H);
6,24 (t, $J = 8\text{Hz}$, OH);
7,88 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H);
hmotová spektrometrie $m/e = 263$.

Příklad 5

1-[4-amino-5-jod-2-oxo-1H-pyrimidin-1-yl]-2-desoxy-2,2-difluorribóza

V dusíkové atmosféře se přidá k 1,99 g 3,5-bis(terc.butyldimethylsilyloxy)-1-methansulfonyloxy-2-desoxy-2,2-difluorribózy ve 35 ml bezvodého 1,2-dichlorethanu celkem 2,08 g tris-trimethylsilyl-5-jodcytosinu a pak ještě 1,11 g trifluormethansulfonyloxytrimethylsilanu. Roztok se zahřívá na teplotu varu pod zpětným chladičem 3 až 15 hodin. Pak se reakční směs zchladí na teplotu místnosti, přidá se 5,0 ml methanolu a suspenze se 30 minut míchá. Sraženina se zfiltruje a filtrát se odpaří do sucha ve vakuu. Odparek se rozpustí v methylenchloridu, roztok se nasatí bezvodým bromovodíkem a míchá se 45 minut při teplotě místnosti. Pak se směs odpaří do sucha ve vakuu. Odparek se rozetře s vodou, roztok se neutralizuje hydrogenuhličitanem sodným a pak se nanese na sloupec silikagelu v reversní fázi, jako eluční činidlo se užije směs vody a methanolu v objemovém po-

měru 9 : 1, čímž se získá 26 mg požadovaného produktu.

NMR (CD₃OD, 90MHz) = δ 3,6 — 4,73
(série m, 4H);
4,9 (bs, 4H);
6,25 (t, J = 8Hz, 1H);
8,44 (s, 1H);
hmotová spektrometrie m/e = 389.

Příklad 6

1-(2,4-dioxo-5-fluor-1H,3H-pyrimidin-1-yl)-2-deoxy-2,2-difluorribóza

V dusíkové atmosféře se přidá k 1,1 g 3,5-bis(terc.butyldimethylsilyloxy)-1-methansulfonyloxy-2-deoxy-2,2-difluorribózy ve 20 ml bezvodého 1,2-dichlorethanu celkem 2,83 g bis-trimethylsilyl-5-fluoruracilu a pak ještě 0,66 g trifluormethansulfonyloxymethyltrimethylsilanu. Roztok se zahřívá 3 až 15 hodin na teplotu varu pod zpětným chladičem. Pak se reakční směs zchladí na teplotu místnosti, přidá se 1,0 ml methanolu a suspenze se 30 minut míchá. Sraženina se oddělí filtrací a filtrát se odpaří ve vakuu do sucha. Odparek se rozpustí z methylenchloridu, roztok se nasatí bezvodým bromovodíkem a míchá 45 minut při teplotě místnosti. Pak se směs odpaří do sucha ve vakuu. Odparek se rozetře s vodou, roztok se neutralizuje hydrogenuhličitanem sodným a nanese na sloupec silikagelu v reversní fázi, přičemž jako eluční činidlo se užije voda, čímž se získá 30 ml požadovaného produktu.

NMR (CD₃OD, 90 MHz) = δ 3,5 — 4,5
(série m, 4H);
4,65 (bs, 3H);
5,89 (t, J = 8Hz, 1H);
7,94 (d, J = 7Hz, 1H);
hmotová spektrometrie = 282.

Protivirové účinky sloučenin, vyrobených způsobem podle vynálezu, byly prokázány v pokusu *in vitro*, který byl proveden následujícím způsobem.

Pokus 1

Ledvinové buňky afrických opic (BSC-1) nebo Hela buňky byly pěstovány v Falkonových lahvích o ploše 25 cm² při teplotě 37 °C v prostředí 199 s 5 % inaktivovaného fetálního séra skotu (FBS), 151 jednotkami/ml penicilinu a 150 µg/ml streptomycinu. Po vytvoření souvislé vrstvy buněk bylo růstové prostředí odstraněno a do každé láhve bylo přidáno příslušné zředění viru. Po absorpci hodinu při teplotě místnosti byla vrstva infikovaných buněk převrstvena prostředím s obsahem 1 dílu 1% prostředku Ionagar č. 2 a 1 dílu prostředí 199 s dvojnásobnou koncentrací a s přidavkem fetálního telecího séra (FCS), penicilinu a streptomycinu a mimoto zkoumané látky v uvedené koncentraci, která je udávána v µg/ml. Kontrolní láhev neobsahovala žádnou zkoumanou látku. Zásobní roztoky zkoumané látky byly v dimethylsulfoxidu jako v rozpouštědle při koncentraci 10⁴ µg/ml. Láhve byly inkubovány 72 hodin při teplotě 37 °C. Plaky bylo možno pozorovat v těch oblastech, kde došlo k infekci virem a k jeho reprodukci v buňkách. Pak byl do každé láhve přidán 10% roztok formalinu s dvěma procenty octanu sodného k inaktivaci viru a fixaci vrstvy buněk ke stěně láhve. Plaky viru byly spočítány bez ohledu na rozměry po zbarvení okolí krystalovou violetí. Počet plaků byl srovnáván s počtem kontrolních plaků při každé koncentraci zkoumané látky. Účinnost každé sloučeniny byla vyjádřena jako inhibice plaků v procentech.

Výsledky tohoto hodnocení jsou uvedeny v následujících tabulkách 1 až 6.

TABULKA 1

Inhibice plaků v % v $\mu\text{g/ml}$ zkoumané látky při převrstvení agarem a použití BSC-1 buněk Herpes simplex, typ I
sloučenina 100 z příkladu

3 ^a	96%	72%	53%	—	35%	—	15%	12%	—	0	—	—	4%	—
3 ^b	99%	—	—	99%	—	—	98%	—	21%	—	—	31%	—	—
4	—	—	—	100%	—	—	100%	—	100%	—	—	100%	—	100%

^aanomerní směs (α a β konfigurace)

^b β -konfigurace

TABULKA 2

Inhibice plaků v % zkoumanou látkou při uvedené koncentraci v $\mu\text{g/ml}$ BSC-1-buňkách převrstvených agarem

sloučenina z příkladu	Pseudorabies Virus									
	100	50	25	20	12	10	6	3	2	1
3 ^a	23%	18%	15%	—	12%	—	6%	5%	—	—
4	—	—	—	100%	—	100%	—	—	100%	100%

^aanomerní směs (α a β konfigurace)

TABULKA 3

Inhibice plaků v % při koncentraci zkoumané látky v $\mu\text{l/ml}$, a BSC-1-buňkách převrstvených agarem

sloučenina z příkladu	100	20	Herpes simplex, Typ II		2	1
			10			
3 ^a	—	100%	100%		83	28

^a β -konfigurace

TABULKA 4

Inhibice plaků v % při koncentraci zkoumané látky v $\mu\text{g/ml}$ a BSC-1-buňkách, převrstvených agarem

sloučenina z příkladu	100	20	Polio Virus, Typ I		1	2
			10	2		
4	—	—	100%	100%	100%	—

TABULKA 5

Inhibice plaků v % při koncentraci zkoumané látky v $\mu\text{g/ml}$ a Hela-buňkách převrstvených agarem

sloučenina z příkladu	100	20	Herpes simplex, Typ II		2	1
			10			
3 ^a	100%	100%	100%		99%	80%
3 ^b	65	—	7%		—	—

^a β -konfigurace

^b α -konfigurace

TABULKA 6

Inhibice plaků v % při koncentraci zkoumané látky v $\mu\text{g/ml}$ a Hela-buňkách, převrstvených agarem

sloučenina z příkladu	100	20	Herpes Simplex, Typ I		1	2
			10	2		
3 ^a	—	100%	100%	99%	99%	42%
4	—	100% ^b	100% ^b	100%	98%	54%

^a β -koncentrace

^b pravděpodobně toxická

V tabulce 7 je uvedeno srovnání známých protiviřových látek se sloučeninami, vyrobenými způsobem podle vynálezu. Jde zejména o srovnání účinku produktu z příkladu 3 s Ara-A a cyklovirem v dávkách, v nichž působí 50% redukci růstu Herpes simplex, typ I. Tato dávka se označuje jako ID₅₀.

TABULKA 7

Inhibice (ID₅₀) viru Herpes simplex, typ I různými protiviřovými látkami

sloučenina	ID ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
produkt z příkladu 3 ^a	0,31
Ara-A	7,6
acyklovir	1,74
^a β -anomer	

Některé ze sloučenin, vyrobených způsobem podle vynálezu, byly vyhodnoceny in vitro na tkáňových kulturách tak, že po vypěstování vrstvy buněk na dně plotny byly buňky infikovány kmenem viru a pak převrstveny živným agarem. Pak byly na povrch agaru uloženy papírové kotouče, impregnované určitým množstvím zkoumané látky. Plotny byly inkubovány při teplotě 37 °C, pak byly buňky fixovány formalinem a zbarveny tetrachromem. Pak byly odečítány v milimetrech zóny inhibice. Morfologie buněk byla vyhodnocena stupnicí 0 až 4, přičemž nulou byly ohodnoceny zcela zničené buňky a hodnotou 4 buňky zcela normální.

Tabulka 8 uvádí výsledky těchto popisů. Sloučeniny byly použity v uvedených koncentracích, zóny inhibice jsou uvedeny v milimetrech. Čísla v závorkách s velikostí zóny je hodnocení morfologie buněk.

TABULKA 8

In vitro — sledování na tkáňové kultuře

Sloučenina z příkladu	Koncentrace impregnačního roztoku ($\mu\text{g/ml}$)	Polio III	Kmen viru		
			Herpes	Ann Arbor	Semliki Forest
4	5 000	—	65 (4)	—	—
	1 000	47 (4)	50 (4)	45 (4)	19 (4)
	500	44 (4)	45 (4)	40 (4)	17 (4)
	250	39 (4)	40 (4)	32 (4)	14 (4)
	125	34 (4)	37 (4)	24 (4)	10 (4)
	62,5	28 (4)	34 (4)	21 (4)	7 (3)
4	31,25	15 (4)	30 (4)	16 (4)	—
	25	15 (4)	27 (4)	—	—
	12,5	14 (3)	24 (4)	—	—
	6,25	9 (1)	20 (4)	—	—
	3,13	—	15 (4)	—	—
	1,56	—	9 (4)	—	—
	0,78	—	7 (2)	—	—

Příklad 7

1-(5-methyl-2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorribóza

5,4 g 3,5-bis(terc.butyl-dimethylsilyloxy)-1-methansulfonyloxy-2-desoxy-2,2-difluorribózy a 5,4 g 5-methyl-2,4-bis(trimethylsilyloxy)pyrimidinu se smísí a zahřívá v dusíkové atmosféře za stálého míchání hodinu na teplotu 100 °C a pak ještě hodinu na teplotu 150 °C. Pak se směs zchladí na teplotu místnosti a zředí se 25 ml vody a 10 ml methanolu. Suspenze se zfiltruje přes vrstvu infusoriové hlínky a filtrační koláč se promyje acetonem. Filtrát se odpaří ve vakuu, čímž se získá 5,3 g olejovitého zbytku, který se rozpustí v 10 ml acetonu a získaný roztok se nanese na vrchol sloupce o průměru 4,5 cm s náplní 80 g silikagelu. Pak se sloupec promývá směsí dichlormethanu, methanolu a triethylaminu v poměru 15 : 1 : 1.

Prvních 100 ml eluentu se odloží, dalších 300 ml se odpaří ve vakuu, čímž se získá 4,1 g sirupovitého surového produktu, který se rozpustí ve 40 ml acetonu. Roztokem se nechá hodinu probublávat chlorovodík a pak ještě hodinu bromovodík. Pak se roztok odpaří při teplotě 62 °C, čímž se získá 4,4 g tmavého olejovitého výsledného produktu.

Tento produkt se rozpustí v 10 ml teplé směsi dichlormethanu a kyseliny octové v poměru 3 : 1 a roztok se nanese na sloupec o průměru 4,5 cm s náplní 45 g silikagelu. Nejprve se sloupec promývá 1 000 ml směsí dichlormethanu a kyseliny octové v poměru 3 : 1 a pak čistou kyselinou octovou. Většina výsledného produktu se nachází mezi 1 000 a 1 400 ml eluentu, jak je možno prokázat chromatografií na tenké vrstvě silikagelu při použití směsi dichlormethanu a methanolu v objemovém poměru 15 : 1. Tyto frakce se slíjí a odpaří ve vakuu, odparek se rozpustí v 15 ml chladného acetonu a

roztok se zfiltruje. Filtrát se odpaří ve vakuu na olejovitou kapalinu, která se rozpustí v 5 ml acetonu a roztok se pak chromatografuje na 20 g silikagelu při použití směsi dichlormethanu a methanolu v objemovém poměru 15 : 1. Frakce s obsahem produktu se slíjí a odpaří ve vakuu, čímž se získá 300 mg polotuhé látky. Tento produkt se rozpustí v 5 ml acetonu, roztok se zfiltruje a filtrát se odpaří ve vakuu, čímž se získá 230 mg světlehnědé polotuhé pevné látky. Tento produkt se rozpustí v 10 ml nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a vzniklý roztok se dvakrát extrahuje vždy 15 ml diethyletheru. Vodná fáze se odpaří ve vakuu, odparek se uvede do suspenze v acetonu, suspenze se zfiltruje a filtrát se odpaří ve vakuu, čímž se získá 140 mg výsledného produktu (viskózní slabě zakalený olej).

V následujícím příkladě je popsán výhodný způsob izolace sloučenin, vyrobených podle vynálezu.

Příklad 8

1-(5-methyl-2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorribóza

K 80,0 g 3,5-bis(terc.butyl-dimethylsilyloxy)-1-methansulfonyloxy-2-desoxy-2,2-difluorribózy se v dusíkové atmosféře přidá 1,4 l čerstvě destilovaného methylenchloridu a 49,5 g 5-methyl-2,4-bis(trimethylsilyloxy)pyrimidinu. K této směsi se přidá 44,8 g trifluormethansulfonyloxytrimethylsilanu a směs se zahřívá na teplotu varu pod zpětným chladičem přibližně 3¼ hodiny. Pak se reakční směs míchá přes noc při teplotě místnosti a pak se přidá 41,6 ml methanolu. Výsledná směs se míchá přibližně 30 minut a vysrážená pevná látka se pak oddělí filtrací. Filtrát se odpaří ve vakuu při teplotě 45 °C za vzniku tmavě zbarvené olejovité

kapaliny, která se rozpustí v 500 ml methylenchloridu, nasyceného bezvodým bromovodíkem. Výsledná suspenze se míchá přibližně 3 hodiny, načež se těkavý podíl oddestiluje ve vakuu při teplotě 45 °C. Odparek se rozpustí ve 100 ml 10% hydrogenuhlitanu sodného a 100 ml diethyletheru. Vodná vrstva se oddělí a odpaří se ve vakuu při teplotě 50 °C, čímž se získá odparek, který se třikrát rozetře vždy se 100 ml horkého ethylacetátu. Organické vrstvy se spojí a odpaří se ve vakuu při teplotě 45 °C, čímž se získá odparek, který se rozpustí v 50 ml vody. Vzniklý roztok se chromatografuje po podílech 10 ml na sloupci Waters Prep 500 C¹⁸ v reverzní fázi při použití směsi vody a methanolu jako elučního činidla v objemovém poměru 9 : 1. Tímto způsobem se získá 2,21 g 1-(5-methyl-2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorribózy.

NMR (CD₃OD, 90 MHz) δ :

1,9 (s, 3H),
3,65 až 4,65 (m, 4H),
4,83 (s, 3H),
6,12 (dd, J = 7 Hz, 1/2 Hz, 1H),
7,70 (s, 1H).

Hmotové spektrum m/e = 278 = p.

Příklad 9

1-(2-oxo-4-amino-1H-pyrimidin-1-yl)-
-2-desoxy-2,2-difluorxylóza

V dusíkové atmosféře se k 23 g 3,5-bis-(terc.butylidimethylsilyloxy)-1-methan sulfonyloxy-2-desoxy-2,2-difluorxylózy přidá 23 g tris(trimethylsilyl)cytosinu a 300 ml methylenchloridu. Ke vzniklé směsi se přidá 10,84 g trifluormethansulfonyloxytrimethylsilanu a směs se zahřívá přibližně 16 hodin na teplotu varu pod zpětným chladičem. Pak se směs zchladí na teplotu místnosti a přidá se k ní 20 ml methanolu. Roztok se energicky míchá při teplotě místnosti a vysrážená pevná látka se oddělí filtrací. Pak se k organické vrstvě přidá 100 ml vody a suspenze se 30 minut energicky míchá. Organická vrstva se oddělí a odpaří se do sucha za sníženého tlaku, čímž se získá 11,2 g hnědého oleje. Tento odparek se rozpustí v 97 ml methanolu, k němuž se přidá 33 g kationtoměničové pryskyřice Bio Rad AG 50X8. Suspenze se míchá přibližně 16 hodin při teplotě místnosti a pak se pryskyřice oddělí filtrací. Pryskyřice se promyje 50 mililitry methanolu a energicky se míchá v 100 ml methanolu a 100 ml hydroxidu amonného. Tento postup se ještě dvakrát opakuje, načež se filtráty slíjí a odpaří ve vakuu při teplotě 50 °C na 2,09 g žlutého odparku. Tento odparek se uvede do suspenze ve 25 ml vody a energicky se míchá 15 minut. Nerozpustný podíl se oddělí filtrací, čímž se získá 0,25 g pevné látky, která se označí jako sloučenina A. Pak se filtrát od-

paří ve vakuu při teplotě 50 °C, čímž se získá 0,86 g sloučeniny, která se označí jako sloučenina B. Sloučenina A se rozpustí ve 20 ml methanolu a roztok se 3 dny míchá s pryskyřicí Bio Rad AG 50WX8 při teplotě místnosti. Pak se pryskyřice odfiltruje a uvede se do suspenze ve 30 ml roztoku methanolu a hydroxidu amonného a objemovým poměru 1 : 1. Pak se pryskyřice znovu zfiltruje a filtrát se odpaří ve vakuu při teplotě 50 °C, čímž se získá 0,14 g 1-(2-deoxy-2,2-difluor- β -D-xylofuranosyl)cytosinu.

NMR (CD₃OD, 90 MHz) δ :

3,72 až 4,34 (m, 4H),
4,78 (s, 4H),
5,86 (d, J = 8 Hz, 1H),
6,17 (d, J = 15 Hz, 1H),
7,78 (d, J = 8 Hz, 1H).

Hmotové spektrum = 263 = p.

Sloučenina B se chromatografuje na sloupci Whatman 50 cm ODS-3 v reverzní fázi při použití směsi vody a methanolu v objemovém poměru 1 : 1 jako elučního činidla, čímž se získá 0,06 g 1-(2-deoxy-2,2 difluor- α -D-xylofuranosyl)cytosin.

NMR (CD₃OD, 90 MHz) δ :

3,53 až 3,9 (m, 2H),
4,1 až 4,57 (m, 2H),
4,83 (s, 4H),
5,9 (d, J = 8 Hz, 1H),
6,3 (dd, J = 7 Hz, 1H),
7,55 (d, J = Hz, 1H).

Hmotové spektrum m/e = 263 = p.

Příklad 10

1-(2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl)-
-2-desoxy-2,2-difluorribóza

Roztok 0,19 g 1-(2-oxo-4-amino-1H-pyrimidin-1-yl)-2-desoxy 2,2-difluorribózy v 16 mililitrech ledové kyseliny octové a 4 ml vody se zahřívá na teplotu varu pod zpětným chladičem přibližně 24 hodin. Reakční směs se zchladí na teplotu místnosti a těkavé složky se odstraní ve vakuu při teplotě v rozmezí 60 až 70 °C. Odparek se několikrát odpaří s 5 ml toluenu. Pak se odparek rozpustí ve 12 ml methanolu a výsledný roztok se zchladí v lázni s ledem a solí na teplotu přibližně -15 °C. Pak se roztok nasytí bezvodým amoniakem a míchá se přes noc při teplotě místnosti. Těkavý podíl se odpaří za sníženého tlaku při teplotě 45 °C a odparek se uvede do suspenze v 5 ml horké vody. Nerozpustný materiál se oddělí filtrací a filtrát se chromatografuje na sloupci Whatman 50 cm Partisil ODS-3 v reverzní fázi při použití směsi vody a methanolu v objemovém poměru 9 : 1 jako elučního činidla, čímž se získá 0,05 g produktu, který obsa-

huje malé stopy nezreagovaného výchozího materiálu. Tento nezreagovaný výchozí materiál se oddělí tak, že se roztok pevné látky v 5 ml methylenchloridu s obsahem 10 procent methanolu nechá projít Waters Silica Sep-Pak. Eluent se odpaří ve vakuu při teplotě 45 °C, čímž se získá 0,036 g 1-(2,4-dioxo-1H,3H-pyrimidin-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorribózy.

NMR (CD₃OD, 90 MHz) δ :

3,54 až 4,48 (m, 4H),
4,83 (s, 3H),
5,69 (d, J = 8 Hz, 1H),
6,10 (dd, J = 7 Hz, 9 Hz, 1H),
7,8 (d, J = 8 Hz, 1H).

Hmotové spektrum m/e = 264 = p.

Příklad 11

1-(5-methyl-2-oxo-4-amino-1H-pyrimidin-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorribóza

V dusíkové atmosféře se zahřívá roztok 1,86 g 3,5-bis(terc.butyldimethylsilyloxy)-1-methansulfonyloxy-2-desoxy-2,2-difluorribózy, 1,87 g tris(trimethylsilyl)cytosinu a 1,34 g trifluormethansulfonyloxytrimethylsilanu ve 37 ml bezvodého methylenchloridu přes noc pod zpětným chladičem. Reakční směs se zchladí na teplotu místnosti a přidá se 1 ml methanolu. Vyšrážený pevný podíl se oddělí filtrací a filtrát se odpaří ve vakuu na teplotu 45 °C. Odparek se rozpustí v přibližně 20 ml vody a získaný roztok se odpaří na přibližně polovinu svého původ-

ního objemu ve vakuu při teplotě 50 °C. Vytvoří se sraženina, která se oddělí filtrací ve vakuu a filtrát se ve vakuu odpaří při teplotě 50 °C. Odparek se několikrát rozetře vždy s 10 ml teplého acetonu. Organické extrakty se slíjí a odpaří do sucha ve vakuu při teplotě 45 °C, čímž se získá 1,67 g žlutého oleje, který se rozpustí v 15 ml směsi methanolu a vody v objemovém poměru 2 : 1 a pak se míchá přes noc s 5 g Bio Rad AG 50WX8. Suspenze se nasýtí bezvodým amoniakem a míchá přibližně 10 minut. Prskyřice se oddělí filtrací ve vakuu a uvede se do suspenze ve 30 ml směsi methanolu a amoniaku v objemovém poměru 1 : 1. Vzniklá suspenze se míchá přibližně 10 minut. Pak se prskyřice oddělí filtrací, alkalické filtráty se slíjí a odpaří se ve vakuu při teplotě 50 °C, čímž se získá 1,5 g oranžově zbarvené olejovité kapaliny. Tento olej se rozpustí v 10 ml vody a vzniklý roztok se chromatografuje po podílech 2 ml na sloupci Whatman Partisil ODS-3 50 cm Prep v reverzní fázi při použití vody jako elučního činidla, čímž se získá 0,07 g 1-(5-methyl-2-oxo-4-amino-1H-pyrimidin-1-yl)-2-desoxy-2,2-difluorribózy.

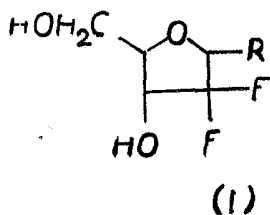
NMR (CD₃OD, 90 MHz) δ :

1,94 (s, 3H),
3,53 až 4,62 (m, 4H),
4,75 (s, 4H),
6,17 (t, J = 8 Hz, 1H),
7,67 (s, 1H).

Hmotové spektrum m/e = 277 = p.

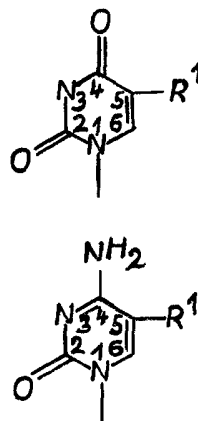
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby 2,2-difluornukleosidu obecného vzorce I

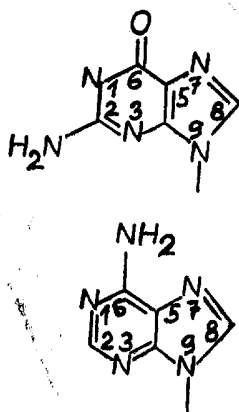


kde

R znamená některou ze skupin



29

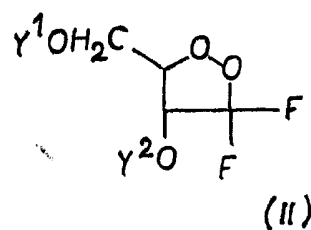


kde

R¹ znamená atom vodíku, methylový zbytek, atom fluoru nebo jodu,

jakož i soli těchto sloučenin, přijatelných z farmaceutického hlediska, vyznačující se tím, že se uvede v inertním organickém rozpouštědle při teplotě místnosti až teplotě 200 °C v reakci sloučenina obecného vzorce II

30



kde

Q znamená skupinu CHX, kde X znamená snadno odštěpitelnou skupinu a

Y¹ a Y² znamená nezávisle na sobě atom vodíku nebo ochrannou skupinu na hydroxyskupině se zásadou vzorce R—H, kde R má svrchu uvedený význam, a popřípadě se odstraní ochranné skupiny.