

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

264456

(11) (B1)

(13)

(51) Int. Cl.⁴

C 07 H 19/12

(22) Přihlášeno 28 08 87

(21) PV 6306-87.L

(40) Zveřejněno 17 10 88

(45) Vydáno 15 11 89

(75)

Autor vynálezu

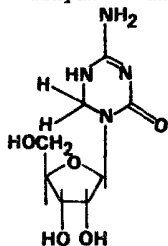
PÍSKALA ALOIS RNDr. CSc., ČESNEKOVÁ BARBARA, VESELÝ JIŘÍ DrSc., PRAHA

(54) **Způsob výroby 5,6-dihydro-5-azacytidinu**

(57) Řešení se týká nového způsobu výroby 5,6-dihydro-5-azacytidinu redukcí 5-azacytidinu práškovým zinkem v prostředí bezvodé karboxylové kyseliny. Vyráběná látka vykazuje protinádorový účinek.

CS 264 456 B1

Vynález se týká způsobu výroby 5,6-dihydro-5-azacytidinu vzorce I



(I),

který lze převést běžným způsobem na adiční sůl s netoxickou anorganickou či organickou kyselinou.

5,6-dihydro-5-azacytidin vzorce I je analogem cytidinu, od něhož se dá formálně odvodit záměnou skupiny CH v poloze 5 pyrimidinového jádra isoelektronickým atomem dusíku a následovnou adicí vodíku na dvojnou vazbu v poloze 5,6 triazinového kruhu. Dihydroderivát vzorce I je na rozdíl od 5-azacytidinu stabilní ve vodných roztocích v širokém rozmezí pH a je také podstatně lépe rozpustný ve vodě.

5,6-dihydro-5-azacytidin vzorce I, používaný běžně ve formě hydrochloridu, je fosforylován uridin-cytidinkinase z L1210 a HeLa buněk, třebaže méně účinně než 5-azacytidin [B. F. Terman a spol.: Biochem. Pharmacol. 27, 907 (1978)]. Je také inkorporován do jaderné RNA buněk L1210 na stejné nebo vyšší úrovni než 5-azacytidin [R. Glazer a spol.: Mol. Pharmacol. 17, 111 (1980)]. Studie účinků dihydroderivátu vzorce I na expresi genů naznačují, že tento nukleosid je také inkorporován do DNA a inhibuje metylaci DNA, třebaže jeho účinnost je nižší než v případě 2'-deoxy-5-azacytidinu. Původně se předpokládalo, že mechanismus účinku dihydroderivátu vzorce I je podobný jako u 5-azacytidinu [R. Glazer a spol.: Mol. Pharmacol. 17, 250 (1980)]. Avšak současný výzkum naznačuje, že biochemický podklad cytotoxického účinku těchto nukleosidů může být zcela odlišný [J. M. Covey a spol.: Cancer Res. 46, 5 511 (1986)]. Novější poznatky o mechanismu biologického působení 5,6-dihydro-5-azacytidinu vzorce I jsou shrnuty v přehledném referátu [J. Veselý: Pharmac. Ther. 28, 227 (1985)].

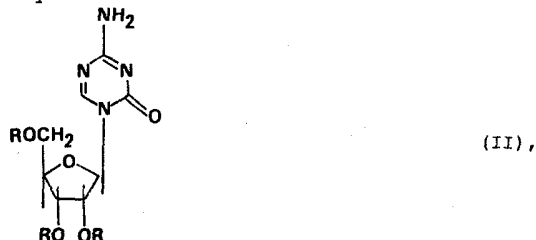
5,6-dihydro-5-azacytidin vzorce I vykazuje reprodukovatelnou aktivitu proti myši L1210 a P388 leukémii. Je také účinný proti buňkám lidského mamárního karcinomu MX-1, transplantovaného athymickým myším. Dále je látka účinná proti myším mamárnímu karcinomu CD8F a podkožně implantovanému nádoru tlustého střeva 38. Dihydroderivát vzorce I byl také podroben klinickým zkouškám [G. A. Curt a spol.: Cancer Res. 45, 3 359 (1985)].

Hydrochlorid 5,6-dihydro-5-azacytidinu vzorce I byl poprvé připraven redukcí 5-azacytidinu borhydridem sodným a následnou kyselou hydrolyzou získaného komplexu s boritou kyselinou v celkově 67% výtěžku [J. A. Beisler a spol.: J. Med. Chem. 20, 806 (1977)]; USA pat. č. 4 058 602]. Volný dihydroderivát vzorce I byl uvedenými autory získán z jeho hydrochloridu v dobrém výtěžku působením vodného amoniaku nebo, taktéž v dobrém výtěžku, použitím silně basického anexu v OH⁻ formě.

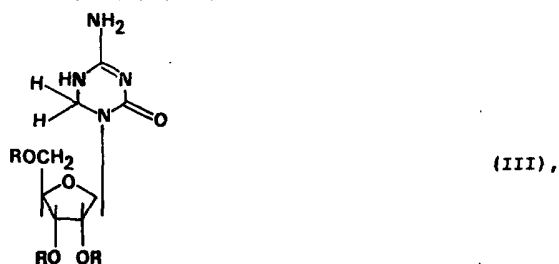
Uvedená příprava dihydroderivátu vzorce I je poměrně zdlouhavá, používá dosti drahého redukčního činidla a také celkový výtěžek je poměrně nízký, což z výrobního hlediska předstává vzhledem k vysoké ceně výchozího 5-azacytidinu značné ztráty. Podrobným výzkumem chemické redukce 5-azacytidinu bylo zjištěno, že se tato reakce dá provést v krátké době a téměř beze ztrát použitím práškového zinku v bezvodé octové kyselině. Produkt se dá ve formě soli s octovou kyselinou zachytit na sloupci silně kyselého katexu v NH₄⁺ formě a po vymytí octanu amonného vodou se látka uvolní ze sloupce zředěným roztokem vodného amoniaku. Takto byl dihydroderivát vzorce I získán ve velmi čisté formě a v konsistentně vysokých výtěžcích (94 až 99 %). 5,6-dihydro-5-azacytidin (I) se dá výhodně připravit také redukcí 2',3',5'-tri-O-acyl-5-azacytidinu práškovým zinkem v octové kyselině a následným odstraněním chránících skupin získaného 2',3',5'-tri-O-acyl-5,6-dihydro-5-azacytidinu, nebo jeho adiční soli s organickou či anorganickou kyselinou, methanolýzou. Touto strategií

se zabrání ztrátám (20 až 30%), ke kterým dochází již při výrobě nestálého 5-azacytidinu z jeho 2',3',5'-tri-O-acylderivátu. Ztráty při odstraňování acylových skupin z 2',3',5'-tri-O-acyl-5,6-dihydro-5-azacytidinu jsou vzhledem ke stabilitě tohoto nukleosidu podstatně menší.

Podstata způsobu výroby 5,6-dihydro-5-azacytidinu vzorce I podle vynálezu spočívá v tom, že se volný nebo blokovaný 5-azacytidin obecného vzorce II



kde R je vodík nebo acyl, redukuje práškovým zinkem v bezvodé karboxylové kyselině s 1 až 4 atomy uhlíku a v případě použití sloučeniny vzorce II, kde R je acyl, se vzniklý 2',3',5'-tri-O-acyl-5,6-dihydro-5-azacytidin obecného vzorce III



kde R je acyl, případně jeho adiční sůl s organickou či anorganickou kyselinou, podrobí alkoholýze a získaný 5,6-dihydro-5-azacytidin vzorce I se v případě potřeby převede běžným způsobem na adiční sůl s netoxickou anorganickou či organickou kyselinou.

Redukce probíhá velmi rychle již při teplotě místnosti za použití pěti až desetinásobku teoretického množství práškového zinku. Reakce probíhá pomaleji i při nižších teplotách. Použití vyšších teplot vede v důsledku částečné degradace triazinového jádra ke snižování výtěžků. Isolace volného dihydroderivátu vzorce I se provádí s výhodou ionexovou technikou. Jako karboxylová kyselina se osvědčila komerčně dobře dostupná kyselina octová. Jelikož blokovaný 5-azacytidin je citlivější vůči hydrolýze než volný 5-azacytidin, je vhodné redukcí blokovaných nukleosidů provádět ve směsi karboxylové kyseliny a 2,2-dimethoxypropanu, který zaručuje bezvodnost reakčního prostředí. Isolace blokovaného nukleosidu vzorce III se provádí s výhodou vytřepáváním do chloroformu a převedením na adiční sůl s organickou či anorganickou kyselinou.

Alkoholýza 2',3',5'-tri-O-acyl-5,6-dihydro-5-azacytidinu, vzorce III, případně jeho adiční soli s anorganickou nebo organickou kyselinou, se provádí roztokem alkoxidu alkalického kovu v alkanolu s 1 až 6 atomy uhlíku, s výhodou methoxidem sodným v methanolu.

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

P ř í k l a d 1

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

Směs kyseliny octové (5 ml) a 2,2-dimethoxypropanu (2 ml) se ponechá 24 hodin stát při teplotě místnosti v uzavřené baňce. Pak se přidá postupně práškový zinek (0,65 g) a 2',3',5'-tri-O-benzoyl-5-azacytidin (0,556 g; 1 mmol). Směs se 2,5 hodiny intenzivně magne-

tický míchá při teplotě místnosti a odsaje přes fritu. Materiál na fritě se promyje postupně kyselinou octovou, methanolem a bohatě směsí chloroform-methanol (9:1). Spojené filtráty se vytřepou postupně vodou a 5% roztokem kyselého uhličitanu sodného. Organická vrstva se po vysušení (MgSO_4) a přidání kyseliny octové (0,1 ml) odpaří ve vakuu. Krystalizací zbytku ze směsi methanol-petrolether se získá po zpracování matečných louhů celkem 0,515 g (85%) acetátu 2',3',5'-tri-O-benzoyl-5,6-dihydro-5-azacytidinu; t.t. 132 až 136 °C (rozklad).

P ř í k l a d 2

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

2',3',5'-tri-O-benzoyl-5-azacytidin (0,556 g; 1 mmol) se podrobí redukci postupem dle příkladu 1. Ke chloroformovému roztoku surového produktu se přidá 0,7% roztok chlorovodíku v methanolu (5 ml) a vyloučený produkt se po hodinovém stání při teplotě místnosti odsaje a promyje chloroformem. Získá se 0,516 g (86,7%) hydrochloridu 2',3',5'-tri-O-benzoyl-5,6-dihydro-5-azacytidinu; t.t. 254 až 259 °C (rozklad).

P ř í k l a d 3

Příprava 5,6-dihydro-5-azacytidinu

Směs acetátu 2',3',5'-tri-O-benzoyl-5,6-dihydro-5-azacytidinu (0,309 g; 0,5 mmol), methanolu (3 ml) a methanolickeho 1M- NaOCH_3 (1 ml) se 24 hodin magneticky míchá při teplotě místnosti. Směs se okyselí kyselinou octovou (0,1 ml) a odpaří ve vakuu. Zbytek se promyje petroletherem a rozpustí ve vodě. Roztok surového produktu se nanese na sloupec silně kyselého katexu v NH_4^+ formě (10 ml) a sloupec se promyje vodou (150 ml). Produkt se ze sloupce vymyje 1M- NH_4OH (75 ml) a eluát se odpaří ve vakuu při 35 až 40 °C (teplota lázně). Krystalizací zbytku ze směsi methanol-voda-ether se po zpracování matečných louhů celkem získá 0,110 g (89,5%) 5,6-dihydro-5-azacytidinu; t.t. 217 až 221 °C (rozklad).

P ř í k l a d 4

Příprava 5,6-dihydro-5-azacytidinu

Hydrochlorid 2',3',5'-tri-O-benzoyl-5,6-dihydro-5-azacytidinu (0,298 g; 0,5 mmol) se methanolýzuje postupem dle příkladu 3. Získá se celkem 0,112 g (91%) 5,6-dihydro-5-azacytidinu; t.t. 217 až 221 °C (rozklad).

P ř í k l a d 5

Příprava 5,6-dihydro-5-azacytidinu

Směs 5-azacytidinu (4,88 g; 0,02 mmol), kyseliny octové (100 ml) a práškového zinku (13 g) se 24 hodin magneticky míchá při teplotě místnosti. Nerozpustný podíl se odsaje a promyje postupně kyselinou octovou a bohatě methanolem. Spojené filtráty se odpaří ve vakuu při 35 až 40 °C (teplota lázně), zbytek se rozpustí ve vodě a roztok nanese na sloupec silně kyselého katexu v NH_4^+ formě (110 ml) a sloupec se promyje vodou (1 500 ml). Produkt se vymyje 1M- NH_4OH (750 ml) a eluát se odpaří ve vakuu při 35 až 40 °C (teplota lázně). Krystalizací zbytku ze směsi methanol-voda-ether se po zpracování matečných louhů celkem získá 4,56 g (93,5%) 5,6-dihydro-5-azacytidinu; t.t. 216 až 221 °C (rozklad). Poslední matečný louh se nanese na sloupec slabě basickeho anexu v OH^- formě (20 ml), látka se vymyje vodou (200 ml) a eluát se odpaří ve vakuu. Krystalizací zbytku z uvedené směsi rozpouštědel se získá dalších 0,250 g (5,1%) produktu; t.t. 216 až 221 °C (rozklad).

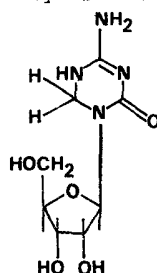
P ř í k l a d 6

Příprava hydrochloridu 5,6-dihydro-5-azacytidinu

Roztok 5,6-dihydro-5-azacytidinu (2,46 g; 0,01 mol) ve vodě (100 ml) se neutralizuje 1N-HCl (10 ml) a odpaří ve vakuu při 35 až 40 °C (teplota lázně). Krystalizací zbytku z methanolu se ve třech podílech získá celkem 2,69 g (95,2%) hydrochloridu 5,6-dihydro-5-azacytidinu; t.t. 185 až 189 °C (rozklad).

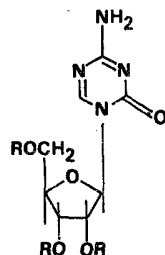
P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob výroby 5,6-dihydro-5-azacytidinu vzorce I



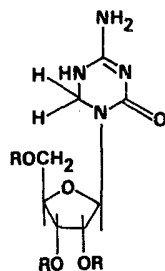
(I),

a jeho adičních solí s netoxickými anorganickými či organickými kyselinami, vyznačený tím, že se volný nebo blokový 5-azacytidin obecného vzorce II



(II),

kde R je vodík nebo acyl, redukuje práškovým zinkem v bezvodé karboxylové kyselině s 1 až 4 atomy uhlíku a v případě použití sloučeniny obecného vzorce II, kde R je acyl, se vzniklý 2',3',5'-tri-O-acyl-5,6-dihydro-5-azacytidin obecného vzorce III



(III),

kde R je acyl, případně jeho adiční sůl s anorganickou či organickou kyselinou, podrobí alkoholýze a získaný 5,6-dihydro-5-azacytidin vzorce I se v případě potřeby převede na adiční sůl s netoxickou anorganickou či organickou kyselinou.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se redukce sloučeniny obecného vzorce II provádí pěti až desetinásobkem teoretického množství práškového zinku v prostředí kyseliny octové při teplotě místnosti.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se redukce sloučeniny obecného vzorce II, kde R je acyl, provádí v přítomnosti nadbytku 2,2-dimethoxypropanu.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se 2',3',5'-tri-O-acyl-5,6-dihydro-5-azacytidinu, obecného vzorce III izoluje ve formě adiční soli s anorganickou či organickou kyselinou, s výhodou ve formě adiční soli s chlorovodíkem nebo kyselinou octovou.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se alkoholýza sloučeniny obecného vzorce III, případně její adiční soli s anorganickou nebo organickou kyselinou, provádí roztokem alkoxidu alkalického kovu v alkanolu s 1 až 6 atomy uhlíku, s výhodou methoxidem sodným v methanolu.