



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

220430

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 15 01 80
(21) (PV 302-80)

(51) Int. Cl.³
C 07 H 19/12

(40) Zveřejněno 15 09 82

(45) Vydáno 15 04 85

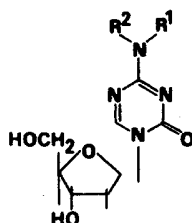
(75)
Autor vynálezu

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

(54) Způsob přípravy 2'-deoxy-5-azacytidinů

1

Vynález se týká způsobu přípravy 2'-deoxy-5-azacytidinů obecného vzorce I



(I)

kde R¹ a R² jsou stejné nebo různé a značí vodík nebo alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku.

Nejvýznamnější látkou uvedeného typu je pyrimidinový antimetabolit 2'-deoxy-5-azacytidin-[4-amino-1(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)-s-triazin-2(1H)-on], který podobně jako 5-azacytidin brzdí růst bakterií již v nízkých koncentracích a má výrazné kancerostatické účinky. Nejvyšší afinitu k této látce jeví lymfatický systém, takže se nabízí jeho klinické použití u nádorů lymfatické tkáně. Biologickou aktivitu vykazují i když v menší míře také N⁴-alkylderiváty 5-azacytidinu a totéž lze předpokládat u odpovídajících deoxyanalogů. Látky obecného vzorce I se mohou dále uplatnit jako nástroje biochemického, farmakologického a molekulárně biologického výzkumu.

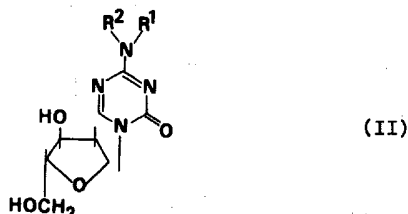
2'-Deoxy-5-azacytidin se dá připravit podle československých patentů č. 116 297 a č. 139 542. Syntéza této látky byla dále předmětem řady publikací [Fliml, Šorm: Collect.

220430

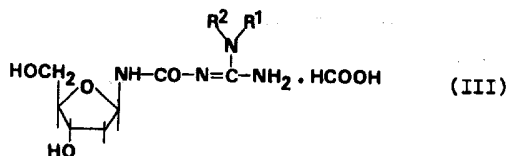
Czech. Chem. Commun. **22**, 2 576 (1964); Winkley, Robins: J. Org. Chem. **35**, 491 (1970); Niedballa, Vorbrüggen: J. Org. Chem. **32**, 3 672 (1974), Piskala a spol.: Nucleic Acids Res., Special Publication No 4, s 109 (1978) a Piskala, Šorm: Nucleic Acid Chemistry (L. B. Townsend, R. S. Tipson, eds.), Part 1, 443 (1978)]. V uvedených pracích jsou aplikovány různé varianty dvou zásadně odlišných obecných přístupů, kterými byl již dříve připraven 5-azacytidin. První z nich spočívá v několikastupňové syntéze vycházející z 3,5-di-O-p-toluoyl-2-deoxy-D-erythro-pentosylisokyanátu a druhý v přímé deoxyribosylaci silylovaného 5-azacytosinu. Jelikož sterický průběh deoxyribosylací není řízen jako u ribosylací sousední acyloxyskupinou, vznikají všemi uvedenými postupy směsi alfa a beta-anomerů. Při isokyanátovém postupu sice ve směsi značně převažuje žádaný beta-anomer, avšak výroba je zdlouhavá. Kratší a preparativně výhodnější je přímá deoxyribosylace katalysovaná Lewisovými kyselinami, kdy vzniká ve vysokém výtěžku anomerní směs v níž mírně převládá β -anomer. Dělení obou anomerů se provádí s výhodou na úrovni volných nukleosidů, přičemž podstatně méně rozpustný beta-anomer se vylučuje přednostně. Preparativní výtěžky 2'-deoxy-5-azacytidinu se v tomto posledním stupni pohybují v rozmezí 25 - 30 %. Zpracováním matečných luhů se dále získá ve 45 - 50% výtěžcích surový krystalický alfa-anomer, který je biologicky málo účinný a je proto v podstatě bezcenným odpadem.

Studium hydrolyzy 2'-deoxy-5-azacytidinu a jeho alfa-anomeru se nyní dospělo k velice překvapivému zjištění, že reakcí se zředěným amoniakem při teplotě místnosti poskytují oba anomery prakticky kvantitativně stejnou směs formiátů N-amidino-N'-(2-deoxy-D-erythro-pentofuranosyl)močoviny, v níž značně převládá beta-anomer. Dále bylo zjištěno, že tyto formiáty lze přímo, bez uvolňování uvedených amidinomočoviny cyklokondenzovat s dimethylacetalem dimethylformamidu v dobrém výtěžku na 2'-deoxy-5-azacytidin. Vedlejším produktem je přitom opět alfa-anomer, který se dá bez izolace použít v dalším cyklu znovu k přípravě 2'-deoxy-5-azacytidinu. Dvojnásobným opakováním tohoto cyklu je možno dosáhnout až 60% konverze alfa-anomeru na 2'-deoxy-5-azacytidin. Prakticky se tím zdvojnásobí celkový výtěžek této látky počítáno na 2-deoxyribosu, která je nejdražší výchozí surovinou. Uvedený postup je jednoduchý, krátký a nevyžaduje žádného speciálního zařízení. Vzhledem k vysoké ceně 2'-deoxy-5-azacytidinu znamená použití tohoto postupu značné zvýšení efektivity výroby této látky. Na stejném principu lze vyrábět také N⁴-alkylderiváty 2'-deoxy-5-azacytidinu.

Předmětný vynález způsobu přípravy 2'-deoxy-5-azacytidinů obecného vzorce I spočívá v hydrolyze alfa-anomerů 2'-deoxy-5-azacytidinů obecného vzorce II,



kde R¹ a R² značí totéž co ve vzorci I, na formiáty N-amidino-N'-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)močoviny obecného vzorce III



kde R¹ a R² značí totéž co ve vzorci I, které se poté cyklokondenzují dialkylacetalem dimethylformamidu v alkanolu s 1 až 4 atomy uhlíku.

Hydrolyza alfa-anomerů obecného vzorce II na formiáty amidinomočoviny obecného vzorce III probíhá velmi rychle již při teplotě místnosti v alkalickém prostředí. Z preparativního hlediska je vhodné přitom používat zředěných roztoků těkavých bází. Dobře se osvědčil zředěný roztok amoniaku. Jelikož při odpařování zčásti uniká hydrolyzou vzniklá kyselina mravenčí, je vhodné k dosažení vysokých preparativních výtěžků přidat ke směsi před krystalizací 10 - 20 % teoretického množství kyseliny mravenčí. Výtěžky formiátů amidinomočoviny vzorce III se pohybují v rozmezí 92 - 98 %. Tyto intermediáty nejsou stéricky zcela jednotné a obsahují i menší množství odpovídajících alfa-anomerů. V dalším stupni syntézy se však dají použít přímo, bez dalšího čištění.

Cyklokondenzace amidinomočoviny obecného vzorce III se provádí v prostředí alkanolu s 1 až 4 atomy uhlíku a používá se dialkylacetátů dimethylformamidu, jejichž alkylový zbytek obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku. S výhodou se tato reakce provádí dimethylacetátem dimethylformamidu v prostředí methanolu. Dobrých výsledků lze dosáhnout použitím 1,5 - 2,5 molekulivalentu dialkylacetátu dimethylformamidu. Cyklokondenzaci je možno provádět v širokém rozmezí teplot od 0 °C až do teploty varu odpovídajícího alkanolu. Velice dobře se osvědčilo provádět reakci při teplotě místnosti. Vzhledem k tomu, že amidinomočoviny obecného vzorce III během reakce ještě před cyklizací mění anomerní konfiguraci, vznikají uvedeným postupem zčásti i výchozí alfa-anomery vzorce II, které však lze bez dalšího čištění použít znovu pro přípravu 2'-deoxy-5-azacytidinu vzorce I. Opakováním výrobního cyklu se dá dosáhnout dobrých výtěžků žádaných beta-anomerů.

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

Příklad 1

Příprava formiátu N-amidino-N'-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)močoviny

Roztok 2,28 g čistého alfa-anomeru 2'-deoxy-5-azacytidinu t. t. 182 - 183 °C (rozklad) ve 200 ml vodného 1M amoniaku se ponechá 1 h stát při teplotě místnosti a pak se odpaří ve vakuu. Zbytek se důkladně rozmíchá s 10 ml ethanolu a krystalický produkt se odsaje. Matečný loup se zahustí na malý objem, přidá se 0,1 ml kyseliny mravenčí a směs se ponechá v lednici přes noc. Druhý podíl se odsaje a promyje ledově studeným ethanollem. Po vysušení na vzduchu se získá celkem 2,55 g, tj. 96 % formiátu N-amidino-N'-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)močoviny, t. t. 153 - 156 °C (rozklad). Tento produkt je možno bez dalšího čištění použít pro následující přípravu 2'-deoxy-5-azacytidinu. Rekrystalizací z methanolu se získá zcela čistý produkt o teplotě tání 160 - 162 °C (rozklad).

Příklad 2

Roztok 2,28 g surového alfa-anomeru 2'-deoxy-5-azacytidinu [t. t. 165 - 176 °C (rozklad)] se hydrolyzuje stejným postupem jak uvedeno v příkladu 1. Získá se 2,50 g, tj. 94 % formiátu N-amidino-N'-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)močoviny; t. t. 152 - 156 °C (rozklad).

Příklad 3

Roztok 2,28 g odparku matečných loupů po přípravě 2'-deoxy-5-azacytidinu (viz příklad 4) se hydrolyzuje postupem uvedeným v příkladu 1. Získá se 1,54 g tj. 58 % formiátu N-amidino-N'-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)močoviny; t. t. 150 - 155 °C (rozklad).

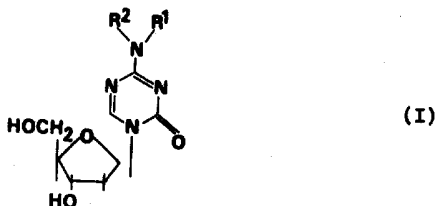
Příklad 4

Příprava 2'-deoxy-5-azacytidinu

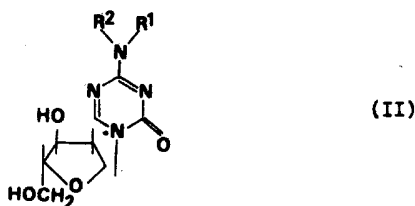
Směs 2,64 g formiátu N-amidino-N'-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)močoviny, 20 ml methanolu a 2,6 ml dimethylacetalu dimethylformamidu se magneticky míchá v uzavřené baňce při teplotě místnosti 24 hodin. Výchozí látka zpočátku přechází do roztoku a asi po 1 hodině se začíná vylučovat reakční produkt. Směs se po uvedené době vychladí, produkt se odsaje, promyje ledově studeným methanolem a vysuší ve vakuu. Získá se 0,91 g, tj. 40 % 2'-deoxy-5-azacytidinu; t. t. 202 - 204 °C (rozklad). Odparek matečného louhu se použije k regeneraci výchozí amidinomočoviny (viz příklad 3).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

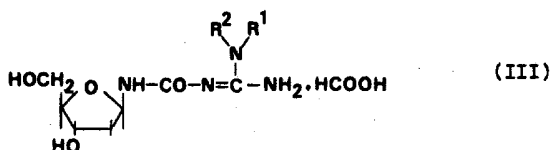
1. Způsob přípravy 2'-deoxy-5-azacytidinů obecného vzorce I



kde R¹ a R² jsou buď stejné nebo různé a značí vodík nebo alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku, vyznačený tím, že se alfa-anomery 2'-deoxy-5-azacytidinů obecného vzorce II



kde R¹ a R² značí totéž co ve vzorci I, hydrolyzují na formiáty N-amidino-N'-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)močoviny obecného vzorce III



kde R¹ a R² značí totéž co ve vzorci I, které se poté cyklokondenzují dialkylacetalem dimethylformamidu, jehož alkylový zbytek obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, v alkanolu s 1 až 4 atomy uhlíku.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se hydrolýza provádí zředěným roztokem těkavé báze při teplotě místnosti.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačený tím, že se hydrolýza provádí zředěným amoniakem.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se cyklokondenzace provádí dimethylacetalem dimethylformamidu při teplotě místnosti v prostředí methanolu.