



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

238038

(11) (B1)

/22/ Přihlášeno 07 10 83
/21/ PV 7380-83

(40) Zveřejněno 14 03 85
(45) Vydáno 15 10 87

(51) Int. Cl.⁴

A 61 K 31/495,
C 07 D 473/34

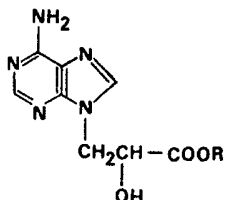
(75)

Autor vynálezu

HOLÝ ANTONÍN RNDr. CSc., PRAHA /ČSSR/, DE CLERCQ ERIK prof. dr.,
LEUVEN /Belgie/

(54) Léčebný prostředek s protivirovým účinkem

Předmětem vynálezu je nový léčebný prostředek s protivirovým účinkem, jehož aktivní složkou jsou buď racemické estery nebo /S/- nebo /R/-formy 3-/adenin-9-yl/-2-hydroxypropanové kyseliny obecného vzorce I



kde R je lineární nebo rozvětvená alkylskupina s počtem jednoho až pěti uhlíkových atomů, hydroxyethyl nebo furfuryl a uhlíkový atom v poloze 2 má konfiguraci R, S nebo RS, přičemž účinné koncentrace aktivní složky obecného vzorce I jsou 0,1 mg až 1 000 mg/kg živé váhy a hmotnostní poměr aktivní složky k nosiči je v rozsahu 1 : 1 až 1 000.

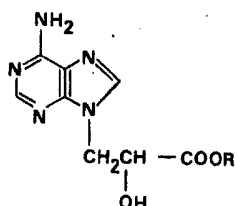
Předmětem vynálezu jsou léčebné prostředky s protivirovým účinkem pro použití v lidském i veterinárním lékařství.

Některé substituované alkylderiváty adeninu mají protivirový účinek. Zatím nejznámější je 9-/S/-/2,3-dihydroxypropyl/adenin /dále jen /S/-DHPPA/ /Čs. autorské osvědčení č. 199 093/, který působí proti multiplikaci např. rhabdovirů /vesikulární stomatitidy, vztekliny/, paramyxovirů /parainfluenza 3, spalničky/, reovirů /reovirus typu 1/, infekční pankreatická nekroza pstruhů/, rotavirů /kuřecí gastroenteritida/ a poxvirů /vakcinie/ /DeClercq E., Descamps J., DeSomer P., Holý A.: Science 200, 563 /1978/; Sodja I., Holý A.: Acta Virol. 24, 317 /1980/, Holý A., Votruba I., DeClercq E.: Collect. Czechoslov. Chem. Commun. 47, 1392 /1982/; Rada B., Holý A.: Chemotherapy 26, 184 /1980/; Smee D. F., Sidwell R. W., Clark S. M., Barnett B. B., Spendlove R. S.: Antimicrob. Ag. Chemother. 21, 66 /1982// i protivirové transformaci buněk /Kára J., Vácha P., Holý A.: FEBS Letters 107, 187 /1979//.

Protivirový účinek této látky je založen na inhibici S-adenosyl-L-homocysteinhydrolas /SAH-hydrolas/ /Votruba I., Holý A.: Collect. Czechoslov. Chem. Commun. 45, 3039 /1980//; protivirový účinek mají i další inhibitory těchto enzymů, např. karbocyklické analogy adenin-arabinosidu a 3-deazaadenosinu /DeClercq E., Montgomery J. A.: Antiviral Res. 3, 17 /1983/; Vince R., Deluge S.: J. Med. Chem. 20, 612 /1977// nebo D-eritadenin /Holý A., Votruba I., DeClercq E.: Collect. Czechoslov. Chem. Commun. 47, 1392 /1982//.

Účinnými reversibilními inhibitory SAH-hydrolas jsou i oba enantiomery a racemát 3-/adenin-9-yl/-2-hydroxypropanové kyseliny, které však nemají výrazný protivirový účinek. Dá se předpokládat, že překážkou je polární /kyselý/ charakter těchto látek, který znemožňuje nebo znesnadňuje jejich průnik do buněk.

Tuto zásadní nevýhodu odstraňuje léčebný prostředek s protivirovým účinkem podle vynálezu, jehož podstatou je, že jeho aktivní složkou jsou buď racemické estery nebo /S/- nebo /R/-formy 3-/adenin-9-yl/-2-hydroxypropanové kyseliny obecného vzorce I



/I/

kde R je lineární nebo rozvětvená alkylskupina s počtem jednoho až pěti uhlíkových atomů, hydroxyethyl nebo furfuryl a uhlíkový atom v poloze 2 má konfiguraci R, S nebo RS, přičemž účinné koncentrace aktivní složky obecného vzorce I jsou 0,1 mg až 1 000 mg/kg živé hmotnosti a hmotnostní poměr aktivní složky k nosiči je v rozsahu 1 : 1 až 1 000. Substituent R může být i jiný alkyl, hydroxyalkyl, aralkyl nebo heteroaralkyl s větším počtem uhlíkových atomů.

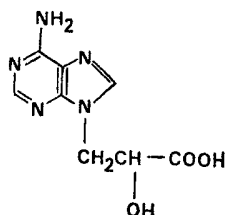
Látky obecného vzorce I mají nízkou akutní toxicitu. Jejich protivirový účinek se projevuje na tkáňových kulturách buněk infikovaných příslušnými viry, aniž by látky působily cytotoxicky nebo antimetabolickými účinky.

Stupeň účinku přitom závisí na druhu viru a v některých případech na druhu použité tkáňové kultury. Látky vzorce I mají nespecifický účinek proti DNA i RNA virům a zvláštní citlivost projevují např. rhabdoviry a poxviry /virus vesikulární stomatitidy a vakcinie/, ale citlivý je i virus spalniček a reovirus typu 1. Tento účinek je obdobný výše uvedenému /S/-DHPPA, je však vyšší nebo alespoň stejný.

Biologickou protivirovou účinnost projevují nejen estery obecného vzorce I v obou enantiomerních řadách, ale přibližně stejný účinek jako aktivnější z obou enantiomerů, tj. R formu mají i racemické sloučeniny obecného vzorce I, které jsou z důvodů snadné dostupnosti racemické kyseliny od nich odvozené, pro praktické použití nejvhodnější.

Některé látky obecného vzorce I jsou uváděny jako preparáty pro snížení hladiny cholesterolu v krevním plasmatu /Jap. patent 7 204 077, 7 208 549/ a pro chemosterilizaci hmyzu /Čs. autorské osvědčení č. 230 341/. Jejich protivirový účinek je však zcela nový.

Látky obecného vzorce I mohou být připraveny z volných 3-/adenin-9-yl/-2-hydroxypropanových kyselin vzorce II



/II/,

kde uhlíkový atom v poloze 2 může mít konfiguraci R, S nebo RS, které se připraví oxidací derivátů 5-/adenin-9-yl/-5-deoxyaldopentos /Holý A.: Collect. Czechoslov. Chem. Commun. 43, 3444 /1978/; Holý A., Votruba I., DeClercq E.: Collect. Czechoslov. Chem. Commun. 47, 1392 /1982//. Racemický derivát vzorce II se nejspíše připraví kyanhydrinovou sytézou z adenin-9-yl-actaldehydu /Holý A., Votruba I.: Čs. autorské osvědčení č. 218019/.

Uvedená, avšak nedoložená je i příprava látek vzorce II výstavbou adeninového kruhu z příslušné aminokyseliny /Jap. pat. 7204078/, alkylací adeninu alfy-hydroxypropiolaktonem /Jap. pat. 7208549/, redukcí svých N¹-oxidů /Jap. pat. 7204077/ nebo alkylací adeninu aktivovanými deriváty kyseliny glycerové /Jap. pat. 7208550/.

Z látek vzorce II se reakcí s příslušným alkoholem, jehož skupina R odpovídá popisu ve vzorci I, v přítomnosti minerální kyseliny při zvýšené teplotě nebo v přítomnosti aktivujících činidel /např. N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu/ získají látky obecného vzorce I.

Významem látek obecného vzorce I je také jejich dostatečná stálost v pevném stavu nebo v neutrálních roztocích, a rozpustnost jak ve vodných a polárních prostředích, tak i v nepolárních organických rozpouštědlech. Proto je lze snadno uvést do odpovídajících farmaceutických preparátů pomocí hydrofilních nebo lipofilních nosičů.

Farmaceutické preparáty s obsahem látek obecného vzorce I pro použití v lidském a veterinárním lékařství mohou mít formu pudrů, suspenzí, roztoků, sprayů, emulzí, mastí nebo krémů a mohou být použity jako injekční formy.

Tyto preparáty mohou sloužit např. pro lokální aplikace /lese kožní, slizniční, oční apod./, aplikace intranasální, rektální, vaginální, i pro podání orální nebo parenterální /intravenosní, intražilární, intramuskulární, intratekální apod./.

Tyto preparáty se připraví smíšením nebo rozpuštěním účinné látky nebo účinných látek s farmaceuticky použitelnými nosiči neutrálního charakteru /např. s vodnými i nevodnými rozpouštědly, stabilizátory, emulgátory, smáčedly, aditivy/ případně i s barvivy a aromatičujícími látkami. Podle povahy podání a onemocnění se koncentrace aktivní složky může měnit v rozsahu 0,1 až 100 % hmotnostních.

V dalším je protivirová účinnost látek obecného vzorce I doložena v příkladech, aniž se tím jakkoliv omezuje.

Příklady

Protivirový účinek látek vzorce I na tkáňových kulturách.

Buňky tkáňové kultury v Petriho miskách byly infikovány stonásobkem dávky viru dle tabulky 1, potřebné k infekci 50 % buněk /100 CCID₅₀/, 1 h po infekci byly buňky omyty základním živným roztokem dle Eagla a kultivovány v tomto roztoku s obsahem zkoumané látky vzorce I.

Byly použity různé koncentrace látek a stanoveny hodnoty minimálních koncentrací, které působí 50 % inhibici cytopathického účinku viru stanoveného kontrolním pokusem /MIC₅₀/ metodou podle L. J. Rosenthala a I. L. Schechmaistera /"Tissue Culture", str. 510, Academic Press, New York 1973/.

Výsledky těchto pokusů jsou uvedeny v tabulce 1. Látky vzorce I inhibují velmi účinně např. virus spalniček a reovirus 1. Dále je z těchto údajů zřejmé, že látky vzorce I mají shodné spektrum aktivit jako příbuzný /S/-DHPA použitý jako kontrolní látka. Účinnější z obou forem je R-forma, ale racemická /RS/ forma je přibližně stejně účinná jako tento enantiomer.

P ř í k l a d 2

Protivirový účinek látek vzorce I na tkáňových kulturách buněk králíčních ledvin /PRK/ proti viru vakcinie, vesikulární stomatitidy a herpesviru typu 1.

Stanovení se provede stejně jako je uvedeno v příkladu 1 na tkáňových kulturách buněk králíčních ledvin /PRK/, které se infikují 100 CCID₅₀ herpesviru typu 1 /KOS/, viru vesikulární stomatitidy nebo viru vakcinie.

Při stanovení hodnot MIC₅₀ se postupuje způsobem udaným v příkladu 1. Z údajů uvedených v tabulce 2 je zřejmé, že všechny zkoumané látky vzorce I jsou vysoce účinné proti viru vesikulární stomatitidy a vakcinie.

Rozdíly způsobené různým charakterem esterově vázaného zbytku alkoholu se pohybují v rozmezí přesnosti stanovení. Pouze n-pentyl, 2-hydroxyethyl a furfurylester jsou méně účinné než ostatní látky vzorce I.

Dále z údajů tabulky 2 vyplývá, že střední cytotoxická koncentrace látek vzorce I je až o dva řády vyšší než její účinná protivirová koncentrace. Většina zkoumaných látek je účinnější než srovnávací látka /S/-DHPA.

P ř í k l a d 3

Vliv druhu buněk tkáňové kultury na citlivost viru vesikulární stomatitidy vůči některým látkám vzorce I.

Pokus je proveden stejně jako je uvedeno v příkladu 1 s různými tkáňovými kulturami /viz tabulka 3/, které se infikují 100 CCID₅₀ viru vesikulární stomatitidy; vyhodnocení hodnoty MIC₅₀ se provede podle příkladu 1.

Z údajů tabulky 3 vyplývá, že protivirový účinek studovaných látek vzorce I je závislý od druhu použité tkáňové kultury hostitelských buněk, a to ve všech případech shodně. Dále z těchto údajů vyplývá, že vliv druhu buněk na protivirový účinek látek vzorce I a srovnávací látky /S/-DHPA je kvalitativně shodný.

P ř í k l a d 4

Vliv látek vzorce I na multiplikaci viru vesikulární stomatitidy.

Tkáňové kultury primokultury buněk králíčních ledvin /PRK/ se infikují /10^{4,5} PFU/0,5 ml/miska /PFU je jednotka tvorby plaků/ virům vesikulární stomatitidy podle příkladu 1 a vystaví se vlivu roztoku látek vzorce I /100 ug/ml/.

V intervalech 1, 24, 48 a 72 h se stanoví titr viru přeočkováním na myší buňky L 929 a určením počtu plaků. Všechny studované látky vzorce I snižují titr viru nejméně 50x /tabulka 4/.

Příklad 5

Vliv látek vzorce I na multiplikaci viru vakcinie.

Pokus se provede stejně jako je uvedeno v příkladu 4 s tím rozdílem, že se buňky infikují $10^{4,5}$ PFU/0,5 ml/miska/ virem vakcinie. Všechny studované látky snižují titr viru vakcinie nejméně 3 000x po 72 h. Výsledky dokumentuje tabulka 5.

Tabulka 1

Protivirový účinek látek vzorce I ve tkáňových kulturách

Virus	Druh buněk	MIC ₅₀ /ug/ml/ látky vzorce I, R /konfigurace/				
		CH ₃ /S/	CH ₃ /R/	CH ₃ /RS/	C ₂ H ₅ /S/	/S/-DHPA
Herpes simplex						
1/KOS/	PRK	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
Spalničky	Vero Flow	70	15	40	100	70
Reovirus 1	Vero B	300	70	300	70	70
Parainfluenza 3	Vero B	100	200	100	100	20
Sindbis	Vero B	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
Coxsackie B4	Vero B	150	150	> 400	> 400	100
Vesikulární stomatitis	PRK	7	1,5	3	1,5	30
Vakcinia	PRK	20	15	7	7	70
Polio-1	HeLa	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400

Vysvětlivky: MIC₅₀ ... minimální koncentrace látky, která inhibuje z 50 % cytopathický účinek viru; PRK ... primokultura buněk králičích ledvin; Vero ... kontinuální linie buněk opičích ledvin; HeLa ... Lidská epithel. linie z cervikálního karcinomu.

Tabulka 2

Vliv charakteru skupiny R racemických látek obecného vzorce I na jejich protivirový účinek na tkáňových kulturách buněk primokultury králičích ledvin

Látka I R =	MCC ₅₀ /ug/ml/	HSV-1	MIC ₅₀ /ug/ml/	
			VV	VSV
Methyl	> 400	> 400	7	3
Ethyl	> 400	> 400	7	3
n-Propyl	100	> 40	3	1,5
n-Butyl	400	300	3	0,7
Isobutyl	> 400	> 400	3	0,3
n-Pentyl	200	> 200	70	15
Isopentyl	400	> 200	7	1,5
2-Hydroxyethyl	> 400	> 400	70	30
Furfuryl	40	> 400	20	15
/S/-DHPA	> 400	> 400	30	15

Vysvětlivky: MCC ... koncentrace látky, která vyvolá 50% cytopathický efekt neinfikovaných buněk; MIC₅₀ ... viz tabulka 1; HSV-1 ... herpesvirus typu 1 /KOS/; VV ... virus vakcinie; VSV ... virus vesikulární stomatitis.

T a b u l k a 3

Protivirový účinek látek vzorce I proti viru vesikulární stomatitidy na různých druzích tkáňových kultur /příklad 3/

	MIC ₅₀ /ug/ml/				
	Látka vzorce I, R /konfigurace/				
	CH ₃ /S/	CH ₃ /R/	CH ₃ /RS/	C ₂ H ₅ /S/	/S/-DHPA
VGS	70	15	70	30	40
E ₆ SM	70	15	30	40	20
HEp-2	15	3	3	5	2
HeLa	150	20	70	100	70
Balb/3T3	> 400	300	300	> 400	70
RK ₁₃	7	1,5	1,5	4	70
HK	> 400	> 400	> 400	> 400	70
BSC1A	300	150	150	300	40
Vero B	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
PRK	15	1,5	3	1,5	30

Vysvětlivky: MIC₅₀ viz tabulka 1. Zkratky: VGS ... lidské diploidní fibroblasty; E₆MS ... lidské embryonální kožní/svalové fibroblasty; HEp-2 ... lidská epithel. linie z karcinomu hrtanu; HeLa ... lidská epithel. linie z cervikálního karcinomu; RK-13 ... kontinuální linie buněk liských ledvin; HK ... buňky ledvin křečka; BSC-1A ... epithel. linie z opičích ledvin; Vero B ... fibroblast. linie z opičích ledvin; PRK ... primokultura buněk králičích ledvin.

T a b u l k a 4

Vliv látek vzorce I v koncentraci 100 ug/ml na multiplikaci viru vesikulární stomatitidy v buňkách primokultury králičích ledvin /viz příklad 4/

látka vzorce I	Konfigurace	Titř viru /log ₁₀ PFU /ml/ po			
		1 h	24 h	48 h	72 h
R -					
CH ₃	S	< 1,3	< 1,3	2,2	2,2
	R	< 1,3	1,3	< 1,3	2,1
	RS	< 1,3	< 1,3	2,3	2,0
C ₂ H ₅	S	< 1,3	1,3	1,8	2,0
/S/-DHPA	S	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3
Kontrola	-	< 1,3	3,7	4,9	3,9

PFU ... jednotka tvorby plaků

T a b u l k a 5

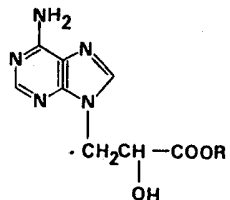
Vliv látek vzorce I v koncentraci 100 ug/ml na multiplikaci viru vakcinie v buňkách primokultury králičích ledvin
/viz příklad 5/.

Látka vzorce I		Titr viru /log ₁₀ PFU/ml/ po			
R =	Konfigurace	1 h	24 h	48 h	72 h
CH ₃	S	< 1,3	1,3	2,6	2,8
	R	< 1,3	1,3	2,0	2,5
	RS	< 1,3	1,3	1,3	2,4
C ₂ H ₅	S	< 1,3	< 1,3	1,8	2,5
/S/-DHPA		1,3	< 1,3	3,6	4,4
Kontrola	-	1,6	4,8	6,0	6,3

PFU ... jednotka tvorby plaků

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Léčebný prostředek s protivirovým účinkem, vyznačený tím, že jeho aktivní složkou jsou buď racemické estery nebo /S/- nebo /R/-formy 3-adenin-9-yl/-2-hydroxypropanové kyseliny obecného vzorce I



/I/,

kde R je lineární nebo rozvětvená alkylskupina s počtem jednoho až pěti uhlíkových atomů, hydroxyethyl nebo fufuryl a uhlíkový atom v poloze 2 má konfigurace R, S nebo RS, a hmotnostní poměr aktivní složky k nosiči je v rozsahu 1 : 1 až 1 000.