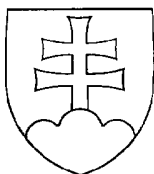


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

279 262

(21) Číslo prihlášky: 1199-93

(22) Dátum podania: 11.05.92

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 9110624.5, 9121381.9,
9123581.2

(32) Dátum priority: 16.05.91, 08.10.91, 06.11.91

(33) Krajina priority: GB, GB, GB

(40) Dátum zverejnenia: 06.04.1994

(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: 05.08.98

(86) Číslo PCT: PCT EP92/01106, 11.05.92

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61K 31/70

A 61K 31/505

(73) Majiteľ patentu: Glaxo Group Limited, Greenford, Middlesex, GB;

(72) Pôvodca vynálezu: Cameron Janet Mary, Greenford, Middlesex, GB;
Cammack Nicholas, Greenford, Middlesex, GB;

(54) Názov vynálezu: **Protivírusová zmes, farmaceutický prostriedok s jej obsahom a jej použitie**

(57) Anotácia:

Protivírusová zmes obsahuje kombináciu (2R,cis)-4-amino-1-(2-hydroxy-metyl-1,3-oxatiolan-5-yl)-1H-pyrimidin-2-onu (3TC) alebo jej farmaceuticky prijateľného derivátu a 3'-azido-3'-deoxytymidínu (AZT) alebo jeho farmaceuticky prijateľného derivátu. Farmaceutické prostriedky s obsahom uvedenej kombinácie zlúčenín sú vhodné na použitie na liečenie osôb infikovaných HIV alebo na prevenciu u ohrozených osôb.

Oblasť techniky

Vynález sa týka protivírusových zmesí s obsahom nukleozidových analógov, okrem tejto látky zmesi obsahujú ďalšie protivírusové látky, výhodne látky, ktoré sú účinné proti vírusu HIV.

Doterajší stav techniky

Vírus ľudskej imunodeficiencie HIV spôsobuje rad klinických stavov vrátane získaného syndrómu deficiencie systému AIDS a chronickej neurologickej poruchy. Nukleozidy ako AZT, ddC a ddI spôsobujú inhibíciu replikácie HIV in vitro a majú protivírusový účinok na enzým reverznej transkriptázy, pre ktorú je vírus kódom po metabolizme v bunkách za vzniku 5'-trifosfátových derivátov.

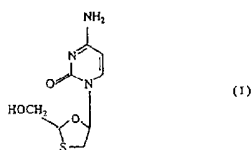
AZT znižuje chorobnosť a úmrtnosť chorých s AIDS. Infekcia buniek HIV však má za následok integráciu genómu vírusu do chromozómu hostiteľa a je teda potrebné pokračovať v liečení pomocou AZT dlhý čas. Dôsledkom dlhodobého liečenia AZT je však toxicita tejto látky pre kostnú dreň a vznik variantov vírusu HIV-1, ktoré sú odolné proti AZT. Podobne tiež niektorí chorí pri liečení ddC majú ťažkosti, súvisiace s týmto liečením, napríklad trpia periférnou neuropatiou, a takisto pri podávaní ddI vznikajú nežiaduce účinky, ako pankreatitída a periférna neuropatia.

Použitie zmesi účinných látok môže vyvolať ekvivalentný protivírusový účinok pri znížení toxicity alebo zvýšení účinnosti niektorej účinnej látky v prípade, že medzi látkami, použitými v zmesi, dochádza k synergnému účinku. Nižšie celkové dávky účinných látok pravdepodobne tiež zníži výskyt variantov HIV, odolných proti týmto látkam. Bol použitý rad rôznych metód na skúmanie účinkov zmesí rôznych zlúčenín.

Všetky postupy majú svoje obmedzenia, niektoré metódy sú uskutočňované aj na iných systémoch, než pre ktoré sú určené. AZT má synergný protivírusový účinok in vitro v zmesi s látkami, ktoré brzdia replikáciu HIV-1 v inej fáze než pri reverznej transkripcii, ide napríklad o rekombinantný rozpustný CD4 castanospermin a rekombinantný interferón alfa. Je však nutné tiež uviesť, že pri kombináciách rôznych látok môže dôjsť k zvýšeniu cytotoxicity. AZT a rekombinantný interferón alfa majú zvýšený cytotoxický účinok na materské bunky neporušenej ľudskej kostnej drene.

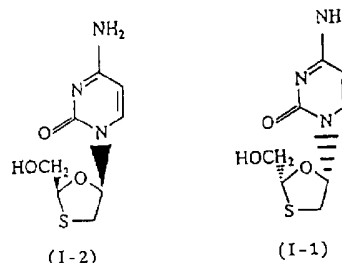
Bola tiež skúmaná možnosť AZT s ďalšími nukleozidmi. Použitím ddC dôjde k zníženiu cytotoxicity vysokých dávok AZT pre kostnú dreň bez ovplyvnenia protivírusového účinku. Použitím ddI a AZT dochádza k zvýšeniu selektivity synergným protivírusovým účinkom, toxicita pre materské bunky ľudskej kostnej drene sa však spočíta.

Ako bolo uvedené, že zlúčenina vzorca (I)



označovaná tiež BCH-189 alebo NGPB-21 má protivírusový účinok najmä proti vírusom ľudskej imunodeficiencie HIV, ktoré sú príčinou syndrómu AIDS, ako bolo opísané v publikácii 5th Anti-Aids Conference, Montreal, Kanada,

5. až 9. júna 1989, Abstracts T.C.O.1 a M.C.P.63 a tiež v európskom patentovom spise č. 382 562. Zlúčenina vzorca (I) je racemickou zmesou dvoch enantiomérov so vzorcom (I-1) a (I-2).



Hoci enantioméry zlúčeniny vzorca I majú proti HIV rovnaký účinok, jeden z enantiomérov a to (-)-enantiomér má podstatne nižšiu toxicitu než (+)-enantiomér.

(-)-enantiomér má chemický názov (-)-cis-4-amino-1-(2-hydroxymetyl-1,3-oxathiolan-5-yl)-(1H)-pyrimidin-2-on. Pokiaľ ide o stereochemiu, ide o zlúčeninu vzorca (I-1) s názvom (2R,cis)-4-amino-1-(2-hydroxymetyl-1,3-oxathiolan-5-yl)-(1H)-pyrimidin-2-on. Zlúčenina je známa ako 3TC.

Bolo preukázané, že zlúčenina vzorca (I) a zvlášť jej (-)-enantiomér má neočakávané výhody v prípade použitia so známymi inhibítormi replikácie HIV. Zvlášť zlúčenina všeobecného vzorca (I) má synergický protivírusový účinok a/alebo dochádza k zníženiu cytotoxicity použitím v kombinácii so známymi inhibítormi replikácie HIV.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu teda tvorí protivírusová zmes, obsahujúca zlúčeninu vzorca (I) alebo jej farmaceuticky prijateľný derivát a inhibítor replikácie HIV.

Použitým inhibítorom môže byť akýkoľvek inhibítor replikácie HIV bez ohľadu na to, akým spôsobom k inhibícii replikácie dochádza. Môže ísť napríklad o inhibítory, spôsobujúce inhibíciu reverznej transkriptázy HIV, proteázy HIV, TAT a podobne.

Z týchto inhibítorov je možné uviesť napríklad 3'-azido-3'-deoxytymidín (AZT, zidovudín) alebo farmaceuticky prijateľné deriváty týchto zlúčenín.

Zlúčenina vzorca (I) sa výhodne použije vo forme svojho (-)-enantioméru 3TC.

Inhibítor replikácie HIV sa výhodne volí zo skupiny AZT, ddI, Ro 31-8959 alebo R-82150 (TIBO).

Zvlášť výhodným inhibítorom replikácie HIV je ddI a najmä AZT.

V prípade, že sa zlúčenina vzorca (I) uvádza ako (-)-enantiomér, je v podstate zbavená zodpovedajúceho (+)-enantioméru, to znamená, že obsahuje najviac 5 % hmotnostných (+)-enantioméru, výhodne najviac 2 a zvlášť najviac 1 % hmotnostné tohto druhého enantioméru.

Pod pojmom "farmaceuticky prijateľný derivát" sa rozumie akákoľvek farmaceuticky prijateľná soľ, ester alebo soľ tohto esteru, ktorá po podaní príjemcovi je schopná nepriamo uvoľniť pôvodnú látku alebo jej metabolit alebo zvyšok s protivírusovým účinkom.

Je zjavné, že zlúčeninu vzorca (I) je možné modifikovať za vzniku jej farmaceuticky prijateľných derivátov, a to

na funkčných skupinách základnej štruktúry i na hydroxymetylovej skupine oxatiolanového kruhu. Modifikácie týchto funkčných skupín takisto spadajú do rozsahu vynálezu. Ale zvláštny význam majú farmaceuticky prijateľné deriváty, získané modifikáciou 2-hydroxymetylovej skupiny oxatiolanového kruhu.

Výhodnými esterami zlúčeniny vzorca (I) sú tiež tie zlúčeniny, v ktorých je atóm vodíka 2-hydroxymetylovej skupiny nahradený acylovou skupinou všeobecného vzorca



kde skupina R esterov, ktorá je odlišná od karboxylovej skupiny sa volí zo skupiny atóm vodíka, alkyl s priamym alebo rozvetveným reťazcom, ako metyl, etyl, n-propyl, terc.-butyl, n-butyl, ďalej alkoxyalkyl, ako metoxymetyl, aralkyl, ako benzyl, aryloxyalkyl, ako fenoxymetyl alebo aryl, ako fenyl, prípadne substituovaný atómom halogénu, alkylovou skupinou alebo alkoxykupinou vždy s 1 až 4 atómami uhlíka, ďalej môže ísť o sulfonátové estery, a to alkylsulfonfyl alebo aralkylsulfonfyl, napríklad metánsulfonfyl, o estery s aminokyselinami, ako L-valyl alebo L-izoleucyl a mono-, di- alebo trifosfátové estery.

V opísaných esteroch, ak nie je uvedené inak, obsahujú alkylové skupiny 1 až 16 atómov uhlíka, výhodne 1 až 4 atómy uhlíka. Arylovou skupinou v týchto esteroch je výhodne fenylová skupina.

Vhodnými esterami sú najmä alkylestery s 1 až 16 atómami uhlíka v alkylovej časti, nesubstituované benzylestery alebo benzylestery, substituované aspoň jedným atómom halogénu, to znamená brómu, chlóru, fluóru alebo jódu, alkylovou skupinou alebo alkoxykupinou vždy s 1 až 6 atómami uhlíka, nitroskupinou alebo trifluórmetylou skupinou.

Farmaceuticky prijateľné soli zlúčeniny vzorca (I) sú soli, odvodené od farmaceuticky prijateľných anorganických a organických kyselín a zásad. Príkladom vhodných kyselín môžu byť kyseliny chlorovodíkovej, bromovodíkovej, sírovej, dusičnatej, chloristatej, fumarovej, maleínovej, fosforečnej, glykovej, mliečnej, jantárovej, p-toluénsulfónovej, vínnej, octovej, citrónovej, metánsulfónovej, mravčej, benzoovej, malónovej, naftalén-2-sulfónovej a benzénsulfónovej. Iné kyseliny, ako kyselina šťaveľová, nie sú farmaceuticky prijateľné, ale soli týchto kyselín môžu byť použiteľné ako medziprodukty na výrobu zlúčenín podľa vynálezu a ich adičných solí s kyselinami, prijateľných z farmaceutického hľadiska.

Soli, odvodené od vhodných báz, zahŕňajú soli s alkalickými kovmi, napríklad sodíkom, s kovmi alkalických zemín, ako horčíkom, amonné soli a soli typu NR_4^+ , v ktorých R znamená alkylovú skupinu s 1 až 4 atómami uhlíka.

Zlúčenina vzorca (I) má synergický účinok s druhou zložkou, použitou v kombinácii a/alebo je schopná odstrániť cytotoxické účinky tejto druhej zložky.

Výhodné účinky zlúčeniny vzorca (I) a druhej protirakovinovej látky je možné pozorovať vo veľmi širokom rozmedzí pomerov, napríklad 1 : 250 až 250 : 1, výhodne 1 : 50 až 50 : 1 a zvlášť 1 : 10 až 10 : 1. Je vhodné použiť každú zo zlúčenín v kombinácii v množstve, v ktorom má protirakovinovú účinnosť v prípade, že je použitá sama osebe.

Je možné očakávať, že uvedené kombinácie budú všeobecne použiteľné v prípade vírusových infekcií alebo v

prípade nádorov, spojených s pôsobením vírusov u ľudí. Inhibícia infekčivity vírusu alebo nádorového rastu in vitro alebo in vivo spadá rovnako do rozsahu vynálezu.

Vírusovú infekciu u cicavcov vrátane človeka je teda možné liečiť tak, že sa súčasne podáva protirakovinová látka vzorca (I) a inhibitor replikácie HIV.

Je zjavné, že zlúčeninu vzorca (I) a druhú protirakovinovú látku je možné podávať súčasne, následne alebo v kombinácii. V prípade, že sa zlúčeniny podávajú jedna po druhej, nemal by interval do podania druhej z týchto látok byť taký veľký, aby došlo k strate synergného účinku tejto kombinácie. Výhodne sa však obidve látky podávajú súčasne.

Je zjavné, že ak sa vyskytuje zmienka o liečení, týka sa táto zmienka tak skutočného liečenia infekcie alebo jej príznakov, ako aj profylaktického použitia.

Je tiež zjavné, že množstvo uvedenej kombinácie, ktoré bude na liečenie použité, sa bude meniť nielen v závislosti na zvolenej zlúčenine, ale tiež v závislosti od spôsobu podania, povahy liečeného ochorenia, veku a stavu chorého. Skutočné dávky určí ošetrojúci lekár alebo veterinárny lekár. Všeobecne je možné uviesť, že vhodná dávka sa bude pohybovať v rozmedzí 1 až 750 mg/kg, napríklad 10 až 75 mg/kg telesnej hmotnosti za deň, ide napríklad o dávku 3 až 120 mg/telesnej hmotnosti za deň, výhodne 6 až 90 a zvlášť 15 až 60 mg/kg za deň pre každú z účinných zložiek kombinácie.

Požadovanú dennú dávku je možné podať naraz alebo rozdelené vo vhodných intervaloch, napríklad v dvoch, troch, štyroch alebo vo väčšom počte dávok denne.

Uvedená kombinácia sa výhodne podáva ako lieková forma, obsahujúca napríklad 10 až 1500, výhodne 20 až 1000 a zvlášť 50 až 700 mg každej z účinných zložiek v jednotlivých dávkach.

V ideálnych prípadoch by mala byť kombinácia podávaná tak, aby bola dosiahnutá najvyššia koncentrácia každej z účinných zložiek 1 až 75, výhodne 2 až 50 a zvlášť 3 až 30 mM. Toto je možné dosiahnuť napríklad vnútrožilovou injekciou 0,1 až 5% roztoku účinných zložiek, prípadne v roztoku chloridu sodného alebo perorálnym podaním dávky 1 až 100 mg každej z účinných zložiek. Žiaduce koncentrácie v krvi je možné udržiavať kontinuálnou infúziou tak, aby bola dodávaná dávka 0,01 až 5,0 mg/kg za hodinu alebo prerušovanou infúziou, obsahujúcou 0,4 až 15 mg každej účinnej zložky.

Aj keď je na liečebné účely možné podávať účinné zložky kombinácie vo forme chemických látok, je výhodné ich podávať vo forme farmaceutického prostriedku.

Podstatu vynálezu ďalej tvorí farmaceutický prostriedok, ktorý ako svoju účinnú zložku obsahuje zlúčeninu vzorca (I), t.j. (2R,cis)-4-amino-1-(2-hydroxy-metyl)-1,3-oxatiolan-5-yl)-1H-pyrimidin-2-on (3TC) alebo jej farmaceuticky prijateľný derivát a 3'-azido-3'-deoxytymidín (AZT) alebo jeho farmaceuticky prijateľný derivát a farmaceuticky prijateľný a jeden alebo väčší počet farmaceutických nosičov. Nosič musí byť "prijateľný", to znamená kompatibilný s ostatnými zložkami a neškodný.

Farmaceutické prostriedky môžu byť určené na perorálne, rektálne, nosné, miestne podanie (vrátane sliznice dutiny ústnej a pod jazykom), vaginálne alebo parenterálne, napríklad vnútrošvalové, podkožné alebo vnútrožilové podanie alebo môžu mať formu, vhodnú na podanie insufláciou. Farmaceutické prostriedky môžu byť pripravené vo forme, rozdelené na jednotlivé dávky a je možné ich pri-

praviť akýmkoľvek známym spôsobom. Pri všetkých postupoch sa vždy mieša účinná zložka s kvapalným alebo jemne rozptýleným pevným nosičom alebo s oboma typmi nosičov, a potom sa prípadne výsledný produkt tvaruje.

Farmaceutické prostriedky, vhodné na perorálne podanie, môžu mať tvar jednotiek, napríklad kapsúl, sáčkov alebo tabliet, každá z týchto jednotiek obsahuje vopred stanovené množstvo účinnej zložky vo forme prášku, granulátu, roztoku, suspenzie alebo emulzie. Účinnú zložku je tiež možné spracovať na jednotku obsahujúcu väčšiu dávku, na masť alebo pastu. Tablety a kapsuly na perorálne podanie môžu obsahovať bežné pomocné látky, ako spojivá, plnivá, lubrikanty, dezintegračné činidlá alebo zmáčadlá. Tablety je možné potiahnuť známym spôsobom. Kvapalné prostriedky na perorálne podanie môžu mať napríklad formu suspenzie, roztoku alebo emulzie vo vode alebo v oleji, sirupe alebo elixíre alebo môže ísť o suchý produkt, určený na zmiešanie s vodou alebo iným vhodným nosným prostredím tesne pred použitím. Kvapalné prostriedky môžu obsahovať bežné prísady, napríklad činidlá, napomáhajúce vzniku suspenzie, emulgátory, nevodné nosné prostredia, napríklad jedlé oleje alebo tiež konzervačné látky.

Zlúčeniny je možné spracovať tiež na formy, vhodné na parenterálne podanie, napríklad na injekčné formy, ako jednorázové injekcie väčšej dávky alebo kontinuálne infúzie, a je možné ich ukladať po jednotlivých dávkach do ampúl, vopred naplnených injekčných striekačiek, infúzií s malým objemom alebo fľaštičiek, ktoré obsahujú väčší počet dávok a konzervačné činidlo. Farmaceutický prostriedok môže mať formu suspenzie, roztoku alebo emulzie v olejovom alebo vo vodnom prostredí a môže obsahovať pomocné činidlá, ako činidlá na vznik suspenzie, stabilizátory a/alebo dispergačné činidlá. Účinná látka môže byť dodávaná aj vo forme prášku, získaného izoláciou sterilnej pevnej látky za aseptických podmienok alebo lyofilizáciou z roztoku, táto forma je určená na zmiešanie s vhodným nosným prostredím, napríklad sterilnou bezpyrogénou vodou tesne pred použitím.

Na miestne podanie na pokožku je možné spracovať zmes podľa vynálezu na masť, krémy, emulzie alebo náplasti na vstrebávanie kožou. Masť a krémy môžu mať vodný alebo olejový základ a môžu obsahovať látky na zahusenie a/alebo na tvorbu gélu. Emulzie môžu byť v vodnom alebo olejovom základe a budú obvykle obsahovať jeden alebo väčší počet emulgátorov, stabilizátorov, dispergačných činidiel, činidiel na vznik suspenzie alebo na zahusenie alebo aj farbivá.

Prostriedky, vhodné na miestne podanie ústnou sliznicou, sú napríklad tablety kosoštvorcového tvaru, obsahujúce účinnú zložku v ochutenej základnej hmote, ktorou je obvykle sacharóza a agátová alebo tragakantová guma, pastilky, obsahujúce účinnú zložku v inertnej základnej hmote, ako je želatína a glycerol alebo sacharóza a agátová guma a ústne vody, ktoré účinnú zložku obsahujú vo vhodnom kvapalnom nosiči.

Farmaceutické prostriedky, určené na rektálne podanie za použitia pevného nosiča, sú výhodne čípky, obsahujúce jednotlivú dávku účinnej látky. Vhodnými nosičmi sú kakaové maslo a ďalšie bežne používané materiály. Čípky sa vyrábajú zmiešaním účinnej zložky so zmäččeným alebo roztaveným nosičom alebo nosičmi s následným ochladením a tvarovaním vo formách.

Prostriedky, vhodné na podanie do pošvy, môžu mať

formu pesarov, tampónov, krémov, gélov, pást, pien alebo sprejov, obsahujúcich okrem účinnej zložky aj príslušné typy nosičov.

Na podávanie do nosa je možné zlúčeniny v kombinácii použiť ako kvapalné spreje alebo dispergovateľné prášky, alebo aj vo forme kvapiek.

Kvapky je možné pripraviť za použitia vodnej alebo nevodnej bázy, prípadne za použitia jedného alebo väčšieho počtu dispergačných činidiel, solubilizačných látok alebo činidiel na vznik suspenzie. Kvapalné spreje sa obvykle podávajú v balení pod tlakom.

Na podanie inhalácie je kombinácia zlúčenín obvykle vložená do insulačného zariadenia, rozprašovača alebo tlakového balenia alebo je možné použiť iné bežné prostriedky na tvorbu aerosolov. Tlakové balenia môžu obsahovať vhodný hnací plyn, napríklad dichlór difluórmétán, trichlórfluórmétán, dichlór tetrafluóretán, oxid uhličitý alebo iný vhodný plyn. V prípade aerosolov pod tlakom je možné určiť dávku zaradením odmerného ventilu.

Pri podaní inhaláciou alebo insuláciou je možné kombináciu zlúčenín použiť v práškovej forme, je napríklad možné práškovú kombináciu zlúčenín zmiešať s inertným práškovým nosičom, ako je laktóza alebo škrob. Práškový prostriedok môže byť dodávaný vo forme, rozdelený na jednotlivé dávky, ako sú napríklad želatínové kapsuly alebo náplasti (blistre), z ktorých je možné podávať prášok pomocou inhalačného alebo insulačného prístroja.

V prípade potreby je možné pripraviť aj prostriedky s pomalým uvoľnením účinnej zložky.

Farmaceutické prostriedky podľa vynálezu môžu obsahovať ešte ďalšie účinné zložky, napríklad antimikrobiálne látky alebo konzervačné prostriedky.

Zlúčeninu vzorca (I) je možné pripraviť spôsobom podľa európskeho patentového spisu č. 382 562.

Jednotlivé enantioméry je možné z racemátu získať rozdelením akýmkoľvek spôsobom, známym na delenie racemátov na zodpovedajúce enantioméry, najmä je možné tieto látky získať zo známeho racemátu chirálnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou HPLC, enzymaticky sprostredkovaným enantioselektívnym katabolizmom pôsobením vhodného enzýmu, napríklad cytidindeaminázy alebo selektívnou enzymatickou degradáciou vhodného derivátu za použitia 5'-nukleotidu. Spôsoby výroby 3TC boli opísané v PCT patentovej prihláške č. WO91/17159.

Praktické vykonanie vynálezu bude vysvetlené nasledujúcimi príkladmi, ktoré však nemajú slúžiť na obmedzenie rozsahu vynálezu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Medziprodukt 1

5-metoxi-1,3-oxatiolán-2-metanolbenzoát

Roztok 1,6 g chloridu zinočnatého v 15 ml horúceho metanolu sa za miešania pridá k roztoku 34,2 g dimetylacetalu merkaptacetaldedydu a 48,3 g benzoyloxyacetaldehydu v 1300 ml toluénu, a zmes sa potom 50 minút zohrieva pod dusíkom na teplotu varu pod spätným chladičom. Ochladená zmes sa odparí, zriedi malým množstvom toluénu a prefiltruje cez infúziórovú hlinku. Spojené filtráty a toluén sa premyjú dvakrát nasýteným vodným roztokom hydrogénuhlčitanu sodného, a potom nasýteným vodným roztokom chloridu sodného, vysušia sa síranom horečnatým.

tým a odparia na olej, ktorý sa chromatografuje na stĺpci s obsahom 2 kg oxidu kremičitého (Merck 9385), ako elučné činidlo sa použije chloroform, čím sa získa 45,1 g výsledného produktu vo forme oleja ako zmes anomérov v pomere približne 1 : 1.

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 3,1 - 3,3 (4H), 3,42 (6H), 4,4-4,6 (4H), 5,41 (1H), 5,46 (1H), 5,54 (1H), 5,63 (1H), 7,46 (4H), 7,58 (2H), 8,07 (4H).

IR-spektrum $\nu_{\max}$ (CHBr₃) 1717,6 cm⁻¹.

Medziprodukt 2

(±)-cis-1-(2-benzoyloxymetyl-1,3-oxatiolan-5-yl)-(1H)-pyrimidin-2,4-dion

Zmes 9,62 g jemne mletého uracilu, 50 ml hexametyldisilazánu a 30 mg síranu amónneho sa zohrieva pod dusíkom na teplotu varu pod spätným chladičom až do získania číreho roztoku. Roztok sa ochladí, a potom sa odparí na bezfarebný olej, ktorý sa rozpustí pod dusíkom v 100 ml acetonitrilu. Roztok sa pridá k miešanému, ľadom chladenému roztoku 19,43 g 5-metoxi-1,3-oxatiolán-2-metanolbenzoátu (medziprodukt 1) v 600 ml acetonitrilu, a potom sa pridá ešte 14,7 ml trimetylsilyltrifluórmétánsulfonátu. Ľadový kúpeľ sa odstráni a roztok sa zohrieva pod dusíkom 45 minút na teplotu varu pod spätným chladičom. Po ochladení a odparení sa odparok čistí chromatografiou na stĺpci s obsahom 1 kg oxidu kremičitého (Merck 9385), ako elučné činidlo sa použije zmes chloroformu a metanolu 9 : 1. Príslušné frakcie sa ochladia a odparia, čím sa získa surový odparok. Tento odparok sa podrobí frakčnej kryštalizácii z čo najmenšieho množstva, približne 1200 ml, horúceho metanolu, čím sa získa 6,32 g výsledného produktu vo forme bielych kryštálov.

¹H-NMR (d₆-DMSO): δ 11,36 (1H, bs), 7,50 - 8,00 (6H, m), 6,20 (1H, t), 5,46 (2H, m), 4,62 (2H, m), 3,48 (1H, m), 3,25 (1H, m).

Medziprodukt 3

(±)-cis-4-amino-1-(2-benzoyloxymetyl-1,3-oxatiolan-5-yl)-(1H)-pyrimidin-2-on

Postup a)

Suspenzia 20,705 g cytozínu a niekoľkých miligramov síranu amónneho v 110 ml hexametyldisilazánu sa mieša a zohrieva pod dusíkom 2,5 hodiny na teplotu varu pod spätným chladičom. Rozpúšťadlo sa odstráni odparením a pevný zvyšok sa rozpustí v 350 ml bezvodého acetonitrilu. Tento roztok sa prenesie pomocou ohybnej ihly do miešacej, ľadom chladeného roztoku 43,57 g 5-metoxi-1,3-oxatiolán-2-metanolbenzoátu (medziprodukt 1) v 650 ml acetonitrilu pod dusíkom. Potom sa pridá 33 ml trimetylsilyltrifluórmétánsulfonátu, roztok sa nechá 1,5 hodiny oteplieť na teplotu miestnosti, a potom sa zohrieva cez noc na teplotu varu pod spätným chladičom. Výsledná zmes sa odparí, zriedi sa 500 ml nasýteného vodného roztoku hydrogénuhlčitanu sodného, a potom sa extrahuje 3 x 500 ml etylacetátu. Extrakt sa spoja, premyjú sa 2 x 250 ml vody a 250 ml nasýteného vodného roztoku chloridu sodného, vysušia sa síranom horečnatým a odparia sa na penu, ktorá sa chromatografuje na 600 g oxidu kremičitého (Merck 7734), ako elučné činidlo sa použije zmes etylacetátu a metanolu, čím sa získa 31,59 g zmesi anomérov v pomere

približne 1 : 1. Zmes sa nechá kryštalizovať zo zmesi 45 ml vody a 9,0 ml etanolu, čím sa získa 10,23 g pevnej látky, ktorá sa nechá prekryštalizovať zo 120 ml etanolu a 30 ml vody, čím sa získa 9,26 g výsledného produktu vo forme bielej pevnej látky.

max (MeOH) 229,4 mm (E^{1%} 610), 272,4 mm (E^{1%} 293).

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 3,14 (1H), 3,50 (1H), 4,07 (2H), 5,52 (1H), 5,66 (1H), 6,28 (1H), 7,22 (2H), 7,56 (2H), 7,72 (2H), 8,10 (2H).

Postup b)

7,0 ml oxychloridu fosforečného sa po kvapkách z miešania pridá k ľadom chladennej suspenzii 11,65 g 1,2,4-triazolu v 120 ml acetonitrilu, a potom sa za udržiavania vnútornej teploty zmesi pod 15 °C po kvapkách pridá 22,7 ml trietylaminu. Po 10 minútach sa pomaly pridá ešte roztok 6,27 g (±)-cis-1-((2-benzoyloxymetyl-1,3-oxatiolan-5-yl)-(1H)-pyrimidin-2,4-dionu (medziprodukt 2) v 330 ml acetonitrilu. Potom sa zmes mieša ešte cez noc pri teplote miestnosti. Zmes sa ochladí na ľadovom kúpeli, a potom sa pomaly pridá 30 ml trietylaminu, a potom ešte 21 ml vody. Výsledný roztok sa odparí a odparok sa delí medzi 400 ml nasýteného roztoku hydrogénuhlčitanu sodného a 3 x 200 ml chloroformu. Chloroformové extrakty sa spoja, vysušia síranom horečnatým, prefiltrujú a odparia, čím sa získa 9,7 g surového odparku. Tento odparok sa rozpustí v 240 ml 1,4-dioxánu a pridá sa 50 ml koncentrovaného vodného amoniaku (špecifická hmotnosť 0,880). Po 1,5 hodine sa roztok odparí a odparok sa rozpustí v metanole. Dôjde k vyzrážaniu pevnej látky, ktorá sa odfiltruje. Materský lúh sa čistí chromatografiou na oxide kremičitom, použije sa 600 g oxidu kremičitého (Merck 9385). Príslušné frakcie sa spoja a odparia, čím sa získa 2,18 g produktu vo forme červenohnedožltej pevnej látky, produkt je totožný s produktom, získaným postupom a).

Medziprodukt 4

(±)-cis-4-amino-1-(2-hydroxymetyl-1,3-oxatiolan-5-yl)-(1H)-pyrimidin-2-on

Suspenzia 8,19 g (±)-cis-4-amino-1-(2-benzoyloxymetyl-1,3-oxatiolan-5-yl)-(1H)-pyrimidin-2-onu (medziprodukt 3) a 8,24 g živice Amberlite IRA-400 (OH) sa mieša a zohrieva 1 1/4 hodiny na teplotu varu pod spätným chladičom. Pevný podiel sa odfiltruje a premyje sa metanolom. Filtráty sa spoja a odparia. Odparok sa rozotrie s 80 ml etylacetátu. Výsledná biela pevná látka sa odfiltruje, čím sa získa 5,09 g výsledného produktu.

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 3,04 (1H), 3,40 (1H), 3,73 (2H), 5,18 (1H), 5,29 (1H), 5,73 (1H), 6,21 (1H), 7,19 (2H), 7,81 (1H).

Príklad 1

(-)-cis-4-amino-1-(2-hydroxymetyl-1,3-oxatiolan-5-yl)-(1H)-pyrimidin-2-on

i) Tri banky s objemom 50 ml s obsahom živného bujónu (Oxoid Ltd) sa naočkujú plnou bakteriologickou slúčkou Escherichia coli (ATCC 23848), odobratou z platne živného agaru. Banky sa inkubujú cez noc pri teplote 37 °C

za pretrepávania 250 ot/min, a potom sa každá banka použije na naočkovanie 4 litrov prostredia CDD, obsahujúceho 3 g/l kyseliny glutamovej, 0,2 g/l síranu horečnatého, 2,5 g/l síranu draselného, 2,3 g/l NaCl, 1,1 g/l NaHPO₄·2H₂O, 0,6 g/l NaH₂PO₄·2H₂O a 1,2 g/l cytidínu vo fermentore s objemom 7 litrov. Kultúry boli pestované pri teplote 37 °C a 750 ot/min za prevzdušnenia 4 litrami za minútu. Po 24 hodinách boli bunky oddelené odstrednením pri 5000 g celkom 30 minút, čím bolo získaných 72 g vlhkej hmoty. Tento materiál bol znova uvedený do suspenzie v 300 ml 20 mM tris-HCl-pufra s pH 7,5 a bunky boli rozrušené pôsobením ultrazvuku 4 x 45 sekúnd. Bunková drvina bola odstránená odstrednením 30 minút pri 30 000 g a bielkovina supernatantu bola vyzrážaná pridaním síranu amónneho do 75% nasýtenia. Potom bola zrazenina oddelená odstrednením 30 minút pri 30 000 g a usadenina bola znova uvedená do suspenzie v 25 ml 100 mM pufra HEPES s pH 7,0 s obsahom síranu amónneho až do 75% nasýtenia. Roztok enzýmu bol pripravený odstrednením 30 minút pri 12 000 ot/min. Supernatant bol odložený a usadenina bola rozpustená v 100 mM tris-HCl-pufra s pH 7,0 na pôvodný objem.

ii) 115 mg medziproduktu 4 sa rozpustí v 100 ml vody a mieša sa. Potom sa pridá 0,5 ml roztoku enzýmu a zmes sa udržiava na stálom pH kontinuálnym pridávaním 25 mM kyseliny chlorovodíkovej. Premena sa sleduje chirálnou HPLC, ktorá dokazuje, že prednostne dochádza v substráte k deaminácii (+)-enantioméru. Po 22 hodinách je (+)-enantiomér v substráte (čas retencie 12,5 minút) úplne odstránený a pH roztoku sa upraví na 10,5 pridaním koncentrovaného hydroxidu sodného.

Získaný roztok sa nechá prejsť stĺpcom QAE Sephadexu s rozmerom 30 x 1,6 cm (A25, Pharmacia) v rovnovážnom stave pri pH 11. Stĺpec sa premyje 200 ml vody a potom sa vymýva 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou. Odbierajú sa frakcie po 40 ml a analyzujú sa pomocou HPLC v reverznej fáze. Frakcie 5 až 13, obsahujúce nezreagovaný (-)-enantiomér sa spoja a pH sa upraví na 7,5 kyselinou chlorovodíkovou. Frakcia 47, obsahujúca deaminovaný produkt sa upraví na pH 7,5 zriedeným hydroxidom sodným. Analýzou chirálneho HPLC možno preukázať, že materiál je zmesou, tvorenou z 90 % jedným enantiomérom s časom retencie 10,2 minút a obsahuje menšie množstvo druhého enantioméru s časom retencie 8,5 minút.

iii) Predchádzajúci stupeň (ii) sa opakuje vo väčšom meradle. 363 mg zlúčeniny z príkladu 1 v 250 ml vody sa inkubuje s 0,5 ml roztoku enzýmu, pripraveného rovnakým spôsobom ako v stupni i). Ďalšie podiely 0,5 ml enzýmu sa pridávajú po 18 a 48 hodinách. Reakčná zmes sa mieša 70 hodín, a potom sa nechá ďalších 64 hodín stáť. Analýza chirálnou HPLC dokazuje, že došlo k úplnej deaminácii (+)-enantioméru v substráte, výsledný roztok bol upravený na pH 10,5 pridaním NaOH.

Získaný roztok bol nanosený na ten istý stĺpec QAE a stĺpec bol vymývaný rovnako ako v stupni i). Frakcie 2 až 6, obsahujúce zmes zvyšného substrátu a deaminovaného produktu boli spojené. Frakcie 7 až 13, obsahujúce zvyšný substrát, (-)-enantiomér boli taktiež spojené a pH bolo upravené na 7,5. Frakcie 25 až 26, obsahujúce deaminovaný produkt boli spojené a neutralizované.

Frakcie 2 až 6 boli znova nanosené na ten istý stĺpec QAE. Frakcie 3 až 11 z tohto druhého stĺpca obsahovali nezreagovaný substrát, (-)-enantiomér, frakcia 70 obsahovala deaminovaný produkt.

iv) Rozdelené frakcie zo stupňa ii) a iii) boli spojené a pH bolo upravené na 7,5. Roztok bol nanosený na stĺpec s rozmerom 40 x 2,4 cm s náplňou XAD-16 vo vode. Stĺpec bol premytý vodou a ako elučné činidlo potom bola použitá zmes acetónu a vody v objemovom pomere 1 : 4. Frakcie s obsahom požadovaného (-)-enantioméru boli spojené a lyofilizované, čím bolo získané 190 mg bieleho prášku.

Boli vykonané nasledujúce postupy s použitím HPLC.

1. Analytická HPLC v reverznej fáze

stĺpec	rozmery 150 x 4,6 mm náplň Spherisorb ODS-2 (5 μm)
elučné činidlo	50 mM dihydrogénfosforečnanu amónneho + 5 % MeCN
rýchlosť prietoku	1,5 ml/min
detekcia	UV pri 270 nm
čas retencie	BCH-189 5,5 min deaminovaný BCH-189 8,1 min.

2. Chirálna analytická HPLC

stĺpec	rozmery 250 x 4,6 mm náplň Cyclobond I Acetyl
elučné činidlo	0,2 % trietylamóniumacetát s pH 7,2
rýchlosť prietoku	1,0 ml/min
detekcia	UV pri 270 nm
čas retencie	BCH-189 11,0 a 12,5 min deaminovaný BCH-189 8,5 a 10,2 min.

Biologická premena bola sledovaná záznamom ubúdania z materiálu z vrcholu pri čase retencie 12,5 min a hromadenia produktu s časom retencie 10,2 min.

Príklad 2

Protivírusový účinok jednotlivých zlúčenín a kombinácie

Zlúčeniny boli najskôr sériovo zriedené na mikrotitračných platniach s 96 vyhlbeninami, každé ďalšie riedenie bolo dvojnásobné vzhľadom na predchádzajúce riedenie. Titrácie boli pripravené zmiešaním 25 ml každého riedenia zlúčeniny samej osebe alebo v kombinácii (na konečný objem 50 ml na nových mikrotitračných platniach s 96 vyhlbeninami). Podiely buniek MT-4 (10⁶ buniek/ml) v rastovom prostredí RPMI 1640 boli infikované HIV-1, kmeň RF, bolo použitých 2 x 10⁻³ infekčných dávok/bunka. Vírus bol absorbovaný 90 minút pri teplote miestnosti a potom boli bunky premyté rastovým prostredím RPMI 1640 na odstránenie neadsorbovaného vírusu a znova uvedené do suspenzie v rastovom prostredí RPMI 1640 v množstve 10⁶/ml. 50 ml suspenzie infikovaných buniek bolo naočkovaných do vyhlbení obsahujúcich účinnú látku alebo len živné prostredie. 50 ml suspenzie buniek so simulovanou infekciou bolo naočkovaných do vyhlbení, neobsahujúcich účinnú látku. Platne boli inkubované 7 dní pri teplote 37 °C vo vzduchu s 5 % oxidu uhličitého.

Po ukončení inkubácie bolo pridaných do všetkých vyhlbení 10 ml 3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazóliumbromidu, MTT s obsahom 7,5 mg/ml tejto látky a platne boli inkubované ďalších 90 minút pri teplote 37 °C. Potom bolo pridaných 150 ml roztoku Tritonu X-100 v izopropanole s koncentráciou 10 % objemových a bunky

boli znova uvedené do suspenzie. Po 15 minútach pri teplote miestnosti boli platne analyzované odčítaním na zariadení Multiskan MC (Flow Laboratories, Irvine, UK) pri 405 nm. Premena žltého MIT na formazanový derivát je maximálna pri neinfikovaných neošetrených bunkách a nedochádza k nej pri neošetrených infikovaných bunkách.

Krivky závislosti účinku na dávke boli vytvorené pre každú zlúčeninu samé osebe (hodnoty IC_{50}) a pre recipročné titrácie každej zlúčeniny pri pevnej koncentrácii druhej látky. Potom boli vykonané izobologramy všetkých kombinácií zlúčenín na získanie hodnôt IC_{50} .

Na obr. 1 až 5 sú uvedené izobologramy pre 3 TC v kombinácii s AZT, ddC, ddI, Ro 31-8959 a R-82150 (TIBO). V prípade, že hodnota IC_{50} pre kombináciu zlúčenín leží na čiare, spájajúcej hodnoty pre každú jednotlivú látku samú osebe, je účinok oboch látok aditívny. V prípade, že je táto spojnica posunutá doľava, je účinok synergický.

Krivky závislosti odpovede od dávky pre 3TC v kombinácii AZT, ddC, ddI, Ro 31-8959 a R-82150 (TIBO) sú uvedené na obr. 1 až 5.

Pri stanovení protivírusového účinku týchto kombinácií neboli pozorované žiadne toxické účinky.

Príklad 3

Cytotoxicita zlúčenín samých osebe a v kombinácii

Pri vykonávaní týchto pokusov bola porovnávaná toxicita zlúčenín 3TC, AZT a ddC samých osebe a v kombinácii (pri pomeroch mg/ml 1 : 1, 1 : 5 a 5 : 1) pre neinfikované lymfocyty z periférnej krvi a pre stabilizovanú bunkovú líniu T-lymfocytmi.

Cytotoxicita bola meraná s použitím skúšky na príjem 3H -tymidínu. Typické krivky závislosti odpovede od dávky, získané pre každú jednotlivú zlúčeninu alebo pre kombináciu 1 : 1 s použitím buniek PBL sú znázornené na obr. 6 a 7.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Protivírusová zmes, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje (2R,cis)-4-amino-1-(2-hydroxy-metyl-1,3-oxatiolan-5-yl)-1H-pyrimidin-2-on (3TC) alebo jej farmaceuticky prijateľný derivát a 3'-azido-3'-deoxytymidín (AZT) alebo jeho farmaceuticky prijateľný derivát.

2. Protivírusová zmes podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje (2R,cis)-4-amino-1-(2-hydroxy-metyl-1,3-oxatiolan-5-yl)-1H-pyrimidin-2-on (3TC) a 3'-azido-3'-deoxytymidín (AZT).

3. Protivírusová zmes podľa nároku 1 alebo 2, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že hmotnostný pomer 3TC k AZT je 250 : 1 až 1 : 250.

4. Protivírusová zmes podľa nároku 1 až 3, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že hmotnostný pomer 3TC k AZT je 1 : 10 až 10 : 1.

5. Farmaceutický prípravok s antivírusovým účinkom **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje (2R,cis)-4-amino-1-(2-hydroxy-metyl-1,3-oxatiolan-5-yl)-1H-pyrimidin-2-on (3TC) alebo jej farmaceuticky prijateľný derivát a 3'-azido-3'-deoxytymidín (AZT) alebo jeho farmaceuticky prijateľný derivát podľa nároku 1 až 4 a farmaceuticky prijateľný nosič.

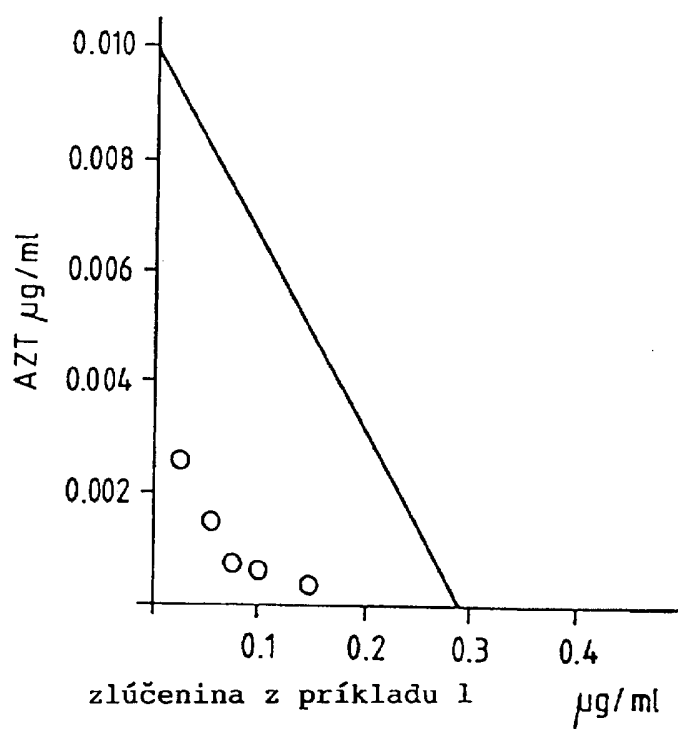
6. Farmaceutický prípravok podľa nároku 5, **v y -**

z n a č u j ú c i s a t ý m, že je vo forme na orálne podanie.

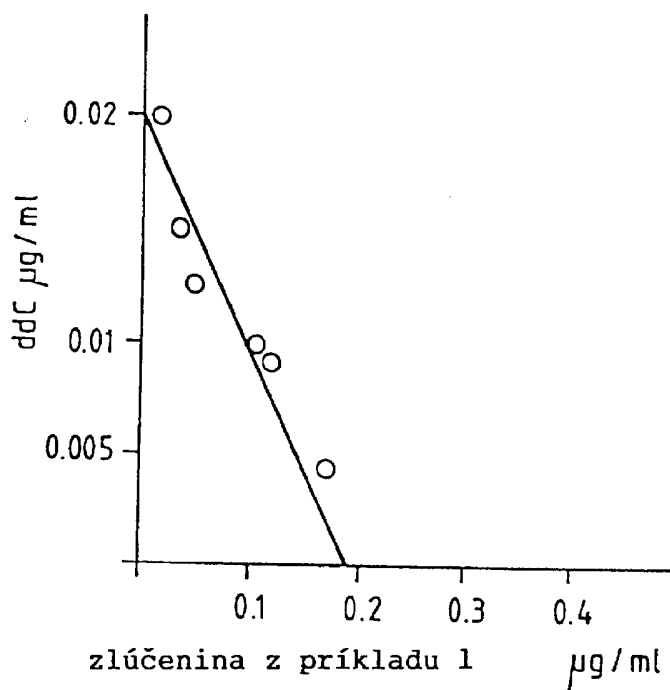
7. Použitie zmesi podľa nároku 1 až 4 na výrobu liečiva s antivírusovým účinkom.

4 výkresy

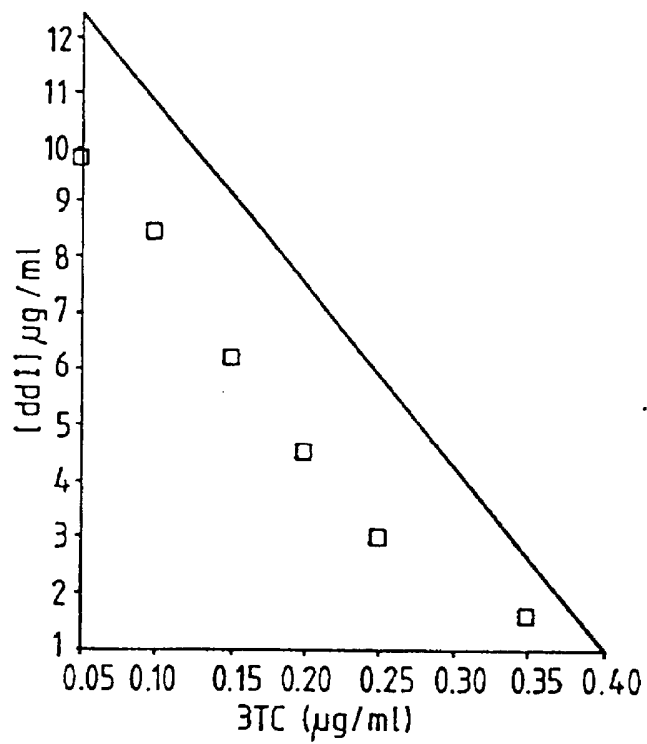
Obr. 1



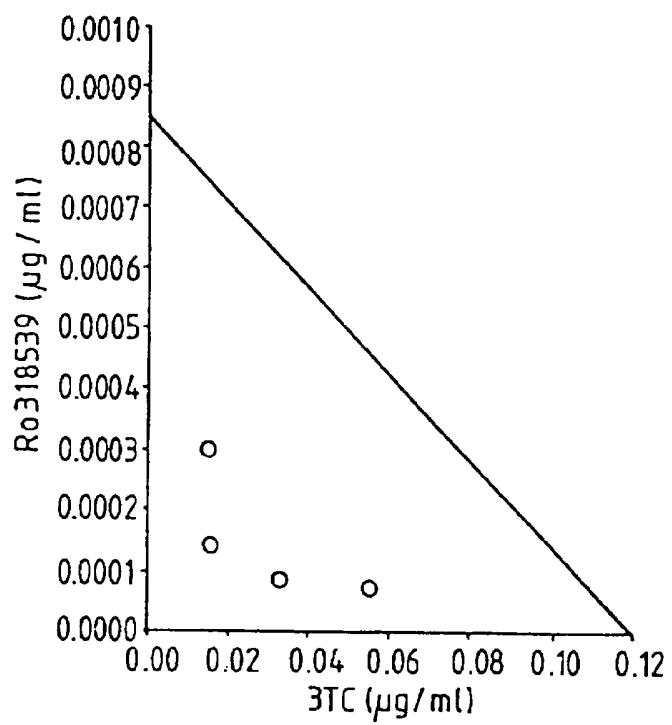
Obr. 2

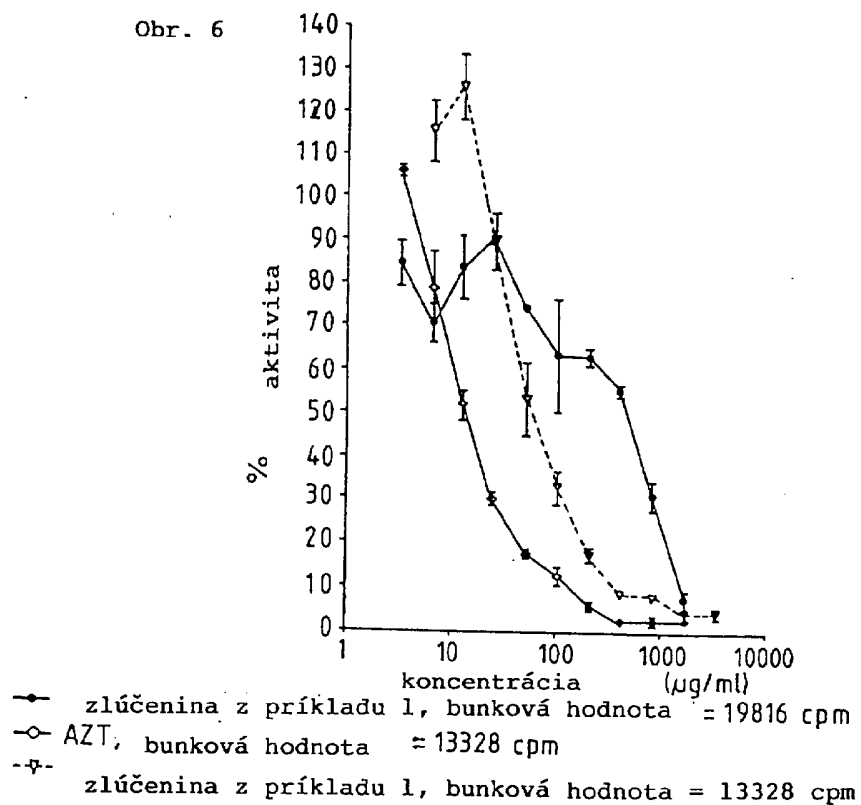
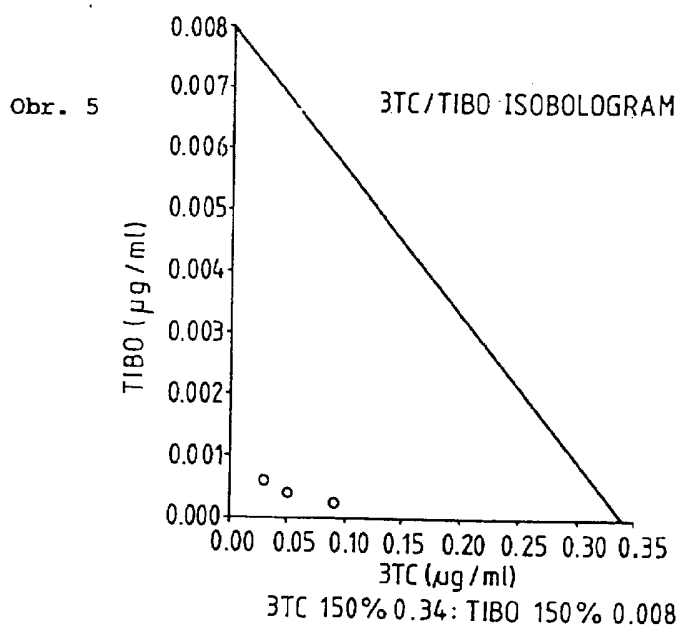


Obr. 3

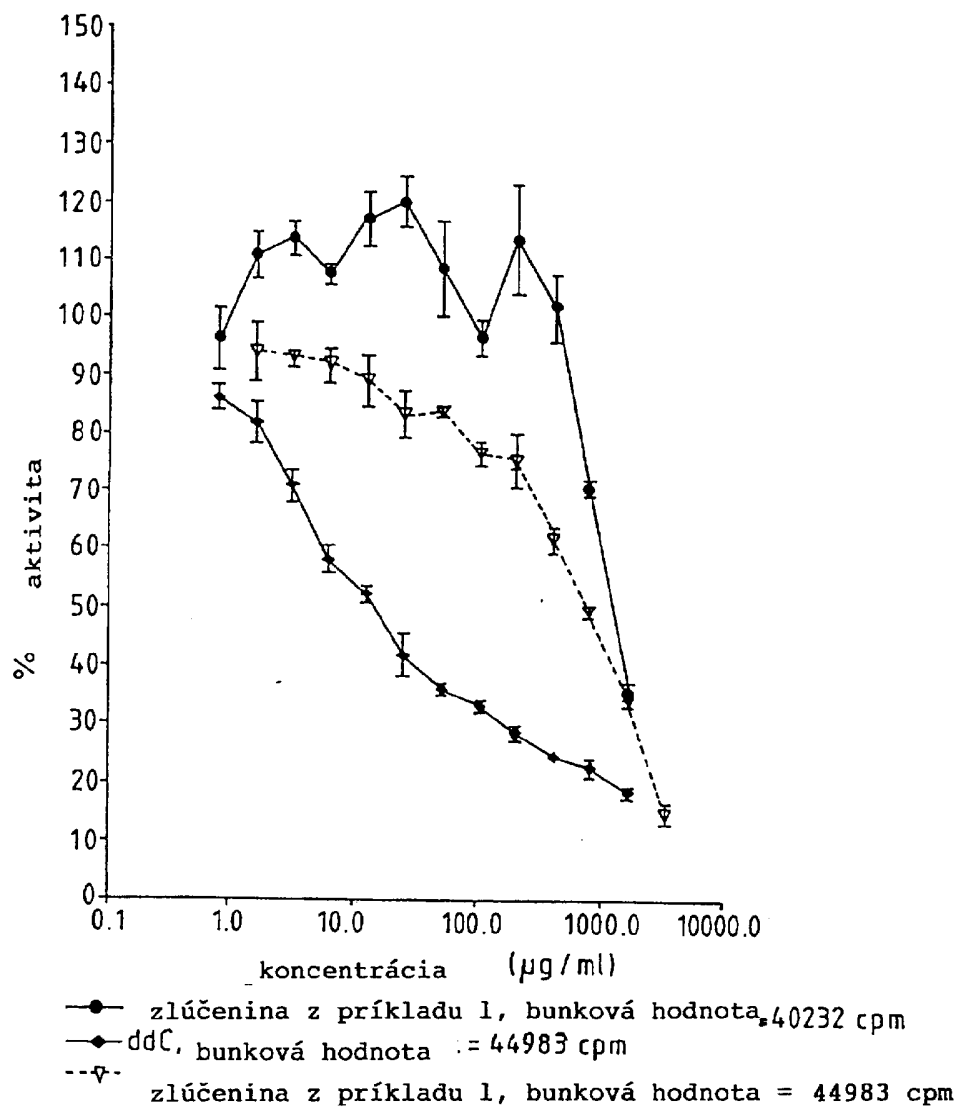


Obr. 4





Obr. 7



 Koniec dokumentu
