



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

208157
(11) (B2)

(22) Přihlášeno 17 08 78
(21) [PV 1946-79]
(32) (31) (33) Právo přednosti od 18 08 77
(825535) Spojené státy americké
(40) Zveřejněno 28 11 80
(45) Vydáno 15 04 84

(51) Int. Cl.³
C 07 C 87/127//
C 07 C 31/18//
A 61 K 31/13//
A 61 K 31/045

(72)
Autor vynálezu KRASKA ALLEN RICHARD, EAST LYME (Sp. st. a.)

(73)
Majitel patentu PFIZER INC., NEW YORK (Sp. st. a.)

(54) Způsob výroby nových aminových derivátů glycerolů

1

Vynález se týká způsobu výroby nových aminových derivátů glycerolů s protivirovým účinkem.

Virové infekce, které napadají savce včetně člověka, jsou nakažlivé a mohou způsobit velké zdravotní obtíže a hospodářské ztráty. Na neštěstí jsou objevy protivirových sloučenin daleko složitější a obtížnější, než je tomu v případě antibakteriálních látek a sloučenin účinných proti houbám. Jde patrně o to, že na překážku výzkumů je blízká strukturní příbuznost virů a některých podstatných složek buněk, například kyseliny ribonukleové a deoxyribonukleové. Přesto byla objevena řada protivirových látek nevírového původu, to jest sloučenin, jimiž je možno předcházet nebo léčit virové infekce, nebo jde o materiály, které podstatně zvyšují tvorbu protilátek, zlepšují jejich účinnost, zvyšují nespecifickou odolnost, urychlují uzdravení nebo snižují příznaky. [Herrman a další, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 103, 625 (1960)]. Mezi protivirová činidla patří například interferon a syntetické materiály, jako amantadinhydrochlorid, pyrimidiny, biguanidy, guanidin, pteridiny a methisazon. Protože každou z těchto látek je možno léčit jen několik málo virových infekcí, je nutno nacházet nové syntetické

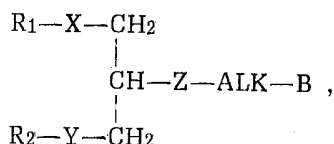
2

protivirové látky, aby bylo možno lépe předcházet virovým infekcím a léčit je.

Buňky savců produkují při virové infekci látku, která umožňuje buňce inhibovat rozmnožování viru. Tyto sloučeniny se nazývají interferony. Interferony jsou glykoproteiny, které se mohou lišit svými fyzikálněchemickými vlastnostmi, mají však stejné biologické vlastnosti, a to inhibici široké škály vzájemně nepříbuzných virů. Přitom tyto sloučeniny nemají toxické ani jiné nepříznivé účinky na buňky a jsou specifické v rámci jednoho druhu. [Lockart, Frontiers of Biology, sv. 2, „interferons“, vydavatelství Finster, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1966, str. 19 až 20].

Až dosud nebyla navržena žádná hospodárná a prakticky použitelná metoda k výrobě exogenního interferonu pro běžné chemické použití. Byly proto vyvíjeny snahy v jiném směru, aby bylo možno podat zvířatům nebo člověku, který má být chráněn proti infekci, látku nevírové povahy, která podporuje nebo vyvolá tvorbu interferonu v buňkách. Interferon získaný tímto způsobem se nazývá endogenní interferon.

V US patentu č. 2 738 351 se uvádí, že sloučeniny obecného vzorce



kde znamenají

R_1 a R_2 alkyl, arylalkyl, aryl, cykloalkyl, aryl substituovaný nitroskupinou nebo atomem halogenu, popřípadě alkylovou nebo alkoxylovou skupinou,

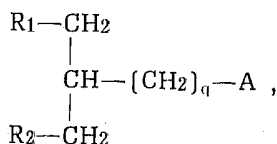
X , Y a Z atom kyslíku, atom síry nebo sulfonylovou skupinu,

ALK alkylen o 1 až 6 atomech uhlíku s přímým nebo rozvětveným řetězcem a

B bi(nižší)alkylaminoskupinu, piperidinovou skupinu, morfolinovou skupinu, pyrrolidinovou skupinu, (nižší)alkylpyrrolidinovou skupinu, N' -alkylpiperazinovou skupinu nebo piperolinovou skupinu,

jsou místní anestetika. Při vysvětlení různých cest k výrobě těchto sloučenin, například ve sloupci 1 na straně 11, v řádku 57 až 70 uvedeného patentu, jsou uváděny meziodukty svrchu uvedeného vzorce, v nichž B znamená aminoskupinu nebo nižší alkylaminoskupinu. Žádná z uvedených sloučenin však neobsahuje ve významu R_1 nebo R_2 vyšší alkylovou skupinu než n -pentyl. Mimoto v žádné z uvedených sloučenin neznamenaají oba substituenty R_1 a R_2 alkyl a X i Y atom kyslíku.

V japonském patentu č. J7-6042-177 se uvádějí insekticidní a miticidní sloučeniny obecného vzorce



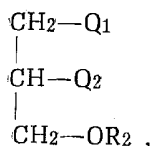
kde znamenají

R_1 a R_2 mimo jiné nižší alkylthioskupinu, q 0 až 5, a

A mimo jiné 1-piperidinovou skupinu nebo di(nižšíalkyl)aminoskupinu.

Nyní bylo zjištěno, že některé nové aminové deriváty di-O-(n -vyšší alkyl a alkenyl)-glycerolů jsou látkami, které mohou sloužit k potírání virových infekcí u savců.

Nové aminové deriváty glycerolů s protivirovým účinkem obecného vzorce I,



(I)

jakož i z farmaceutického hlediska přijatelné adiční soli těchto sloučenin s kyselinami,

kde jeden ze symbolů

Q_1 a Q_2 znamená skupinu $-O-Y-NHR_3$ a druhý skupinu $-OR_1$,

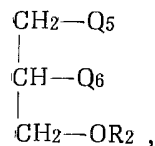
R_1 a R_2 znamenají alkyl s přímým řetězcem o 12 až 20 atomech uhlíku,

Y znamená alkylen o 2 až 4 atomech uhlíku, jehož valence se nacházejí na odlišných atomech uhlíku a

R_3 znamená atom vodíku nebo alkyl o 2 až 4 atomech uhlíku,

se vyrábějí způsobem podle vynálezu, jehož podstatou je, že se

a) uvede v reakci sloučenina obecného vzorce II,

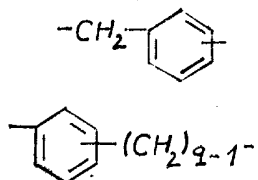


(II)

kde jeden ze symbolů

Q_5 a Q_6 znamená skupinu R_1O- a druhý skupinu $-O-Y'-CHO$,

Y' znamená alkylen o 1 až 3 atomech uhlíku, skupiny



jejichž levé vazby jsou spojeny s atomy kyslíku,

se sloučeninou obecného vzorce NH_2R_3 za redukčních podmínek, a

b) popřípadě se takto získaná sloučenina vzorce I převede na svou z farmaceutického hlediska přijatelnou sůl s kyselinou.

Sloučeniny vyráběné způsobem podle vynálezu mají přímý protivirový účinek na celou řadu virů in vivo u savců a in vitro ve tkáňových kulturách buněk savců. Podstatná část tohoto účinku spočívá patrně v tom, že sloučeniny podle vynálezu vyvolávají v buňkách tvorbu interferonu, jde tedy o endogenní interferon.

Pod pojmem „z farmaceutického hlediska přijatelné“ adiční soli s kyselinami se rozumějí soli, které jsou netoxické v užívaných dávkách. Jde o soli ve vodě rozpustné i nerozpustné, jako jsou hydrochloridy, hydrobromidy, fosforečnany, dusičnany, sírany, octany, hexafluorofosforečnany, citrónany, glukonáty, benzoáty, propionáty, máselnany, sulfosalicyláty, maleáty, lauráty, jablečnany, fumaráty, jantarány, štašelany, vínany, amsonáty (4,4'-diaminosilben-2,2'-disulfonáty), pamoáty (1,1'-metylen-bis-2-hydroxy-3-naftoáty), stearáty, 3-hydroxy-2-naftoáty, p-toluensulfonáty, methansulfonáty, laktáty a soli se suraminem.

Výhodnými skupinami sloučenin obecného vzorce I jsou:

hydrochloridy těchto sloučenin:

látky, v nichž R_1 a R_2 znamená alkyl s přímým řetězcem o 14 až 18 atomech uhlíku; sloučeniny, v nichž R_1 a R_2 znamenají alkyl s přímým řetězcem o 14 až 18 atomech

uhlíku, přičemž obě skupiny jsou totožné; látky, v nichž R₁ a R₂ znamenají n-hexadecyl;

látky, v nichž R₃ znamená atom vodíku a Y znamená alkylen s přímým řetězcem o 2 až 4 atomech uhlíku.

Zvláště cenné jsou následující sloučeniny a jejich z farmaceutického hlediska přijatelné adiční soli s kyselinami:

- 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-amino-propyl)glycerol,
- 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-amino-propyl)glycerol,
- 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(meta-amino-methylbenzyl)glycerol,
- 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(meta-amino-methylbenzyl)glycerol,
- 1,2-di-O-(n-tetradecyl)-3-O-(meta-amino-methylbenzyl)glycerol,
- 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(meta-amino-methylfenyl)glycerol,
- 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(para-amino-methylfenyl)glycerol,
- 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(para-amino-methylfenyl)glycerol.

Adiční soli sloučenin obecného vzorce I s kyselinami je možno připravit běžnými způsoby, například tak, že se smísí aminový derivát ve vhodném rozpouštědle s požadovanou kyselinou a sůl se izoluje odpařením nebo vysrážením po přidání rozpouštědla, v němž se sůl nerozpouští. Hydrochloridy lze snadno připravit tak, že se nechá procházet chlorovodík roztokem aminového derivátu v organickém rozpouštědle. Je zřejmé, že řada hydrochloridů nebo dihydrochloridů sloučenin obecných vzorců I obsahuje po izolaci určité množství vody. Neří známo, jde-li o krystalovou vodu nebo o tvorbu skutečných hydrátů, avšak i tyto soli je možno zpracovat na farmaceutické přípravky a podávat bez předchozí dehydratace.

Výchozí 1,2-di-O-(n-vyšší alkyl)glyceroly je možno získat způsobem podle publikace Kates M. a další, *Biochemistry*, 2, 394 (1963). Výchozí 1,3-di-O-(n-vyšší alkyl)glyceroly je možno získat způsobem podle publikace Damico R. a další, *J. Lipid Res.*, 8, 63 (1967). Výchozí 1,2- a 1,3-di-O-(n-vyšší alkenyl)glyceroly je možno získat způsobem podle publikace Bauman W. J. a Magold H. K., *J. Org. Chem.*, 31, 498 (1966).

Protivirový účinek sloučenin obecného vzorce I byl stanoven dvěma základními na sobě nezávislými postupy. Při prvním postupu se zkoumaná látka podává myším intraperitoneálně 18 až 24 hodin před podáním smrtelné dávky viru encefalomyokarditidy (EMC). 10 dní potom se zkoumá počet přežívajících myší a srovnává se s počtem myší, které přežívají bez ošetření. Postup se provádí tak, že se zkoumaná sloučenina podává daleko od místa, na němž se podává virus, takže je možno vyloučit vzájemné vlivy

mezi účinnou látkou a virem a zjistit pouze látky, které skutečně systemicky zvyšují odolnost proti viru.

Při druhém postupu se jednoduché vrstvy buněk lidských nosních polypů pěstují na plotnách malých rozměrů. Tyto buňky se pak uvedou ve styk se zkoumanými sloučeninami přibližně 18 hodin před tím, než se k buňkám přidá smrtelná dávka viru vaskulární stomatitidy (VSV). Zkoumaná látka se před nanesením viru z tkáňové kultury vymyje. Tekutina, která se extrahuje z ploten po infekci, se titruje, aby bylo možno zjistit obsah viru, který je na kulturách myších fibroblastů L-929. Stanovené hodnoty se srovnávají s hodnotami z tkáňových kultur, které nebyly uvedeny ve styk se sloučeninami podle vynálezu.

Mimoto byla celá řada sloučenin vyráběných způsobem podle vynálezu zkoumána na svou schopnost zvýšit známou protivirovou účinnost polyinosinové a polycytidylové kyseliny. Mimoto byly některé sloučeniny zkoumány na svoji schopnost indukovat tvorbu interferonu u myší po parenterálním podání způsobem popsáním v publikaci Hoffman, W. W., a další, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3, 498 až 501 (1973).

Při parenterálním, místním nebo intranazálním podání svrchu uvedených aminů savcům před infekcí virem dochází k rychlému vzniku odolnosti proti viru. S výhodou by mělo k podání účinné látky dojít alespoň 2 dny nebo den před infekcí, přestože se tato hodnota poněkud mění podle druhu viru a podle druhu živočicha, kterému se sloučenina podává.

Sloučeniny obecného vzorce I se nejsnadněji a nejehospodárněji podávají v dispergované formě spolu s vhodným nosičem. Pokud jde o pojem dispergované formy, jde o to, aby částice byly udrženy po jednotlivých molekulách v pravém roztoku ve vhodném rozpouštědle, dále může jít o koloidní částice, které tvoří popřípadě suspenzi nebo emulzi. Může také jít o částice rozptýlené v pevném nosiči, takže vzniká prášek. Takto vyrobené směsi jsou vhodné k použití jako spreje, ve formě roztoků, suspenzí nebo emulzí účinných látek podle vynálezu.

Při parenterálním, tj. podkožním nitrosvarovém nebo intraperitoneálním podání sloučenin obecného vzorce I se užívá dávek 1 až 250 mg/kg živé hmotnosti, s výhodou 5 až 100 mg/kg živé hmotnosti, zvláště 5 až 50 mg/kg živé hmotnosti. Dávka samozřejmě závisí na druhu savce, na aminu a je nutno ji stanovit výsledkem, který se získá při prvním podání. Obvykle se podávají na počátku malé dávky, které se postupně zvyšují až do dosažení optimálního účinku.

Pokud jde o nosiče pro parenterální podání, může jít o vodné kapaliny, jako jsou voda, isotoničný roztok chloridu sodného nebo dextrózy, Ringerův roztok, nebo jde o kapaliny nevodné povahy, například živo-

čišné nebo rostlinné oleje, jako je olej z lněných semen, arašídový, kukuřičný a sezamový olej, použít je však možno jakékoli rozpouštědlo, které neruší účinnost sloučenin obecného vzorce I a není toxické. Jde například o glycerol, ethanol, propylenglykol nebo sorbitol. Kapalně přípravky s obsahem sloučenin podle vynálezu mohou tedy obsahovat i směs různých kapalných ředidel, jako jsou propylenglykol, diethylkarbonát, glycerol nebo sorbitol.

Při intranazálním podání sloučenin obecného vzorce I je možno užít jakéhokoli způsobu, kterým lze uvést protivirovou sloučeninu ve styk s dýchacím systémem savce. Účinnými metodami jsou například podání nosních kapek nebo podání kapek přímo do nosohltanu, inhalace a rozprašování ve formě aerosolu. Tyto způsoby jsou zvláště důležité, protože jsou snadnými, bezpečnými a účinnými způsoby podání. Při intranazálním podání se obvykle užívá sloučenina obecného vzorce I spolu s nosičem v koncentraci 1 až 100 mg/ml nosiče. Koncentrace 30 až 50 mg/ml obvykle nejlépe vyhovuje.

Při místním podání se sloučeniny obecného vzorce I také s výhodou užívají spolu s vhodným nosičem, zejména proto, aby bylo možno zajistit dokonalé vstřebávání. V tomto případě se užívá koncentrace 1 až 250 mg/ml. Obvykle se ve svrhu uvedených dvou způsobech podání podává celkem 1 až 250 mg/kg sloučeniny obecného vzorce I, s výhodou 5 až 50 mg/kg.

Sloučeniny vyráběné způsobem podle vynálezu je možno užít jako takové nebo ve směsi s jednou nebo více pomocnými látkami nebo s dalšími léčivy, jako jsou analgetika, anestetika, antiseptika, látky snižující překrvení, antibiotika, vakcíny, pufrý a anorganické soli. Mimoto je možno tyto sloučeniny podávat ve směsi s hyaluronidázou, aby bylo možno vyloučit nebo snížit na co nejmenší míru podráždění a zvýšit rychlost vstřebávání sloučeniny podle vynálezu. Uvedený enzym se užívá v dávce alespoň 150 jednotek, přestože ve výjimečných případech je možno užít nižší nebo vyšší dávky.

Sloučeniny obecného vzorce I, které jsou nerozpustné ve vodě, nebo ty, jejichž rozpustnost ve vodě je nízká, se s výhodou podávají v suspenzích nebo emulzích, které dovolují tvorbu částic o rozměru nižším než 20 mikronů. Velikost částic totiž ovlivňuje biologickou účinnost sloučenin podle vynálezu, tento jev je patrně založen na lepší vstřebávání účinné látky. V přípravcích, které tyto látky obsahují, je možno užít i různá smáčedla a ochranné koloidy. Vhodnými smáčedly jsou například parciální estery běžných alifatických kyselin, jako jsou kyselina laurová, olejová nebo stearová, s hexitolovými anhydridy odvozenými od sorbitolu, a polyoxyethylenové deriváty těchto esterů. Tyto sloučeniny se běžně dodávají pod obchodními názvy „Spans“ a „Tweens“ a je možno je získat od ICI United States

Inc., Wilmington, Del. Ethery celulózy, zvláště methylether celulózy (methocel, Dow Chemical Co., Midland, Mich.), jsou vysoce účinné jako ochranné koloidy pro použití v emulzích, které obsahují sloučeniny podle vynálezu.

Jsou-li sloučeniny obecného vzorce I ve vodě rozpustné, je nejvýhodnější podávat je ve formě vodných roztoků, zejména ve fyziologickém roztoku s obsahem fosforečnanového pufru. Ve vodě nerozpustné sloučeniny se s výhodou podávají v přípravcích svrchu uvedeného typu. Vhodným rozpouštědlem pro sloučeniny nerozpustné ve vodě je například dimethylsulfoxid. Takový přípravek obsahuje například 25 až 100 mg zvolené účinné látky ve formě emulze ve směsi se stejným množstvím přípravku Polysorbát 80 ve směsi s glycerinem, ke směsi se přidá voda o teplotě 80 °C za energického míchání. Ke koncentrovanému roztoku se přidá chlorid sodný do konečné koncentrace 0,14 M a fosforečnan sodný o pH 7 do konečné koncentrace 0,01 M. Tímto způsobem je možno získat například následující přípravek:

	mg/ml
účinná látka	50,0
Polysorbát 80	50,0
glycerin	50,0
monohydrogenfosfát, hydratovaný	1,4
chlorid sodný	7,9
voda	842,0
	1001,3

V těch případech, v nichž dochází ke shlukování částic účinné látky, je možno užít ultrazvuku k získání homogenního systému.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

Příklad 1

1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(2-isopropylaminoethyl)glycerolhydrochlorid

A. 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-allylglycerol

1,78 g (37 mmolů) hydridu sodíku ve formě 50 % (hmotnostně) disperze v minerálním oleji se přidá při teplotě 60 °C k roztoku 10 g (18,5 mmolů) 1,2-di-O-(n-hexadecyl)glycerolu ve 100 ml N,N-dimethylformamidu a výsledný roztok se míchá 20 minut při teplotě 60 °C. Pak se po kapkách přidá 4,47 g (37 mmolů) allylbromidu a výsledná směs se míchá 3 hodiny při teplotě 90 °C, pak se zchladí, opatrně se zředí 200 ml vody k zastavení reakce a pak se extrahuje třikrát 150 ml etheru. Etherové extrakty se slíjí, promyjí se nasyceným vodným roztokem chloridu sodného, vysuší se síranem hořečnatým, zfiltrují a odpaří ve

vakuu na olejovitou kapalinu, která se čistí chromatografií na silikagelu, který se vymývá benzenem. Tímto způsobem se ve výtěžku 93 % získá 10 g olejovité výsledné látky.

NMR-spektrum (CDCl_3) δ :

5,66 až 6,16 (m, 1, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$),
5,25 (d dublety, 2, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) a
4,03 (d, 2, $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$).

B. 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-formyl-methylglycerol

90 mg (0,354 mmolu) kysličníku osmičelého se přidá k roztoku 6,5 g (7,75 mmolu) 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-allylglycerolu ve 120 ml směsi tetrahydrofuranu a vody v poměru 3 : 1 a vzniklý roztok se smíchá 5 minut při teplotě místnosti. Pak se přidá 9 g (42 mmolů) jodistanu sodného a reakční roztok se míchá 16 hodin při teplotě místnosti v atmosféře dusíku. Pak se reakční roztok zředí 150 ml vody a extrahuje se 2krát 150 ml etheru. Etherové extrakty se slíjí, promyjí se 150 ml vody, vysuší se síranem hořečnatým a odpaří ve vakuu na olejovitou kapalinu, která se čistí chromatografií na sloupci silikagelu, který se vymývá směsí benzenu a ethylacetátu, čímž se ve výtěžku 57 % získá 2,6 g voskovité pevné látky.

Spektrum v infračerveném světle v chloroformu má maximum při 1735 cm^{-1} .

NMR-spektrum (CDCl_3) δ :

9,38 (t, $J = 1\text{ Hz}$, 1, $-\text{OCH}_2\text{CHO}$) a
4,07 (d, $J = 1\text{ Hz}$, 2, $-\text{OCH}_2\text{CHO}$).

C. Výsledná látka

0,1 g (1,6 mmolu) kyanoborohydridu sodíku se přidá k roztoku 1,5 g (2,6 mmolu) 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-formylmethylglycerolu a 0,89 g (15 mmolů) isopropylaminu ve směsi methanolu a tetrahydrofuranu v poměru 1 : 1 v množství 50 ml a směs se míchá 2 hodiny při teplotě místnosti. Pak se upraví pH na hodnotu 6 přidáváním 5 N methanolového roztoku kyseliny chlorovodíkové, přidá se ještě 1,1 g (1,6 mmolu) kyanoborohydridu sodíku a reakční směs se míchá dalších 60 hodin při teplotě místnosti, pak se zfiltruje, přidá se 10 ml 3 N vodného roztoku hydroxidu sodného a 200 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného, načež se směs extrahuje 2krát 150 ml etheru. Etherové extrakty se slíjí, vysuší se síranem hořečnatým, zfiltrují a odpaří ve vakuu na olejovitou pevnou látku, která se čistí chromatografií na sloupci silikagelu, který se vymývá směsí benzenu a ethanolu, načež se výsledná látka

rozpustí v methanolu. Roztok se smísí s plyným chlorovodíkem a odpaří ve vakuu na pevnou látku, která se nechá překrystalovat z ethylacetátu. Tímto způsobem se ve výtěžku 23 % získá 400 mg pevné látky o teplotě tání 71 až 72 °C. Tato látka obsahuje 1/4 molu vody na 1 mol produktu.

NMR-spektrum (CDCl_3) δ :

1,42 [d, $J = 6\text{ Hz}$, 6, $-\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$].

Elementární analýza:

vypočteno:

72,02 % C, 12,76 % H, 2,10 % N,

nalezeno:

71,89 % C, 12,34 % H, 2,09 % N.

Příklad 2

Účinnost 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)glycerolhydrochloridu proti EMC viru in vivo

Přípravek ve formě emulze byl připraven roztavením a promísením stejných dílů účinné látky, přípravku polysorbát 80 a glycerinu s následnou disperzí směsi v horké vodě za energického míchání. Koncentrace směsi pak byla upravena na 0,14 M chloridu sodného s přísadkou 0,01 M fosforečnanu sodného o pH 7. Další ředění bylo prováděno pufrem, sestávajícím ze směsi 0,14 M chloridu sodného a 0,01 M fosforečnanu sodného o pH 7.

Třem skupinám samič bílých myší o hmotnosti 20 až 25 g bylo podáno 1,5, 5 a 15 mg účinné látky na 1 kg ve formě intraperitoneální injekce o objemu 0,5 ml. Čtvrtá, kontrolní skupina 10 myší byla ponechána bez ošetření. 18 až 24 hodin po podání injekce bylo podáno všem čtyřem skupinám v objemu 0,2 ml ve formě podkožní injekce množství, rovné 20násobku LD_{50} , tj. dávky, která způsobí uhynutí 50 % myší v průběhu 10 dnů, k injekci byl užit virus encefalomyokarditidy (EMC). V průběhu 10 dnů byl zaznamenáván počet přežívajících myší a byla zaznamenávána průměrná doba přežití (S_r).

Dávka účinné látky	S_r (průměr ze 7 pokusů)
15 mg/kg	61
5 mg/kg	45
1,5 mg/kg	24

Protivirová účinnost se vyjadřuje jako relativní doba přežití (S_r) v experimentálních skupinách ve srovnání s kontrolními skupinami 10. dne po injekci viru. Tato hodnota je definována následujícím způsobem:

$$S_r = \frac{S_x + \sum_{i=1 \text{ až } 10} x_i - \sum_{i=1 \text{ až } 10} a_i}{100 + 100 - \sum_{i=1 \text{ až } 10} a_i} \times 100$$

kde znamená

S_r poměrnou dobu přežití,

S_x procento přežití po 10 dnech v pokusné skupině,

x_i počet přežívajících myši v den „i“ v pokusné skupině a

a_i počet přežívajících myši v den „i“ v kontrolní skupině.

Příklad 3

Snížení výtěžku viru z buněk lidského polypu in vitro při použití 1,3-di-O-[n-hexadecyl]-2-O-(3-aminopropyl)glycerol-hydrochloridu

Růstové prostředí bylo připraveno tak, že 100 ml Eaglova základního prostředí bylo doplněno 2 ml 100krát koncentrovaného roztoku pro pěstování materiálu k určení účinnosti s obsahem antibiotika antimykotických látek, 1 ml (200 mmolů) roztoku glutaminu, 1 ml 100krát koncentrovaného roztoku neesenciálních aminokyselin, 1 ml roztoku pyrohroznanu sodného o koncentraci 100 mmolů a 10 % fetálního telecího séra, inaktivovaného teplem. Bylo užito destiček pro mikrotitraci s 96 vyhloubeními, do každého z těchto vyhloubení bylo vneseno 50 000 buněk lidského nosního polypu ve formě suspenze v 0,2 ml růstového prostředí. Destičky pak byly inkubovány 8 až 10 dní při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % kyslíkem uhličitým, aby se vytvořily souvislé jednoduché vrstvy buněk.

Na konci 8 až 10 dnů růstu byly takto získané vrstvy buněk čtyřikrát promyty fyziologickým roztokem chloridu sodného s obsahem fosfátového pufru, načež bylo přidáno do každého vyhloubení 0,2 ml udržovacího prostředí, které obsahovalo 10, 5,0, 1,0, 0,5, 0,1 a 0 µg/ml účinné látky. Udržovací prostředí mělo totéž složení jako růstové prostředí s tím rozdílem, že obsahovalo

pouze 2 % fetálního telecího séra. Destičky byly inkubovány dalších 18 hodin při teplotě 37 °C, načež byly vrstvy buněk znovu čtyřikrát promyty fyziologickým roztokem s obsahem fosfátového pufru, čímž byla odstraněna účinná látka, načež byla do vyhloubení přiváděna dávka odpovídající 1000krát TCID₅₀, což je dávka, která způsobí 50% infekci u nechráněných kultur. Byl užit virus vesikulární stomatitidy (VSV), který byl ponechán v kulturách 2 hodiny při teplotě 37 °C, pak byly kultury promyty čtyřikrát fyziologickým roztokem chloridu sodného s obsahem fosfátového pufru k odstranění neadsorbovaných částic viru a do každého vyhloubení bylo znovu přidáno 0,2 ml udržovacího prostředí. Pak byly destičky inkubovány 7 hodin při teplotě 37 °C, načež byla z každé destičky odebrána kapalina, tato kapalina byla skladována ve zmraženém stavu ve zkumavkách a byla titrována na množství infekčního viru při použití vyšších fibroblastů L-929. Tyto kultury myších buněk byly po 3 až 4 dnech analyzovány, v následující tabulce jsou uvedeny poklesy výtěžků viru proti kontrole, stanovené pro pět použitých koncentrací svrchu uvedené účinné látky.

Snížení výtěžku viru v %

Koncentrace účinné látky v (µg/ml)

10	5,0	1,0	0,5	0,1
94 %	90 %	84 %	75 %	< 68 %

Příklad 4

Způsobem podle příkladu 3 bylo stanovené snížení výtěžků viru z buněk lidského polypu in vitro i pro sloučeninu uvedenou v následující tabulce:

Příklad číslo	Sloučenina vyrobena podle příkladu číslo	% snížení výtěžku viru ^a koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)				
		10	5,0	1,0	0,5	0,1
4	11	+	+	—	ND	ND

(a) + = > 68% snížení, $\pm$ = ~ 68% snížení, — = < 68% snížení, ND = nebylo provedeno

Příklad 5

Schopnost 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)glycerolhydrochloridu vyvolat tvorbu interferonu, který lze prokázat v oběhu

Směs stejných hmotnostních dílů účinné látky, přípravku polysorbát 80 a glycerolu se roztaví a pak se homogenizuje v horkém roztoku chloridu sodného o koncentraci 0,14 M s obsahem 0,01 M fosforečnanu sodného o pH 7 (PBS). Výsledná emulze typu olej ve vodě se dále ředí před podáním.

Svýcarským myším samicím o hmotnosti 20 až 25 g se podá ve formě intraperitoneální injekce o obsahu 0,5 ml množství zředěné emulze obsahující účinnou látku v dávce 25 mg/kg živé hmotnosti. 8, 12, 16 a 20 hodin po injekci byly odebrány vzorky plazmy od čtyř myší a tyto vzorky byly slity. Sériové zředění v L-15 (Leibovitzově prostředí) s obsahem 5 % fetálního telecího séra bylo inkubováno na destičkách pro mikrotitraci přes noc při teplotě 37 °C na souvislé jednotlivé vrstvy myších fibroblastů L-929. Vrstvy pak byly omyty prostředím prostým bílkovin, načež byly uvedeny ve styk s dávkou odpovídající 10krát TCID₅₀, což je dávka, která způsobí 50% infekci v nechráněných kulturách. K infekci byl

užit virus vezikulární stomatitidy (VSV), který byl s kulturou ve styku 1 hodinu při teplotě 37 °C, neadsorbovaný virus byl vymyt a buňky byly znovu uvedeny ve styk s prostředím L-15 s obsahem 5 % fetálního telecího séra, načež byly znovu inkubovány 48 hodin při teplotě 37 °C. Kultury L-929 byly pak mikroskopicky zkoumány na cytopatologické změny způsobené virem, přičemž bylo možno prokázat nepřímou závislost mezi hladinou interferonu v plazmě a poškozením fibroblastů. Současně bylo stanoveno ředění plazmy, které může zaručit 50% ochranu jednoduchých vrstev buněk L-929.

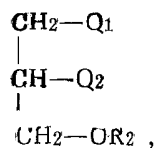
Druhý pokus byl proveden obdobným způsobem, s tím rozdílem, že myším bylo injekčně podáno 10 mg účinné látky/kg a pak byly odebrány vzorky peritoneální tekutiny od čtyř myší a tyto vzorky byly slity. Vzorky byly opět odebírány 6, 9, 12, 15 a 18 hodin po injekci. Vzorky byly odebírány tak, že po otevření břišní dutiny bylo vstříknuto 1 ml Hankova vyváženého roztoku s obsahem 100 jednotek penicilinu/ml a 100 μg streptomycinu/ml, pak se krátce masíruje břicho, načež se odebere z peritoneální dutiny kapalina.

Výsledky získané z obou pokusů jsou uvedeny v následující tabulce:

Zdroj inter- feronu	Zdroj interferonu Hladina interferonu (jednotky/ml) po injekci v [h]							
	6	8	9	12	15	16	18	20
plazma	—	34	—	67	—	52	—	40
perito- neální kapalina	16	—	768	320	448	—	448	—

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby nových aminových derivátů glycerolů s protivirovým účinkem, obecného vzorce I,



(I)

jakož i z farmaceutického hlediska přijatelných adičních solí těchto sloučenin s kyselinami, kde jeden ze symbolů

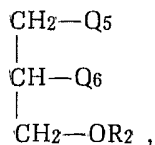
Q_1 a Q_2 znamená skupinu $-\text{O}-\text{Y}-\text{NHR}_3$ a druhý skupinu $-\text{OR}_1$,

R_1 a R_2 znamenají alkyl s přímým řetězcem o 12 až 20 atomech uhlíku,

Y znamená alkylen o 2 až 4 atomech uhlíku, jehož valence se nacházejí na odlišných atomech uhlíku a

R_3 znamená atom vodíku nebo alkyl o 2 až 4 atomech uhlíku,

vyznačující se tím, že se uvede v reakci sloučenina obecného vzorce II,

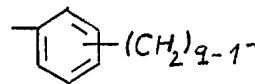
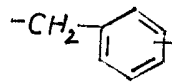


(II)

kde jeden ze symbolů

Q_5 a Q_6 znamená skupinu $\text{R}_1\text{O}-$, kde R_1 má shora uvedený význam, a druhý skupinu $-\text{O}-\text{Y}'-\text{CHO}$,

Y' znamená alkylen o 1 až 3 atomech uhlíku, skupiny



jejichž levé vazby jsou spojeny v atomy kyslíku, se sloučeninou obecného vzorce NH_2R_3 , kde R_3 má výše uvedený význam, za redukčních podmínek, a popřípadě se takto získaná sloučenina obecného vzorce I převede na svou z farmaceutického hlediska přijatelnou sůl s kyselinou.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se užije výchozího materiálu obecného vzorce II, v němž R_1 a R_2 znamenají alkyl s přímým řetězcem o 14 až 18 atomech uhlíku.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se užije výchozího materiálu obecného vzorce II, v němž R_1 a R_2 znamenají n-hexadecylový zbytek.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se užije výchozího materiálu obecného vzorce II, v němž R_1 a R_2 znamenají n-hexadecylový zbytek, Y' znamená n-ethylen, přičemž jde o sloučeninu, v níž je skupina $-\text{O}-\text{Y}'-\text{CHO}$ v poloze 2.