

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1998 - 2322

(22) Přihlášeno: 14.02.1997

(30) Právo přednosti:

16.02.1996 SE 1996/9600613

16.02.1996 SE 1996/9600614

(40) Zveřejněno: 14.10.1998

(Věstník č. 10/1998)

(47) Uděleno: 09.06.2003

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 13.08.2003

(Věstník č. 8/2003)

(86) PCT číslo: PCT/SE97/00241

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 97/030051

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:

C 07 D 473/18

C 07 D 473/32

A 61 K 31/522

A 61 P 31/12

A 61 P 31/22

(73) Majitel patentu:

MEDIVIR AB, Huddinge, SE;

(72) Původce vynálezu:

Engelhardt Per, Stockholm, SE;

Högberg Marita, Tullinge, SE;

Zhou Xiao-Xiong, Huddinge, SE;

Lindborg Björn, Björnlunda, SE;

Johansson Nils Gunnar, Enhörna, SE;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název vynálezu:

**Acyklické nukleosidové deriváty, způsob jejich
přípravy a farmaceutické kompozice s jejich
obsahem**

(57) Anotace:

Acyklické nukleosidové deriváty obecného vzorce I, ve kterém
jeden ze substituentů R_1 a R_2 představuje skupinu

$-C(O)CH(CH_2CH_3)_2NH_2$ nebo skupinu

$-C(O)CH(CH_2CH_3)CH_2CH_3NH_2$ a druhý ze substituentů R_1 a

R_2 představuje $-C(O)C_3-C_{21}$ alkyl nebo mononenasycený

alkenyl, popřípadě substituované jednou až pěti skupinami

vybranými ze souboru, zahrnujícího hydroxylovou skupinu,

C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkoxy, C_1-C_6 alkoxy- C_1-C_6 alkyl, C_1-

C_6 alkanoyl, skupinu amino, atom halogenu, skupinu kyano,

azido, oxo, merkpto a nitro a R_3 představuje OH skupinu

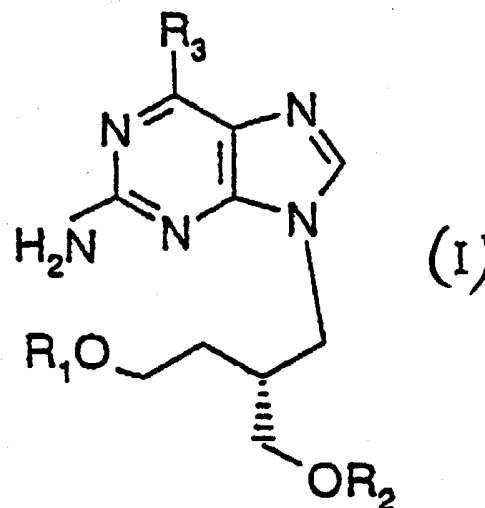
nebo atom vodíku; a jejich farmaceuticky přijatelné sole, které

jsou účinné jako antivirální činidla proti herpes a retrovirálním

infekcím. Tato činidla mají zvýšenou biologickou dostupnost.

Dalšími řešenými jsou farmaceutické kompozice s obsahem

sloučeniny I, jejich použití a způsob jejich přípravy.



Acyklické nukleosidové deriváty, způsob jejich přípravy a farmaceutické kompozice s jejich obsahem

5 Oblast techniky

Vynález se týká oblasti protivirových činidel a obzvláště derivátů acyklických nukleosidů použitelných proti herpes a retrovirálním infekcím. Vynález se týká nových sloučenin, farmaceutických kompozic, obsahujících tyto sloučeniny, způsobů léčení nebo prevence virálních infekcí, 10 které je využívají, způsobů jejich výroby a nových meziproduktů.

Dosavadní stav techniky

15 Praktická užitečnost mnoha acyklických nukleosidů je omezena jejich relativně slabou farmakokinetickou. Ve snaze zlepšit biologickou dostupnost acyklických nukleosidů obecně byla prozkoumána řada prekurzorových přístupů. Jeden z těchto přístupů zahrnuje přípravu esterových derivátů, obzvláště alifatických esterů, jedné nebo více hydroxy skupin na acyklické postranním řetězci.

20 Evropský patent EP 165 289 popisuje slibné antiherpes činidlo 9-[4-hydroxy-(2-hydroxymethyl)butyl]guanin, jinak známý jako H2G. Evropský patent EP 186 640 popisuje 6-deoxy H2G. Evropský patent EP 343 133 ukazuje, že tyto sloučeniny, obzvláště R-(-) enantiomer, jsou navíc účinné proti retrovirálním infekcím jako je HIV. Různé deriváty H2G, jako jsou fosfonáty, 25 alifatické estery (například diacetát a dipropionát) a ethery hydroxy skupin na acyklickém postranním řetězci jsou popsány v EP 343 133. Tento patent také popisuje způsoby přípravy těchto derivátů, zahrnují kondenzaci acyklického postranního řetězce v N-9 poloze typicky 6-halogenované purinové skupiny nebo alternativně uzavření imidazolového kruhu pyrimidinové nebo furazono-[3,4-d]pyrimidinové skupiny nebo uzavření pyrimidinového kruhu imidazolové 30 skupiny, kde acyklický postranní řetězec je již přítomen v prekurzorové pyrimidinové nebo imidazolové skupině. V nejširším popisu obou těchto způsobů je acyklický postranní řetězec předem derivován, ale individuální příklady také ukazují diacylaci v jednom kroku H2G s anhydridem kyseliny octové nebo propionové a DMF.

35 Hamden a kol., J. Med. Chem. 32, 1738 (1989) zkoumali řadu alifatických esterů s krátkým řetězcem acyklického nukleosidu 9-[4-hydroxy-(3-hydroxymethyl)butyl]guaninu, také známého jako penciclovir a jeho 6-deoxy analogu. Fanciclovir, komerční antivirální činidlo je diacetylový derivát 6-deoxy pencicloviru.

40 Benjamin a kol., Pharm. Res. 4 No. 2, 120 (1987) popisuje alifatické estery s krátkým řetězcem 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)-methyl]guaninu, jinak známého jako ganciclovir. Dipropionátový ester je popsán jako výhodný ester.

45 Lake-Bakaar a kol., opisují v Antimikrob. Agents Chemother. 33 No. 1, 110-112 (1989) diacetát a dipropionát derivátů H2G a monoacetát a diacetát derivátů 6-deoxy H2G. Je uvedeno, že diacetátové a dipropionátové deriváty H2G přinášejí pouze mírné zlepšení biologické dostupnosti ve srovnání s H2G.

50 Mezinárodní patentová přihláška WO94/24134, publikovaná 27. října 1994, popisuje alifatický ester prekurzor 6-deoxy N-7 analogu gancicloviru, zahrnující dipivaloylové, divaleroxylové, monovaleroxylové, monooleoxylové a monostearoxylové estery.

55 Mezinárodní patentová přihláška WO93/07163, publikovaná 15. dubna 1993 a Mezinárodní patentová přihláška WO94/228871 publikovaná 13. října 1994, popisují mono-esterové deriváty nukleosidových analogů odvozené z mono- nenasycených C₁₈ nebo C₂₀ mastných kyselin. Patent

US 5 216 142, vydaný 1. června 1993, také popisuje mono-esterové deriváty mastných kyselin s dlouhým řetězcem nukleosidových analogů.

Druhý přístup k vytváření prekurzorů acyklických nukleosidů zahrnuje přípravu amino-kyselinových esterů jedné nebo více hydroxy skupin na acyklické postranním řetězci. Evropský patent EP 99 493 popisuje obecně aminokyselinové estery acyklovirů a Evropská patentová přihláška EP 308 065, publikovaná 22. března 1989, popisuje valinové a izoleucinové estery acykloviru.

Evropská patentová přihláška EP 375 329, publikovaná 27. června 1990, popisuje amino-kyselinové esterové deriváty ganciclovirů, zahrnující divalinové, diizoleucinové, diglycinové a dialaninové esterové deriváty. Mezinárodní patentová přihláška WO95/09855, publikovaná 13. dubna 1995, popisuje aminokyseliny esterové deriváty pencicloviru, zahrnující monovalinové a divalinové esterové deriváty.

DE 19526163, publikovaná 1. února 1996 a patent US 5 543 414, vydaný 6. srpna 1996, popisují chirální aminokyselinové estery gancicloviru.

Evropská patentová přihláška EP 694 547, publikovaná 31. ledna 1996, popisuje mono-L-valinový ester gancicloviru a jeho přípravu z divalyl-gancicloviru.

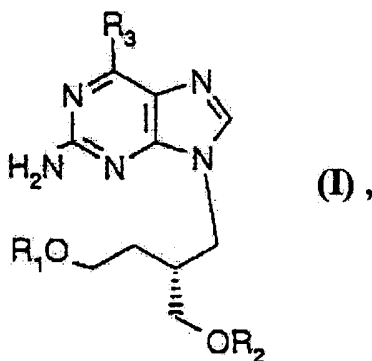
Evropská patentová přihláška EP 654 473, publikovaná 24. května 1995, popisuje různé bis aminokyselinové estery derivátů 9-[1',2'-bishydroxymethyl]-cyklopropan-1'yl]methylguaninu.

Mezinárodní patentová přihláška WO95/22330, publikovaná 24. srpna 1995, popisuje alifatické estery, aminokyselinové estery a smíšené acetát/valinové estery acyklického nukleosidu 9-[3,3-dihydroxymethyl-4-hydroxy-buterc.1-yl]guaninu. Tato reference popisuje, že biologická dostupnost je redukována, když jeden z valinových esterů trivalinového esterového derivátu je nahrazen acetátovým esterem.

Podstata vynálezu

Přihlašovatelé zjistili, že diesterové deriváty H2G nesoucí specifické kombinace amino-kyselinových esterů a esterů mastných kyselin jsou schopné přinést významně zlepšenou orální biologickou dostupnost vzhledem k základní sloučenině (H2G).

Podstatou předloženého vynálezu jsou nové sloučeniny obecného vzorce I



ve kterém

a) R_1 představuje skupinu $-C(O)CH(CH(CH_3)_2)NH_2$ nebo $-C(O)CH(CH(CH_3)CH_2CH_3)NH_2$ a R_2 představuje $-C(O)C_3-C_{21}$ alkyl nebo alkenyl, popřípadě substituované jednou až pěti

skupinami vybranými ze souboru, zahrnujícího hydroxylovou skupinu C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkoxy, C_1-C_6 alkoxy- C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkanoyl, skupinu amino, atom halogenu, skupinu kyano, azido, oxo, merkpto a nitro.

- 5 b) R_1 představuje $-C(O)C_3-C_{21}$ alkyl nebo alkenyl, popřípadě substituované jednou až pěti skupinami vybranými ze souboru, zahrnujícího hydroxylovou skupinu, C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkoxy, C_1-C_6 alkoxy- C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkanoyl, skupinu amino, atom halogenu, skupinu kyano, azido, oxo, merkpto a nitro

- 10 a R_2 představuje skupinu $-C(O)CH(CH(CH_3)_2NH_2)$ nebo $-C(O)CH(CH(CH_3)CH_2CH_3)NH_2$; a

R_3 představuje skupinu $-OH$ nebo její tautomerní formu $=O$ a nebo atom vodíku;

a její farmaceuticky přijatelné soli.

15

Předmětem vynálezu je i farmaceutická kompozice která zahrnuje sloučeninu obecného vzorce I spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

- 20 Dalším předmětem vynálezu je použití sloučeniny obecného vzorce I pro přípravu léčiva k léčení nebo prevenci virálních infekcí.

Dalším předmětem předloženého vynálezu je způsob přípravy sloučeniny, který zahrnuje

- 25 a) přípravu ochrany purinových poloh 2 a/nebo 6 sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém R_1 a R_2 jsou každý atom vodíku, a R_3 má význam uvedený výše, N-ochrannou skupinu;

b) místně selektivní acylaci sloučeniny obecného vzorce I v 4-hydroxy skupině postranního řetězce buď

- 30 i) popřípadě N-chráněnou valinovou, nebo izoleucinovou skupinu nebo
ii) popřípadě substituovaným, (C_3-C_{21}) alkyl, nebo alkenyl-COOH derivát nebo
iii) místně selektivní ochrannou skupinou;

35

c) acylaci 2-hydroxymethyl skupinu v postranním řetězci

- i) popřípadě N-chráněnou valinovou nebo izoleucinovou skupinu nebo
40 ii) popřípadě substituovaným, (C_3-C_{21}) alkyl nebo alkenyl-COOH derivátem;

d) nahrazení místně selektivní ochranné skupiny v R_1 , pokud je přítomna,

- i) popřípadě N-chráněnou valinovou nebo izoleucinovou skupinou; nebo
45 ii) popřípadě substituovaným, (C_3-C_{21}) alkyl nebo alkenyl-COOH derivátem; a

e) zbavení výsledné sloučeniny ochranných skupin v případě potřeby.

- 50 Výhodný účinek na orální biologickou dostupnost smíšených esterů mastných kyselin a amino-kyselin podle předloženého vynálezu je obzvláště neočekávaný ve srovnání s orální biologickou dostupností odpovídajících esterů mastných kyselin. Na základě výsledků testů, založených na odběru moči (Tabulka 1A) nebo hladiny H2G v plasmě (Tabulka 1B) u krys, ani mono ani diestery mastných kyselin H2G nepřinášejí žádné zlepšení orální biologické dostupnosti
55 vzhledem k výchozí sloučenině H2G. Distearanový derivát přinesl dokonce významně nižší

biologickou dostupnost než základní sloučenina, což indikovalo, že stearanový ester může být škodlivý pro zlepšení orální biologické dostupnosti H2G.

Bylo zjištěno, že konverze jednoho nebo obou hydroxylů jistých dalších acyklických nukleosidových analogů na odpovídající valinové nebo divalinové estery zlepšuje biologickou dostupnost. Konverze H2G na odpovídající mono nebo divalolylové esterové deriváty přineslo podobné zlepšení biologické dostupnosti vzhledem k výchozí sloučenině. Vzhledem k tomu, že deriváty H2G na základě mastných kyselin jsou prokazatelně nepříznivé pro zlepšení biologické dostupnosti, bylo nečekané, že smíšené diesterové deriváty H2G na základě aminokyselin/mastných kyselin mohou přinést zlepšenou nebo srovnatelnou orální biologickou dostupnost vzhledem k orální biologické dostupnosti valinových diesterových derivátů H2G, měřenou testy, založenými na odběru moči a určování hladiny látky v plasmě.

Tabulka 1A

R ₁ skupina	R ₂ skupina	biologická dostupnost*
atom vodíku	atom vodíku	8 %
atom vodíku	stearoyl	12 %
stearoyl	stearoyl	1 %
valyl	atom vodíku	29 %
valyl	valyl	36 %
valyl	stearoyl	56 %

* viz Biologický Příklad 1 podaný níže pro detaily

Tabulka 1B

R ₁ skupina	R ₂ skupina	biologická dostupnost
atom vodíku	atom vodíku	3,8 %
atom vodíku	stearoyl	1,9 %
stearoyl	stearoyl	0 %
valyl	atom vodíku	31,3 %
valyl	valyl	35,0 %
valyl	stearoyl	29 %

* viz Biologický Příklad 2 podaný níže pro detaily

Vynález se také týká farmaceutických kompozic obsahujících sloučeniny obecného vzorce I a jejich farmaceuticky přijatelných solí spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem. dalším předmětem vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I jejich farmaceuticky přijatelné soli pro použití při léčení a použití těchto sloučenin a solí při přípravě léčiv pro léčení nebo prevenci virální infekce u člověka nebo zvířat.

Sloučeniny podle vynálezu jsou silná protivirová činidla, obzvláště proti herpes infekci, jako jsou infekce, způsobené virem Varicella zoster, virem Herpes simplex typu 1 a 2, virem Epstein-Barr, virem Herpes typ 6 (HHV-6) a typ 8 (HHV-8). Sloučeniny jsou obzvláště použitelné proti infekcím virem Varicella zoster jako je pásový opar u starých osob, zahrnující postherpetickou neuralgii nebo plané neštovice u mladých osob, kde trvání a síla onemocnění může být snížena o několik dní. Infekce virem Epstein-Barr, ovlivněné léčením sloučeninami podle vynálezu, zahrnuje infekční mononukleózu/glandulární (žlázovou) horečku, které dříve nebyly léčitelné, ale které mohou způsobit mnohoměsíční školní neschopnost u dospívajících.

Sloučeniny podle vynálezu jsou také účinné proti jistým retrovirálním infekcím, zejména SIV, HTV-1 a HVI-2 a proti infekcím, u nichž je indikován transaktivační virus.

- 5 V souladu s tím, se další předmět vynálezu týká způsobu prevence nebo léčení virální infekce u člověka nebo zvířat, zahrnující podávání účinného množství sloučeniny obecného vzorce I nebo její farmaceuticky přijatelné soli člověku nebo zvířeti.

- 10 Skupina R_3 je výhodně hydroxy nebo její tautomer $=O$ tak, že základní část sloučeniny podle vynálezu je přirozený guanin, například v případě, že postranní řetězec je štěpen *in vivo*. Alternativně může R_3 být atom vodíku, což definuje obecně rozpustnější 6-deoxy derivát, který může být oxidován *in vivo* (například xanthin oxidázou) na guaninovou formu.

- 15 Sloučenina obecného vzorce I může být přítomna v racemické formě, což znamená, že je směsí 2R a 2S izomerů. Výhodně však sloučenina obecného vzorce I obsahuje 70 %, výhodně alespoň 90 % R formy, například více než 95 %. Nejvýhodněji je sloučenina obecného vzorce I v enantiomernicky čisté R formě.

Aminokyselina skupiny R_1/R_2 je výhodně odvozena od L-aminokyseliny.

- 20 Mastná kyselina skupiny R_1/R_2 má výhodně celkově sudý počet atomů uhlíku, obzvláště je představována dekanoylem (C_{10}), laurylem (C_{12}), myristoylem (C_{14}), palmitoylem (C_{16}), stearoylem (C_{18}) nebo eikosanoylem (C_{20}). Další použitelné R_1/R_2 skupiny zahrnují butyryl, hexanoyl, oktanoyl nebo behenoyl (C_{22}). Další použitelné R_1/R_2 skupiny zahrnují skupiny odvozené z kyselin myristoleové, myristelaidové, palmitoleové, palmitelaidové, n6-okta-
- 25 dekanové, olejové, elaidové, gandové, erukové nebo brasidové kyseliny. Mononenasycené estery mastných kyselin mají typicky dvojně vazby v transkonfiguraci, výhodně v $\omega-6$, $\omega-9$ a $\omega-11$ poloze, v závislosti na jejich délce. Výhodně je R_1/R_2 skupina odvozena od mastné kyseliny, které obsahuje C_9 až C_{17} nasycený nebo n:9 mononenasycený alkyl.
- 30 Nasycená nebo nenasyčená mastná kyselina nebo R_1/R_2 mohou popřípadě být substituovány až pěti podobnými nebo odlišnými substituenty nezávisle zvolenými ze souboru zahrnujícího skupiny jako jsou hydroxy, C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkoxy, C_1-C_6 alkoxy, C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkanoyl, amino, halogen, kyano, azido, oxo, merkaptó, nitro a podobně.
- 35 Nejvýhodnější sloučeniny obecného vzorce I jsou ty sloučeniny, ve kterých R_1 je $-C(O)CH(CH_3)_2NH_2$ nebo $-C(O)CH(CH(CH_3)CH_2CH_3)NH_2$ a R_2 je $-C(O)C_9-C_{17}$ alkyl.

- 40 Výraz „nižší alkyl“, tak, jak je zde používán, znamená alkylový radikál s přímým nebo rozvětveným řetězcem, obsahující do 1 do 7 uhlíkových atomů, který může být představován, aniž by tím byl omezen, methylem, ethylem, n-propylem, izo-propylem, n-butylem, izo-butylem, sek-butylem, terc-butylem, n-pentylem, 1-methylbutylem, 2,2-dimethylbutylem, 2-methylpentylem, 2,2-dimethylpropylem, n-hexylem a podobně.

- 45 Výraz „N-chránicí skupina“ nebo „N-chráněný“, tak, jak je zde používán, znamená ty skupiny, jejichž cílem je chránit N-konec aminokyseliny nebo peptidu nebo chránit aminoskupinu proti nežádoucí reakci v průběhu procedury syntézy. Běžně používané N-ochranné skupiny jsou popsány v Greene, „Protective groups in Organic Synthesis“ (John Wiley & Sons, New York, 1981), která je zde zahrnuta jako reference. N-ochranné skupiny zahrnují acylové skupiny jako je formyl, acetyl, propionyl, pivaloyl, terc-butylacetyl, 2-chloracetyl, 2-bromacetyl, trifluoracetyl, trichloracetyl, ftalyl, o-nitrofenoxiacetyl, α -chlorbutyryl, benzoyl, 4-chlor-benzoyl, 4-brom-benzoyl, 4-nitrobenzoyl a podobně; sulfonové skupiny jako je benzensulfonyl, p-toluensulfonyl a podobně; karbaminan vytvářející skupiny jako je benzyloxykarbonyl, p-chlorbenzyloxykarbonyl, p-methoxybenzyloxykarbonyl, p-nitrobenzyloxykarbonyl, 2-nitrobenzyloxykarbonyl, p-brombenzyloxykarbonyl, 3,4-dimethoxybenzyloxykarbonyl, 4-methoxybenzyloxykarbonyl, 2-nitro-4,5-dimethoxybenzyloxykarbonyl, 3,4,5-trimethoxybenzyloxykarbonyl, terc.butyloxy-
- 55

karbonyl, diizopropylmethoxykarbonyl, izopropoxykarbonyl, ethoxykarbonyl, methoxykarbonyl, allyloxykarbonyl, 2,2,2-trichlorethoxykarbonyl, fenoxycarbonyl, 4-nitrofenoxycarbonyl, fluorenyl-9-methoxykarbonyl, cyklopentyloxykarbonyl, adamantyloxykarbonyl, cyklohexyloxykarbonyl, fenylthiokarbonyl a podobně; alkylové skupiny jako je benzyl, trifenylmethyl, benzyloxymethyl a podobně. Výhodné N-ochranné skupiny zahrnují formyl, acetyl, benzoyl, pivaloyl, *terc.*-butylacetyl, fenylsulfonyl, benzyl, *terc.*-butoxykarbonyl (BOC) a benzyl-oxykarbonyl (Cbz).

Výraz „aktivovaný esterový derivát“, tak, jak je zde používán, znamená halogenidy kyselin jako jsou chloridy kyseliny a aktivované estery zahrnující, ale ne tím omezené, anhydridy odvozené od kyseliny mravenčí a kyseliny octové, anhydridy odvozené od alkoxykarbonylhalidů jako je izobutyloxykarbonylchlorid a podobně, estery odvozené do N-hydroxysukcinimidu, estery odvozené od N-hydroxyftalimidu, estery odvozené od N-hydroxybenzotriazolu, estery odvozené od N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboxamidu, estery odvozené od 2,4,5-trichlorfenylu a podobně.

Výhodné sloučeniny obecného vzorce I zahrnují:

(R)-9-[2-(butyryloxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-(4-acetylbutyryloxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-(hexanoyloxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(oktanoyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(dekanoyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(dodekanoyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(tetradekanoyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(hexadekanoyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(oktadekanoyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-(dokosanoyloxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-((9-tetradecenoyl)oxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-((9-hexadecenoyl)oxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-((6-oktadecenoyl)oxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-((9-oktadecenoyl)oxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-((11-eikosanoyl)oxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-((13-dokosenoyl)oxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]guanin,
 (R)-2-amino-9-[2-(butyryloxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[2-(4-acetylbutyryloxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[2-(hexanoyloxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(oktanoyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(dekanoyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(dodekanoyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(tetradekanoyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(hexadekanoyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(oktadekanoyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(eikosanoyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[2-(eikosanoyloxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[2-(dokosanoyloxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-((9-tetradecenoyl)oxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[2-((9-hexadecenoyl)oxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-((6-oktadecenoyl)oxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-((9-oktadecenoyl)oxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[2-((11-eikosanoyl)oxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]purin, nebo
 (R)-2-amino-9-[2-((13-dokosanoyl)oxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]purin,

a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

Další výhodné sloučeniny zahrnují:

- 5 (R)-9-[2-(butyryloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
(R)-9-[2-(4-acetylbutyryloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
(R)-9-[2-(hexanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
(R)-9-[2-(oktanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
(R)-9-[2-(dekanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
10 (R)-9-[2-(dodekanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
(R)-9-[2-(tetradekanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
(R)-9-[2-(hexadekanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
(R)-9-[2-(oktadekanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
(R)-9-[2-(eikosanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
15 (R)-9-[2-(eikosanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
(R)-9-[2-(dokosanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
(R)-9-[2-((9-tetradecenoyl)oxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
(R)-9-[2-((6-oktadecenoyl)oxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
(R)-9-[2-((9-oktadecenoyl)oxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
20 (R)-9-[2-((11-eikosanoyl)oxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
(R)-9-[2-((13-dokosenoyl)oxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
(R)-2-amino-9-[2-(butyryloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
(R)-2-amino-9-[2-(4-acetylbutyryloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
(R)-2-amino-9-[2-(hexanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
25 (R)-2-amino-9-[2-(oktanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
(R)-2-amino-9-[2-(dekanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
(R)-2-amino-9-[2-(dodekanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
(R)-2-amino-9-[2-(tetradekanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
(R)-2-amino-9-[2-(hexadekanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
30 (R)-2-amino-9-[2-(oktadekanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
(R)-2-amino-9-[2-(eikosanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
(R)-2-amino-9-[2-(dokosanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
(R)-2-amino-9-[2-((9-tetradecenoyl)oxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
(R)-2-amino-9-[2-((6-oktadecenoyl)oxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
35 (R)-2-amino-9-[2-((9-oktadecenoyl)oxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
(R)-2-amino-9-[2-((11-eikosenoyl)-oxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
(R)-2-amino-9-[2-((13-dokosenoyl)-oxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]purin,

a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

40

Další výhodné sloučeniny obecného vzorce I zahrnují:

- (R)-9-[4-(butyryloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
(R)-9-[4-(4-acetylbutyryloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
45 (R)-9-[4-(hexanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
(R)-9-[4-(oktanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
(R)-9-[4-(dekanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
(R)-9-[4-(dodekanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
(R)-9-[4-(tetradekanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
50 (R)-9-[4-(hexadekanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
(R)-9-[4-(oktadekanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
(R)-9-[4-(eikosanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,

- (R)-9-[4-(dodekanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-((9-tetradecenoyl)oxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-((6-oktadecenoyl)oxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-((9-oktadecenoyl)oxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
 5 (R)-9-[4-((11-eikosenoyl)oxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-((13-dokosenoyl)oxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-2-amino-9-[4-(butyryloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(acetylbutyryloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(hexanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 10 (R)-2-amino-9-[4-(oktanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(dekanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(dodekanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(tetradekanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(hexadekanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 15 (R)-2-amino-9-[4-(oktadekanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(eikosanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-(dokosanoyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-((9-tetradecenoyl)oxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-((6-oktadecenoyl)oxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 20 (R)-2-amino-9-[4-((9-oktadecenoyl)oxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-((11-eikosenoyl)oxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[2-((13-dokosenoyl)oxymethyl)-2-(L-valyloxy)butyl]purin, nebo

jejich farmaceuticky přijatelné soli.

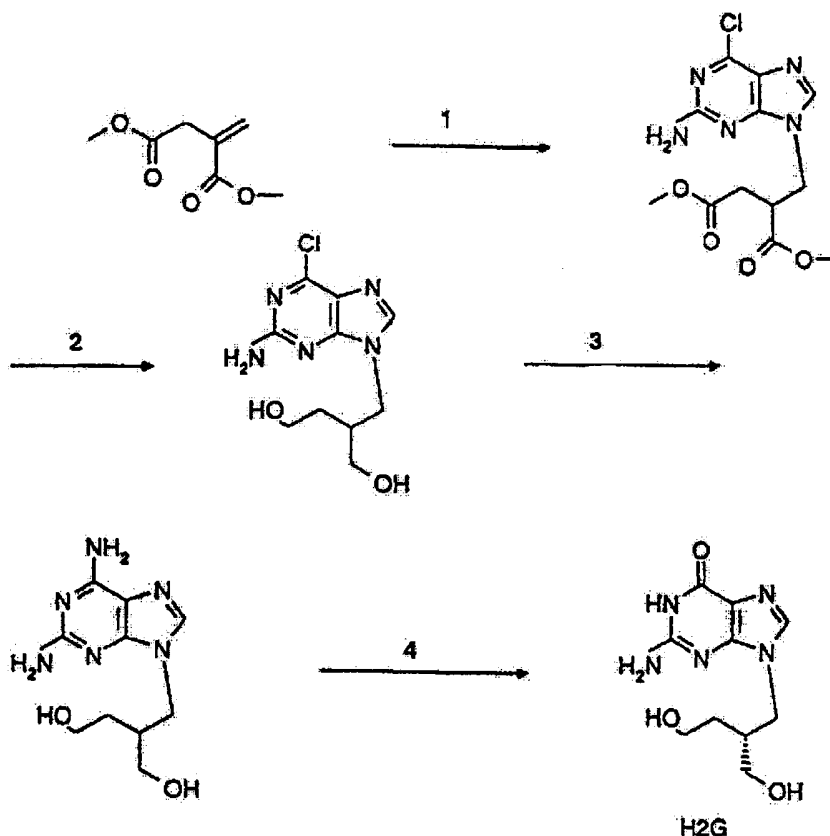
- 25 Sloučeniny obecného vzorce I mohou vytvořit soli, které představují další předmět vynálezu. Vhodné farmaceuticky přijatelné soli sloučenin obecného vzorce I zahrnují soli organických kyselin, obzvláště karboxylových kyselin, zahrnují, aniž by tím byly omezeny, acetát, trifluoracetát, mléčnan, glukonát, citronan, vínán, maleinan, malonan, pantothenan, isethionan, adipan,
 30 alginan, aspartan, benzoan, máselnan, diglukonát, cyklopentanan, glukohexitan, glycerofosfát, šťávelan, heptanoan, hexanoan, fumaran, nikotinan, palmoát, pektinan, 3-fenylpropionan, pikran, pivaloan, propionan, vínán, laktobionan, pivolát, ester kyselina kafrové, undekanoan a jantaran, soli organických sulfonových kyselin jako je methansulfonan, ethansulfonan, 2-hydroxyethansulfonan, kafrsulfonan, 2-napthalensulfonan, benzensulfonan, p-chlorbenzen-sulfonan a p-toluensulfonan; a soli anorganických kyselin jako je hydrochlorid, hydrobromid,
 35 hydrojodid, síran, kyselý síran, hemisulfát, thiociranát, persíran a soli kyseliny fosforečné a sírové. Výhodné jsou soli kyseliny chlorovodíkové.

- 40 Sloučeniny obecného vzorce I mohou být izolovány ve formě hydrátu. Sloučeniny podle vynálezu mohou být izolovány v krystalické formě, výhodně jako homogenní krystaly a proto se další předmět vynálezu týká sloučeniny obecného vzorce I, která se nachází v zásadě čisté krystalické formě, zahrnující více než 70 %, výhodně více než 90 % homogenního krystalického materiálu, například více než 95 % homogenního krystalického materiálu.

- 45 Sloučeniny podle vynálezu jsou obzvláště vhodné k orálnímu podávání, ale mohou být také podávány rektálně, vaginálně, nasálně, topicky, transdermálně nebo parenterálně, například intramuskulárně, intravenózně nebo epidurálně. Sloučeniny mohou být podávány samotné, například v kapsli, ale obecně jsou podávány spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem. Vynález se také týká způsobu přípravy farmaceutických kompozic, obsahujících
 50 sloučeninu obecného vzorce I nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl společně s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo vehikulem.

- Orální přípravky jsou výhodně připraveny v jednotkové dávkové formě jako jsou kapsle nebo tablety, používající konvenční nosiče nebo vazebné přísady jako je stearan hořečnatý, křída, škrob, laktóza, vosk, guma nebo želatina. Mohou být použity liposomy nebo syntetické nebo přírodní polymery jako je HPMC nebo PVP, aby byl vytvořen přípravek s prodlouženým uvolňováním. Alternativně přípravek může být podáván jako nosní nebo oční kapky, sirup, gel nebo krém, zahrnující roztok, suspensi, emulsi olej ve vodě nebo voda v oleji, a to v konvenčních vehikulech jako je voda, fyziologický roztok, ethanol, rostlinný olej nebo glycerin, popřípadě s ochucovacím a/nebo konzervačním a/nebo emulsifikačním činidlem.
- Sloučeniny podle vynálezu mohou být podávány v denní dávce obecně v rozmezí 0,1 až 200 mg/kg/den, výhodně 0,5 až 100 mg/kg/den, výhodněji 10 až 50 mg/kg/den, například 10 až 25 mg/kg/den. Typická dávka pro normální dospělou osobu bude zhruba 50 až 500 mg, například 30 mg, jednou nebo dvakrát za den pro herpes, infekci a 2 až 10 násobek této dávky pro infekci HIV.
- Jak je obvyklé při antivirálním léčení, sloučeniny podle vynálezu mohou být podávány v kombinaci s jinými antivirálními činidly, jako je acyklovir, velcyklovir, penciclovir, famciclovir, ganciclovir a jejich prekurzorů, cidofovir, foscarnet a podobně pro indikaci herpes a AZT, ddI, ddC, d4T, 3TC, foscarnet, ritonavir, indinavir, saquinavir, delaviridin, Vertex VX 478, Agouron AG1343 a podobně pro retrovirální indikace.

Sloučeniny podle vynálezu mohou být připraveny od začátku nebo esterifikací výchozí H2G sloučeniny, která je připravena například syntézou popsanou v Evropském Patentu EP 343 133, který je zahrnut jako reference. Typické reakční schéma pro přípravu H2G je uvedeno dále:



Kondenzace v kroku 1 je typicky prováděna s bazickým katalyzátorem, jako je NaOH nebo Na_2CO_3 , v rozpouštědle jako je DMF. Krok 2 zahrnuje redukci, která může být prováděna LiBH_4 /tetrahydrofuranem v rozpouštědle jako je *tert.*-BuOH. Substituce chlóru v kroku 3 amino

skupinou může být prováděna pod tlakem s amoniem. Krok 4 používá adenosin deaminázu, která může být výhodně imobilizována na pevném nosiči. Ochlazování reakční směsi dovoluje, aby nezreagovaný izomerický prekursor zůstal v roztoku, čímž se zvýší čistota.

- 5 Výchozí materiály pro sloučeniny podle vynálezu ve kterých R_3 je atom vodíku mohou být připraveny jak je popsáno v Evropském patentu EP 186 640, jehož obsah je zahrnut jako reference. Tyto výchozí materiály mohou být acylovány jak je dále popsáno pro H2G, popřípadě po ochraně purinové 2-amino skupiny konvenční N-ochrannou skupinou, jak je definováno výše, obzvláště BOC (*terc.*-BuO-CO-), Z (BnO-CO-) nebo Ph_3C- .

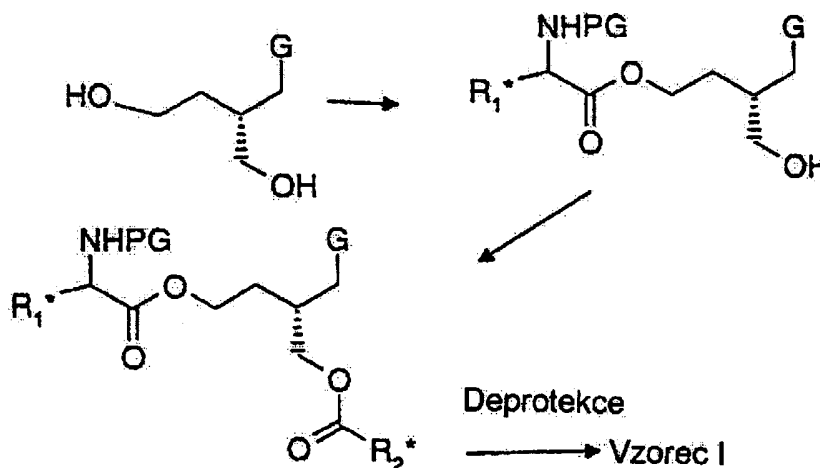
10

Sloučeniny podle vynálezu mohou být připraveny H2G jak je popsáno níže ve Schématech A a B.

A. Přímý způsob acylace

15

Schéma A



- Schéma A ukazuje přípravu sloučeniny ve které R_1 je odvozen od aminokyseliny a R_2 je odvozen od mastné kyseliny, ale opačné schéma je použitelné na sloučeniny, ve kterých R_1 je odvozen od mastné kyseliny a R_2 je odvozen od esteru aminokyseliny. V konkrétní variantě znázorněné ve schématu A uvedeném výše je g guanin nebo 6-deoxyguanin. PG je případná ochranná skupina nebo atom vodíku, R_1^* je valinový nebo izoleucinový postranní řetězec a R_2^* je řetězec mastné kyseliny. Jako výchozí materiál je výše znázorněn H2G, ale může jím být přirozeně H2G chráněný v poloze R_3 nebo 2 purinový konvenční N-ochrannou skupinou (není znázorněna). H2G (derivát) reaguje v prvním kroku s aktivovaným derivátem R_1 α -aminokyseliny, jak je dále popsáno níže, v rozpouštědle jako je dimethylformamid nebo pyridin, což dá monoacylovaný produkt. R_1 α -aminokyselina může být vhodně N-chráněna pomocí N-BOC nebo N-CBz a podobně. Za řízených podmínek může být první acylace provedena tak, aby převážně nastávala v postranním řetězci 4-hydroxy skupiny na postranním řetězci H2G. Tyto řízené podmínky mohou být dosaženy například ovládáním koncentrace reagentů nebo rychlosti přidávání, obzvláště acylačního činidla, snížením teploty nebo volbou rozpouštědla. Reakce může být následována TLC pro monitorování řízených podmínek.

- 35 Po čištění jsou R_1 monoacylované sloučeniny dále acylovány na postranním řetězci 2- CH_2OH skupiny vhodným derivátem aktivované mastné kyseliny, což dá diacylované produkty použitím podobných procedur jako v prvním esterifikačním kroku. Diesterové produkty jsou následně podrobeny konvenčnímu deprotečnímu působení například trifluoroctovou kyselinou, HCl(aq)/-

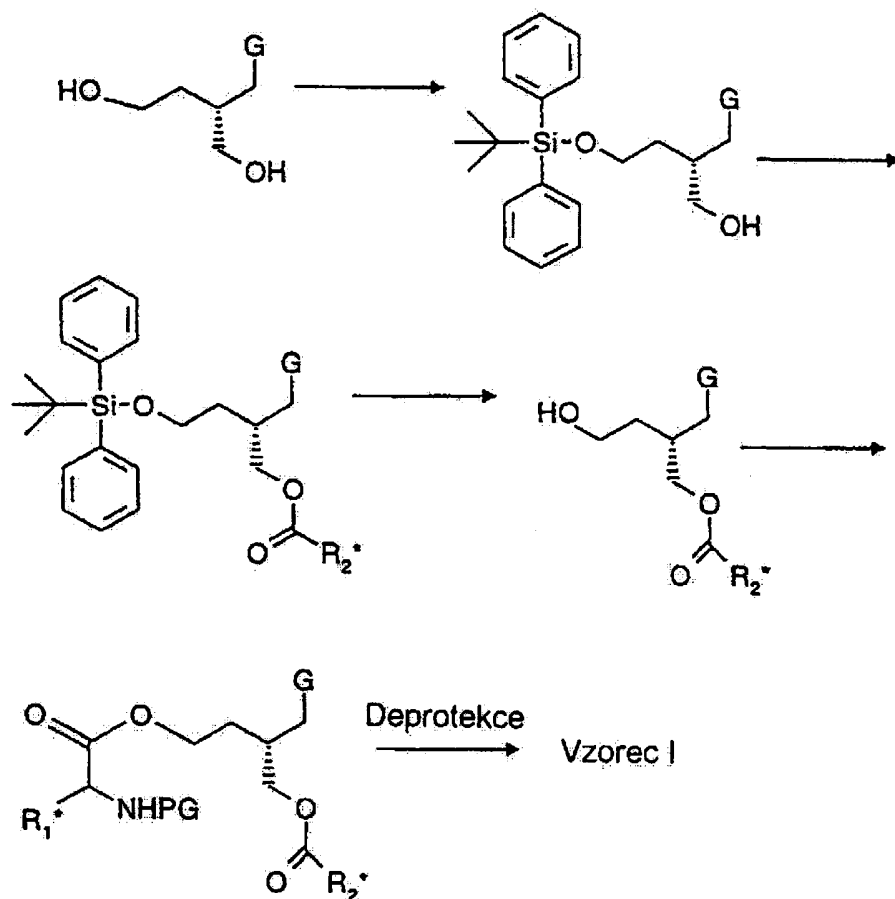
dioxanem nebo hydroxygenací v přítomnosti katalyzátoru, což dá požadovanou sloučeninu obecnému vzorci I. Sloučenina může být ve formě soli v závislosti na podmínkách deprotekce.

- 5 Aktivovaný R_1/R_2 derivát kyseliny, použitý v různých acylacích může zahrnovat například halid kyseliny, anhydrid kyseliny, aktivovaný ester kyseliny nebo kyselinu v přítomnosti vazebného reagentu, například dicyklohexylkarbodiimidu, kde „kyselina“ v každém z případů představuje odpovídající R_1/R_2 aminokyselinu nebo R_1/R_2 mastnou kyselinu. Reprezentativní aktivované
- 10 deriváty kyselin zahrnují chlorid kyseliny, smíšené anhydridy odvozené do kyseliny mravenčí a octové, anhydridy odvozené od alkoxykarbonyl halidů jako je izobutyloxykarbonyl-chlorid a podobně, estery odvozené od N-hydroxysukcin-amidu, estery odvozené od N-hydroxy-ftalimidu, estery odvozené od N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboxamidu, estery odvozené od 2,4,5-trichlorfenolu a podobně.

B. Reakce s ochrannou 4-hydroxy skupiny postranního řetězce:

15

Schéma B



ve kterém g, PG, R₁^{*} a R₂^{*} jsou jako bylo popsáno pro schéma A.

20

- Schéma B bylo exemplifikováno s odvoláním na přípravu sloučeniny, ve které R₁ je odvozen z aminokyseliny a R₂ je odvozeno z esteru mastné kyseliny, ale opačné schéma je aplikovatelné na sloučeniny, ve kterých R₂ je odvozen z aminokyseliny a R₁ je odvozen z mastné kyseliny. Toto schéma spočívá v místně selektivní ochraně 4-hydroxy skupiny postranního řetězce H₂G objemnou skupinou. Ve schématu B uvedeném výše je skupina znázorněna jako terc.butyl-difenylsilyl, ale mohou být použity jiné místně selektivní ochranné skupiny jako je trityl, 9-(9-fenyl)xanthenyl, 1,1-bis(4-methylfenyl)-1'-pyrenylmethyl. Výsledný produkt je acylován
- 25

v 2-hydroxymethyl skupině postranního řetězce použitím podobných reagentů a způsobů, jako to bylo popsáno pro schéma A uvedené výše, ale ve kterém aktivovaný derivát kyseliny je R_2 mastná kyselina, například chlorid kyseliny myristové, stearové, olejové elaidové a podobně. Tedy monoacylované sloučeniny jsou podrobeny odpovídajícímu odstranění ochranné skupiny, která odstraní 4-hydroxy ochrannou skupinu postranního řetězce, což může být provedeno vysoce selektivně s takovými reagenty jako jsou v závislosti na místně selektivní ochranné skupině HF/pyridin a podobně a manipulací s reakčními podmínkami, jako je koncentrace reagentů, rychlost jejich přidávání, teplota a rozpouštědlo apod., jak bylo řečeno výše. Volná 4-hydroxy skupina postranního řetězce je acylována aktivovanou α -aminokyselinou podobným způsobem, jak bylo popsáno v Schématu A, uvedeném výše.

Další techniky pro vytvoření esteru aminokyseliny R_1/R_2 , například v Schématech A, B, C nebo D, uvedených v této přihlášce, zahrnuje způsob užívající 2-oxa-4-aza-cykloalkan-1,3-dion, popsáný v mezinárodní patentové přihlášce č. WO 94/29311.

Další techniky pro vytvoření esteru mastné kyseliny R_1/R_2 , například v Schématech A, B, C nebo D, uvedených v této přihlášce, zahrnují enzymatickou cestu popsanou v Preparative Biotransformations 1,11,8 (Ed S M Roberts, J Wiley a Son, NY. 1995) s lipázou jako je SP 435 imobilizovaná *Candida antarctica* (Nova Nordisk), prasečí pankreatická lipáza nebo lipáza *Candida rugosa*. Enzymatická acylace je obzvláště vhodná pokud je požadováno vyloučit N-ochranu a odstraňování ochranné skupiny na dalších acylovaných skupinách nebo purin 2-aminu.

Alternativní způsob přípravy sloučeniny obecného vzorce R_3 je atom vodíku spočívá v 6-aktivaci odpovídající guaninové sloučeniny obecného vzorce I (ve kterém aminokyselinový ester skupiny R_1/R_2 je popřípadě chráněný konvenční N-ochrannou skupinou, jako je BOC) s aktivací skupinou jako je atom halogenu. Aktivovaný 6-purin je tedy následně redukován na purin, například pomocí paládiového katalyzátoru a zbavený ochrany, aby se získal požadovaný 6-deoxy H2G diester.

Další předmět vynálezu se proto týká způsobu přípravy sloučenin obecného vzorce I zahrnující

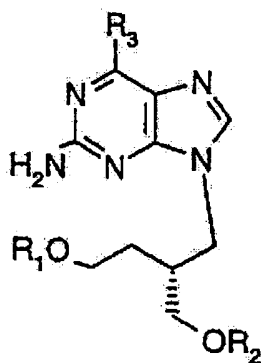
- a) případnou ochranu purinových poloh 2 a/nebo 6 sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém R_1 a R_2 jsou každý atom vodíku, N-ochrannou skupinou;
- b) místně selektivní acylace sloučeniny obecného vzorce I v 4-hydroxy skupině postranního řetězce buď
 - i) popřípadě N-chráněnou valinovou nebo izoleucinovou skupinou, nebo
 - ii) popřípadě substituovaným, nasyceným nebo mononenasyceným $C_3-C_{21}COOH$ derivátem, nebo
 - iii) místně selektivní ochrannou skupinou;
- c) acylace 2-hydroxymethyl skupiny v postranním řetězci
 - i) popřípadě N-chráněnou valinovou nebo izoleucinovou skupinou, nebo
 - ii) popřípadě substituovaným, nasyceným nebo mononenasyceným $C_3-C_{21}COOH$ derivátem;

- d) nahrazení místně selektivní ochranné skupiny v R_1 , pokud je přítomna,
- i) popřípadě N-chráněnou valinovou nebo izoleucinovou skupinou; nebo
- 5 ii) popřípadě substituovaným, nasyceným nebo mononenasyceným $C_3-C_{21}COOH$ derivátem; a
- e) zbavení výsledné sloučeniny ochranných skupin v případě potřeby.
- 10 Schéma A a B uvedená výše využívají selektivní acylace na přidání esterů aminokyseliny a mastné kyseliny po krocích. Alternativní způsob přípravy sloučeniny obecného vzorce I vychází z diacylovaného H2G derivátu, ve kterém jsou obě acylové skupiny stejné a používá selektivní odstranění jedné acylové skupiny, čímž se získá monoacylový meziprodukt, který je
- 15 uvedených výše.

V souladu s tím další předmět vynálezu se týká způsobu přípravy sloučeniny obecného vzorce I, jak byla definována výše, přičemž způsob zahrnuje

- 20 A) monodeacylaci diacylované sloučeniny obecného vzorce I, ve které R_1 a R_2 jsou oba valylový nebo izoleucylový ester (který je popřípadě N-chráněný) nebo jsou R_1 a R_2 oba $-C(=O)C_3-C_{21}$ nasycený nebo mononenasycený popřípadě substituovaný alkyl; a
- 25 B) acylace takto uvolněné 4-hydroxy skupiny postranního řetězce nebo 2-hydroxymethyl skupiny postranního řetězce odpovídajícím valylem, izoleucylem nebo skupinou $-C(=O)C_3-C_{21}$ nasycený nebo mononenasycený popřípadě substituovaný alkyl; a
- C) odstranění ochranných skupin v případě potřeby.
- 30 Tento alternativní způsob má výhodu, že příprava diacylovaného H2G derivátu je snadná a vyžaduje malé nebo žádné kroky čištění. Selektivní odstranění pouze jedné acylové skupiny diacylovaného H2G derivátu může být dosaženo manipulací s reakčními podmínkami, obzvláště teplotou, rychlostí přidávání a volbou báze.

- 35 Sloučeniny, vhodné pro tento alternativní způsob syntézy jsou tedy obecného vzorce:



ve kterém R_1 a R_2 jsou valyl nebo izoleucyl (které jsou popřípadě N-chráněné) nebo $-C(=O)C_3-C_{21}$ nasycený nebo mononenasycený popřípadě substituovaný alkyl; a R_3 je OH nebo H.

40

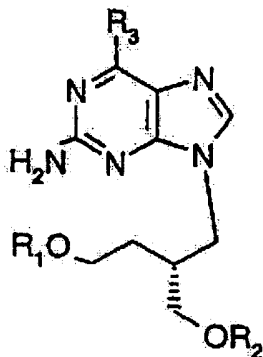
Pro usnadnění syntézy na této alternativní cestě je výhodné, že R_1 a R_2 jsou oba původně identické a jsou nejvýhodněji stejný ester aminokyseliny. Takový diaminokyselinový ester je obecně N-chráněný v průběhu jeho přípravy a může být použit přímo v tomto stavu

v selektivním deacylačním kroku. Alternativně takový N-chráněný diaminoacylovaný H2G derivát může být zbaven ochranných skupin a popřípadě znovu opatřený chráničemi skupinami jak je popsáno dále. Nechráněný diaminoacylový H2G derivát tedy zahrnuje jednu z následujících sloučenin:

- (R)-9-[2-(L-izoleucyloxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-(L-valyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin.
 (R)-2-amino-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(L-izoleucyloxymethyl)butyl]purin, a
 (R)-2-amino-9-[4-(L-valyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin.

Tyto nechráněné H2G diacylované deriváty mohou být přímo vystaveny selektivní deacylaci jedné z acylových skupin (typicky acyl v poloze 4 postranního řetězce) následované enzymatickou acylací uvolněné 4-hydroxy jak bylo popsáno výše. Alternativně může být nechráněný H2G diacylovaný derivát znovu opatřen chráničemi skupinami a potom vytaven selektivní deacylaci, následované konvenční acylací estery mastných kyselin, jak je popsáno ve Schématech A a B. Výhodně je takový krok opětne ochrany proveden s odlišnou N-ochrannou skupinou, která má vhodné vlastnosti pro následnou acylaci. Například je výhodné použít lipofilní N-ochrannou skupinu, jako je Fmoc, pokud je připravován diaminokyselinový H2G derivát, neboť lipofilní povaha ochranné skupiny napomáhá separaci acylovaných produktů. Na druhé straně je lipofilní povaha Fmoc málo užitečná, pokud se provádí acylace mastnou kyselinou a tedy je výhodné opatřit diacylovaný H2G alternativní N-ochrannou skupinou jako je BOC.

Je také zřejmé, že příprava sloučeniny obecného vzorce I může začít novým monoacylovaným meziproduktem kroku b i), ii) nebo iii) ve výše definovaném prvním způsobu podle předmětu vynálezu. Tyto sloučeniny jsou tedy obecného vzorce:



ve kterém jeden z R_1 a R_2 je

- i) $-C(O)CH(CH(CH_3)_2)NH_2$ nebo $-C(O)CH(CH(CH_3)CH_2CH_3)NH_2$
 ii) $-C(=O)C_3-C_{21}$ nasycený nebo mononenasycený popřípadě substituovaný alkyl, nebo
 iii) místně selektivní ochranná skupina;

druhý z R_1 a R_2 je atom vodíku;

a R_3 je OH nebo H;

Použitelné sloučeniny tedy zahrnují:

- (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(*terc.*-butyldifenylsilyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(trityloxy)butyl]guanin,
 5 (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(9-(9-fenyl)xanthyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(1,1-bis(4-methylfenyl)-1'-pyrenylmethyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(dekanoyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(dodekanoyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(tetradekanoyloxy)butyl]guanin,
 10 (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(hexadekanoyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(oktadekanoyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(eikosanoyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(dokosanoyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-hydroxy-2-(dekanoyloxymethyl)butyl]guanin,
 15 (R)-9-[4-hydroxy-2-(dodekanoyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-hydroxy-2-(tetradekanoyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-hydroxy-2-(hexadekanoyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-hydroxy-2-(oktadekanoyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-hydroxy-2-(eikosanoyloxymethyl)butyl]guanin,
 20 (R)-9-[4-hydroxy-2-(dokosanoyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(L-izoleucyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-hydroxy-2-(L-izoleucyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-hydroxy-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin,
 25 (R)-2-amino-9-[2-hydroxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[2-hydroxymethyl-4-(L-izoleucyloxy)butyl]purin,
 (R)-2-amino-9-[4-hydroxy-2-(L-izoleucyloxymethyl)butyl]purin, a
 (R)-2-amino-9-[4-hydroxy-2-(L-valyloxymethyl)butyl]purin.
- 30 Meziprodukty s místně selektivně chráněnou 4-hydroxy bočního řetězce z kroku c) výše opsaného prvního způsobu podle předmětu vynálezu jsou také nové sloučeniny.

Použitelné sloučeniny tedy zahrnují:

- 35 (R)-9-[2-dekanoyloxymethyl-4-(*terc.*-butyldifenylsilyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-dodekanoyloxymethyl-4-(*terc.*-butyldifenylsilyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-tetradekanoyloxymethyl-4-(*terc.*-butyldifenylsilyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-hexadekanoyloxymethyl-4-(*terc.*-butyldifenylsilyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-oktadekanoyloxymethyl-4-(*terc.*-butyldifenylsilyl)butyl]guanin,
 40 (R)-9-[2-eikosanoyloxymethyl-4-(*terc.*-butyldifenylsilyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-dokosanoyloxymethyl-4-(*terc.*-butyldifenylsilyl)butyl]guanin,

Alternativní způsob přípravy sloučenin podle vynálezu obecného vzorce I, ve kterém R₃ je -OH je znázorněn ve Schématu C.

45

S odvoláním na Schéma C, malonan 1 (R_4 a R_5 jsou nižší alkyl nebo benzyl a podobně) je alkylovaný reakcí s od zhruba 0,5 do zhruba 2,0 molárních ekvivalentů acetalu 2 (R_6 a R_7 jsou nižší alkyl nebo benzyl a podobně nebo R_6 a R_7 spolu vytvářejí $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ nebo $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ nebo $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ a X_1 je štěpitelná skupina (například Cl, Br nebo J nebo sulfonát jako je methansulfonát, trifluormethansulfonát, p-toluensulfonát, benzensulfonát a podobně)) v přítomnosti od zhruba 0,5 do zhruba 2,0 molárních ekvivalentů báze (například *tert.*-butoxid draselný nebo ethoxid sodný nebo NaH nebo KH a podobně) v inertním rozpouštědle (například DMF nebo THF nebo dioxan nebo dioxolan nebo N-methylpyrrolidon a podobně) při teplotě od zhruba -40°C do zhruba 190°C , což dá alkylový malonan 3.

Redukce 3 od zhruba 0,5 do zhruba 4,0 molárních ekvivalentů esteru alkohol redukujícím činidlem (například LiBH_4 nebo $\text{Ca}(\text{BH}_4)_2$ nebo NaBH_4 nebo LiAlH_4 a podobně) v inertním rozpouštědle (například THF nebo methyl *tert.*-butyl ether nebo *tert.*-BuOH a podobně) při teplotě od zhruba -20°C do zhruba 100°C dává diol 4. Enzymatická esterifikace 4 reakcí s od zhruba 1,0 do zhruba 20,0 molárních ekvivalentů vinyl esteru 5 (R_8 je C_3 – C_{21} nasycený nebo nenasyčený popřípadě substituovaný alkyl) v přítomnosti lipázy (například Lipase PS-30 nebo Lipase PPL nebo Lipase CCL a podobně) dává požadovaný stereoizomer esteru 6. Tato reakce může být prováděna bez rozpouštědla nebo v přítomnosti inertního rozpouštědla (například methyl *tert.*-butyl ether nebo toluen nebo hexan a podobně). Reakce je prováděna při teplotě od zhruba -20°C do zhruba 80°C .

Alkoholový substituent 6 je konvertován na štěpitelnou skupinu (například halogen nebo sulfonát) reakcí s halogenačním činidlem (například NBS/P (Ph)₃ nebo NCS/P (Ph)₃ nebo POC_{13} nebo NCS/P(Ph)₃/NaI v acetonu a podobně) v inertním rozpouštědle (například methylenchlorid nebo toluen nebo ethylacetát a podobně) nebo reakcí s od zhruba 0,8 molárních ekvivalentů do zhruba 2,0 molárních ekvivalentů sulfonylhalidu (například benzensulfonylchlorid, toluensulfonylchlorid nebo methansulfonylchlorid a podobně) v přítomnosti od zhruba 1,0 do zhruba 4,0 molárních ekvivalentů báze (například triethylamin nebo uhličitán draselný nebo pyridin nebo dimethylaminopyridin nebo ethyldiizopropylamin a podobně) v inertním rozpouštědle (například methylenchlorid nebo toluen nebo ethylacetát nebo pyridin nebo methyl *tert.*-butyl ether a podobně) při teplotě od zhruba -25°C do zhruba 100°C což dá ester 7. (X_2 je halogen nebo sulfonátová štěpitelná skupina).

Reakce produktu 7 s od zhruba 0,9 do zhruba 2,0 molárních ekvivalentů 2-amino-4-chlorpurinu 8 v přítomnosti od zhruba 1,0 do zhruba 6,0 molárních ekvivalentů báze (například uhličitán draselný nebo NaH nebo KH nebo NaOH nebo KOH nebo lithium diizopropylamid a podobně) v inertním rozpouštědle (například DMF nebo THF) nebo acetonitril nebo N-methylpyrrolidon nebo ethanol a podobně) při teplotě od zhruba -25°C do zhruba 140°C dává substituovaný purin 9.

Alternativně Mitsunobu navázání (například $\text{P}(\text{Ph})_3$ /diethyl azidokarboxylát) alkohol 6 na 2-amino-4-chlorpurin 8 dává 9.

Reakce produktu 9 s od zhruba 2,0 do zhruba 20 molárních ekvivalentů alkoholu R_9OH (R_9 je alkoholová ochranná skupina jako je benzyl a podobně) v přítomnosti od zhruba 1,0 do zhruba 6,0 molárních ekvivalentů báze (například *tert.*-butoxid draselný nebo uhličitán draselný nebo NaH nebo KH nebo lithium diizopropylamid a podobně) v inertním rozpouštědle (například THF nebo DMF a podobně) při teplotě od zhruba -25°C do zhruba 150°C dává alkohol 10.

Odstranění alkoholové ochranné skupiny R_9 produktu 10 (například by katalytická hydrogenace v inertním rozpouštědle jako je ethanol nebo benzyl alkohol nebo methanol nebo THF a podobně v přítomnosti katalyzátoru hydrogenace jako je Pd/C nebo $\text{Pd}(\text{OH})_2$ a podobně) dává substituovaný guanin 11.

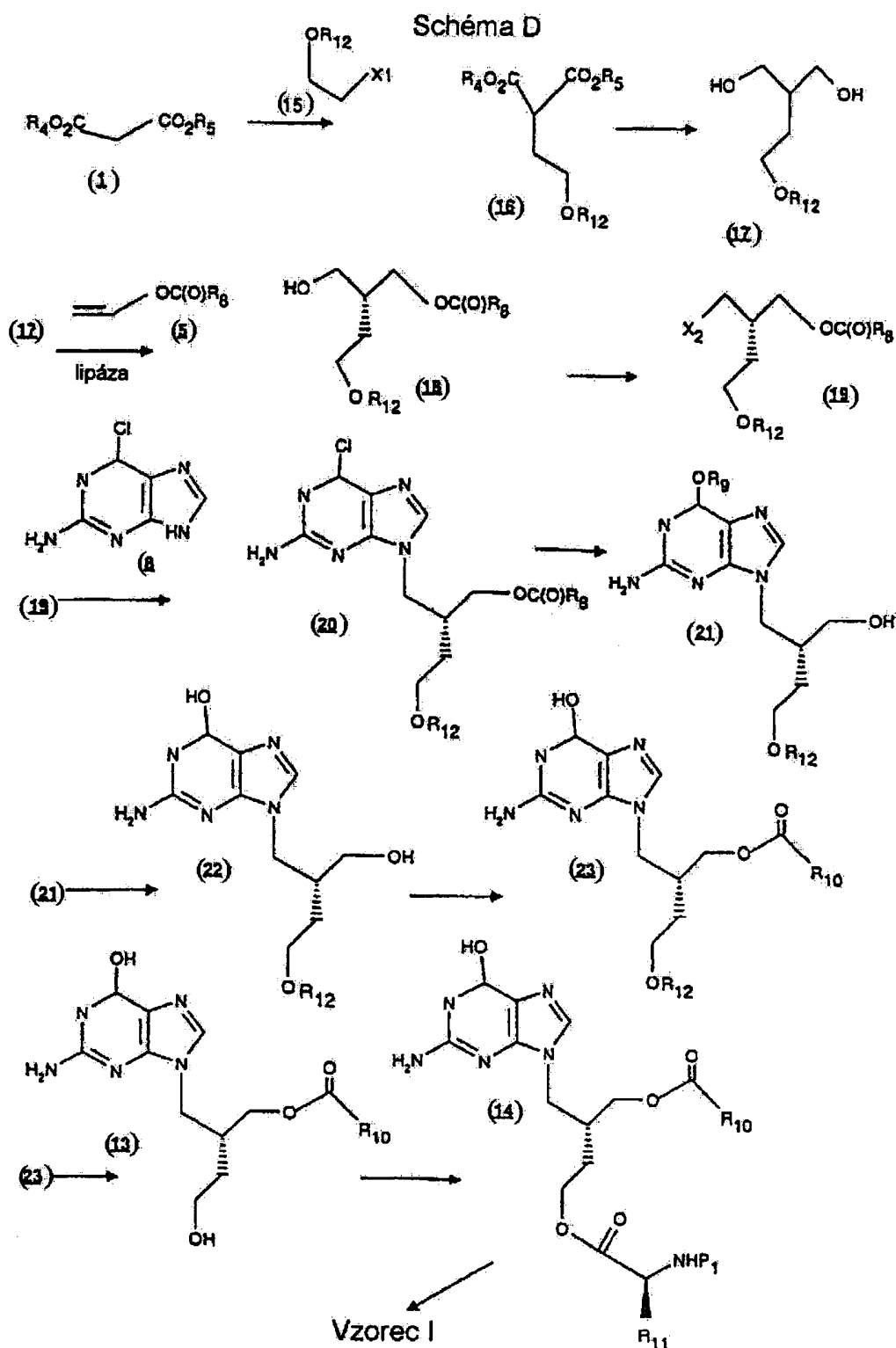
Esterifikace produktu 11 reakcí s a) od zhruba 0,8 do zhruba 2,0 molárních ekvivalentů $R_{10}COOH$ a vazebného činidla (například DCC/DMAP) a podobně v inertním rozpouštědle (například THF nebo DMF a podobně) nebo b) od zhruba 0,8 do zhruba 2,0 molárních ekvivalentů aktivovaného derivátu $R_{10}COOH$ (například chlorid kyseliny nebo N-hydroxy-sukcinimid ester nebo $R_{10}C(O)OC(O)R_{10}$ a podobně) v přítomnosti od zhruba 0 do zhruba 3,0 molárních ekvivalentů báze (například pyridin nebo triethylamin nebo ethyldiizopropylamin nebo DBU nebo uhličitán draselný na podobně) v inertním rozpouštědle například methylenchlorid nebo THF nebo pyridin nebo acetonitril nebo DMF a podobně) při teplotě od zhruba $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do zhruba $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ dává ester 12.

Acetylový substituent produktu 12 je zbavený ochrany a vzniklý aldehyd je redukován nejprve reakcí 12 s od zhruba 0,1 do zhruba 10,0 molárních ekvivalentů kyseliny (například trifluormethansulfonová kyselina nebo HCl nebo kyselina octová nebo kyselina sírová a podobně) v inertním rozpouštědle (například THF/ H_2O nebo methylenchlorid/ H_2O nebo ethylacetát/ H_2O nebo ethanol/ H_2O nebo methanol/ H_2O a podobně) při teplotě od zhruba $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do zhruba $0,1$ do zhruba 10,0 molárních ekvivalentů báze (například kyselý uhličitán sodný nebo uhličitán draselný nebo triethylamin nebo pyridin nebo KOH a podobně), dodatečně inertní rozpouštědlo (například THF a nebo methylenchlorid nebo ethylacetát nebo methyl terc.butyl ether nebo izopropanol a podobně) a od zhruba 0,3 do zhruba 5,0 molárních ekvivalentů aldehydového redukčního činidla (například borohydrid sodný nebo $RaNi/H_2$ a podobně) při teplotě od zhruba $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do zhruba $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, což dá alkohol 13.

Reakce produktu 13 s od zhruba 0,8 do zhruba 3,0 molárních ekvivalentů N-chráněné aminokyseliny $P_1NHCH(R_{11})COOH$ nebo jejího aktivovaného derivátu (P_1 je N-ochranná skupina a R_{11} je izopropyl nebo izobutyl) v inertním rozpouštědle (například THF nebo dioxan nebo dioxolan nebo DMF nebo methylenchlorid a podobně) při teplotě od zhruba 25°C do zhruba $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ dává alkohol 14. Odstranění N-ochranné skupiny produktu 14 dává sloučeninu podle vynálezu obecného vzorce I, ve kterém R_3 je $-OH$.

Alternativně sloučenina 13 může být ponechána reagovat se symetrickým anhydridem, odvozeným z $P_1NHCH(R_{11})COOH$ (i.e. $P_1NHCH(R_{11})C(O)-C(O)CH(R_{11})NHP_1$), což dá 1, ve kterém R_3 je OH .

Další alternativní způsob přípravy sloučeniny ve které R_3 je $-OH$, je znázorněn na Schématu D.



Malonan 1 (R_4 a R_5 jsou nižší alkyl nebo benzyl a podobně) je alkylovaný s od zhruba 0,5 do zhruba 2,0 molárních ekvivalentů etheru 15, ve kterém X_1 je štěpitelná skupina (například Cl, Br nebo J, nebo sulfonát jako je methan sulfonát, trifluormethansulfonát, p-toluensulfonát, benzen-sulfonát a podobně) a R_{+2} je $-\text{CH}(\text{Ph})_2$, $-\text{C}(\text{Ph})_3$ nebo $-\text{Si}(\text{terc.Bu})(\text{Me})_2$ a podobně (Ph = fenyl) v přítomnosti od zhruba 0,5 do zhruba 2,0 molárních ekvivalentů báze (například terc.butoxid draselný nebo ethoxid sodný nebo NaH nebo KH a podobně) v inertním rozpouštědle (například

DMF nebo THF nebo dioxan nebo dioxolan nebo N-methyl pyrrolidinon a podobně) při teplotě od zhruba -40°C do zhruba 190°C , což dá alkylovaný malonan 16.

Redukce produktu 16 od zhruba 0,5 do zhruba 4,0 molárních ekvivalentů esteru s alkohol
 5 redukujícím činidlem (například LiBH_4 nebo $\text{Ca}(\text{BH}_4)_2$ nebo NaBH_4 nebo LiAlH_4 a podobně) v inertním rozpouštědle (například THF nebo methyl terc.butyl ether nebo ethanol nebo terc.butanol a podobně) při teplotě od zhruba -20°C do zhruba 100°C dává diol 17. Enzymatická esterifikace 17 reakcí s od zhruba 1,0 do zhruba 20,0 molárních ekvivalentů vinyl
 10 esteru 5 (R_8 je $\text{C}_3\text{--C}_{21}$ nasycený nebo mononenasycený popřípadě substituovaný alkyl) v přítomnosti lipázy (například Lipase PS-30 nebo Lipase PPL nebo Lipase CCl a podobně) nebo fosfolipázy (například fosfolipáza D a podobně) dává požadovaný stereoisomer esteru 18. Reakce může být prováděna bez rozpouštědla, nebo v přítomnosti inertního rozpouštědla (například methyl terc.butyl nebo ether nebo toluen nebo hexan a podobně). Reakce je prováděna
 15 při teplotě od zhruba -20°C do zhruba 80°C .

Alkoholový substituent produktu 18 je konvertován na štěpitelnou skupinu (například halogen
 nebo sulfonát) reakcí s halogenačním činidlem (například $\text{NBS/P}(\text{Ph})_3$ nebo $\text{NCS/P}(\text{Ph})_3$ nebo POC_{13} nebo $\text{NCS/P}(\text{Ph})_3/\text{NaI}$ v acetonu a podobně) v inertním rozpouštědle (například methylen-
 20 chlorid nebo toluen nebo ethylacetát a podobně) nebo reakcí s od zhruba 0,8 molárních ekvivalentů do zhruba 2,0 molárních ekvivalentů sulfonylhalidu (například benzensulfonyl-
 chlorid, toluensulfonylchlorid nebo methansulfonylchlorid a podobně) v přítomnosti od zhruba 1,0 do zhruba 4,0 molárních ekvivalentů báze (například triethylamin nebo uhličitán draselný
 nebo pyridin nebo methyl terc.butyl ether a podobně) při teplotě od zhruba -25°C do zhruba 100°C , což dá ester 19. (X_2 je halogen nebo sulfonátová štěpitelná skupina).

Reakce produktu 19 s od zhruba 0,9 do zhruba 2,0 molárních ekvivalentů 2-amino-4-chlor-
 purinu 8 v přítomnosti od zhruba 1,0 do zhruba 6,0 molárních ekvivalentů báze (například
 25 uhličitán draselný nebo NaH nebo KH nebo NaOH nebo KOH nebo lithium diizopropylamid a podobně) v inertním rozpouštědle (například DMF nebo THF nebo acetonitril nebo N-methyl-
 30 pyrrolidon nebo ethanol a podobně) při teplotě od zhruba -25°C do zhruba 140°C dává substituovaný purin 20.

Alternativně Mitsunobu navázání (například $\text{P}(\text{PH})_3/\text{diethyl azidokarboxylát}$) alkoholu 18 na
 35 2-amino-4-chlorpurin 8 dává 20.

Reakce produktu 20 s od zhruba 2,0 do zhruba 20,0 molárních ekvivalentů alkoholu R_9OH (R_9 je
 40 alkoholová ochranná skupina jako je benzyl a podobně) v přítomnosti od zhruba 1,0 do zhruba 6,0 molárních ekvivalentů báze (například terc.-butoxid draselný nebo uhličitán draselný nebo NaH nebo KH nebo lithium diizopropylamid a podobně) v inertním rozpouštědle (například THF
 nebo DMF a podobně) při teplotě od zhruba -25°C do zhruba 150°C dává alkohol 21.

Odstranění alkoholové ochranné skupiny R_9 produktu 21 (například by katalytická hydrogenace
 45 v inertním rozpouštědle jako je ethanol nebo benzyl alkohol nebo methanol nebo THF a podobně v přítomnosti katalyzátoru hydrogenace jako je Pd/C nebo $\text{Pd}(\text{OH})_2$ a podobně) dává substituova-
 ný guanin 22.

Etherový substituent produktu 23 je zbaven ochrany reakcí s a) redukčním činidlem (například
 50 HCO_2H a Pd/C a podobně), ve kterém R_{12} je $-\text{CH}(\text{Ph})_2$ nebo $-\text{C}(\text{Ph})_3$, nebo b) desilylačním
 činidlem (například Bu_4NF a podobně), ve kterém R_{12} je $-\text{Si}(\text{terc.-Bu})(\text{Me})_2$ a podobně, což
 dá 13.

Alkohol 13 může být konvertován na 1 jak je popsáno ve Schématu C.

Dodatečná alternativa zahrnuje enzymatickou esterifikaci alkoholu 4 nebo 17 vinyl esterem
 55 $\text{CH}_2=\text{CH-OC(O)R}_{10}$ (tj. $\text{R}_8 = \text{R}_{10}$ ve Schématech C a D) pro přímé zahrnutí požadovaného esteru

karboxylové kyseliny do 6 nebo 18 do finálního produktu 1. To dovoluje eliminaci esterové hydrolýzy a reesterifikace zahrnuté při přechodu z 9 na 12 nebo z 20 na 23.

- 5 Způsoby podle Schémat C a D jsou charakterizovány faktem, že každá hydroxylová skupina acyklického postranního řetězce je odlišena použitím odlišných hydroxy ochranných skupin nebo prekurzorových skupin. To dovoluje selektivní acylaci každé z hydroxy skupin buď amino-

- 10 kyselinou, nebo skupinou mastné kyseliny.
- Schéma C a D byla ilustrována a popsána s odvoláním a provedení vynálezu, ve kterém R_1 je odvozen od aminokyseliny a R_2 je odvozen od mastné kyseliny. Je však zřejmé, že odpovídající opačná schémata lze použít na sloučeniny, ve kterých R_1 je odvozen od mastné kyseliny a R_2 je odvozen od aminokyseliny.

15 Přehled obrázků na výkresech

Vynález bude nyní ilustrován na příkladech s odvoláním na neomezuující příklady, srovnávací příklady a doplňující obrázky, ve kterých:

- 20 Obr. 1 znázorňuje plastovou úroveň H2G jako funkci času u opic cynomolgus, kterým je podávána sloučenina podle vynálezu nebo alternativní prekurzorový derivát H2G, jak je dále vysvětleno v Biologické příkladu 3; a

- 25 Obr. 2 znázorňuje přežití jako funkci času u myši infikovaných Herpes simplex při podávání různých dávek sloučeniny podle vynálezu nebo antivirálních látek podle stavu techniky, jak je dále vysvětleno v Biologickém příklad 4.

Příklady provedení vynálezu

30

Příklad 1

(R)-9-[2-stearoyloxymethyl]-4-(L-valyloxy)butyl]guanin

35

Tento příklad ilustruje aplikaci přípravy podle schématu A.

a) (R)-9-[4-(N-*terc.*-butyloxykarbonyl-L-valyloxy)-2-(hydroxymethyl)butyl]guanin.

- 40 H2G (5 g, 19,7 mmol) byl rozpuštěn v DMF (300 ml) za ohřívání a byl ochlazen na teplotu okolí před přidáním N-*terc.*-Boc-L-valinu (5,58 g, 25,7 mmol), DMAP (0,314 g, 2,57 mmol) a DCC (6,52 g, 31,6 mmol). Směs byla míchána při teplotě okolí po 24 hodin a byla potom filtrována. Produkt byl chromatografován na silikagelu a vymýván $CH_2Cl_2/MeOH$, což dalo 2,4 g požadovaného meziproduktu.

45

1H -NMR (250 MHz, $DMSO-D_6$): δ 0,95 (d, gH), 1,47 (s, 9H), 1,5–1,8 (m, 2H), 1,96–2,20 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 3,91 (t, 1H), 4,05 (m, 2H), 4,21 (t, 2H), 4,89 (t, 1H), 6,6 (br s, 2H), 7,27 (d, 1H), 7,75 (s, 1H), 10,7 (br s, 1H).

- 50 b) (R)-9-[4-(N-*terc.*-Butoxykarbonyl-L-valyloxy)-2-(stearoyloxymethyl)butyl]guanin

Produkt z kroku a) (185 mg, 0,41 mmol) byl rozpuštěn v pyridinu (5 ml), roztok byl ochlazen v ledové lázni a byl přidán stearoylchlorid (179 μ l, 0,531 mmol). Roztok byl udržován v ledové lázni po dobu 2 hodin, potom při teplotě okolí po dobu 1 h. Potom byl odpařen a chromato-

grafován na silikagelu. Dále byl vymýván směsí dichlormethan/methanol, což dalo 143 mg požadovaného meziprojektu.

c) (R)-9-[2-(Stearoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]-guanin.

Produkt z kroku b) (138 mg, 0,192 mmol) byl ochlazen v ledové lázni a byla přidána kyselina trifluoroctová (5 ml). Roztok byl udržován v ledové lázni po dobu 45 minut a byl potom odpařen, což dalo olej. Voda (0,5 až 1 ml) byl dvakrát přidána a odpařena. Residuum bylo ještě jednou rozpuštěno ve vodě (5 ml), filtrováno a sušeno vymražením, což dalo 148 mg požadovaného produktu ve formě bistrifluoracetátové soli.

^1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6): 0,97 (t, 3H), 1,05 (dd, 6H), 1,34 (br s, 28H), 1,59 (m, 2H), 1,80 (m, 2H), 2,25 (m, 1H), 2,36 (t, 2H), 2,50 (m, 1H), 3,98–4,18 (m, 5H), 4,35 (t, 2H), 6,6 (br s, 2H), 8,0 (br s, 1H), 8,4 (br s, 3H), 10,9 (br s, 1H).

Příklad 2

(R)-9-(2-(myristoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl)guanin

Sloučenina v názvu byla získána ve formě bistrifluoracetátové soli analogicky jako v Příkladě 1 použitím myristoylchloridu namísto stearylchloridu v kroku b).

^1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ 0,97 (t, 3H), 1,05 (dd, 6H), 1,34 (br s, 2OH), 1,57 (m, 2H), 1,78 (m, 2H), 2,24 (m, 1H), 2,35 (t, 2H), 2,51 (m, 1H), 3,97–4,20 (m, 5H), 4,36 (t, 2H), 6,8 (br s, 2H), 8,2 (br s, 1H), 8,5 (br s, 3H), 11,1 (br s, 1H).

Příklad 3

(R)-9-[2-(oleoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin

Sloučenina z názvu byla získána jako bistrifluoroctová sůl způsobem analogickým Příkladu 1 použitím olejchloridu namísto stearylchloridu v kroku b).

^1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6): 0,96 (t, 3H), 1,05 (dd, 6H), 1,35 (br s, 2OH), 1,59 (m, 2H), 1,76 (m, 2H), 2,09 (m, 4H), 2,24 (m, 1H), 2,35 (t, 2H), 2,50 (m, 1H), 3,97–4,17 (m, 5H), 4,35 (t, 2H), 5,43 (t, 2H), 6,7 (br s, 2H), 8,0 (br s, 1H), 8,5 (br s, 3H), 11,1 (br s, 1H).

Příklad 4

(R)-9-[2-(butyryloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin

a) (R)-9-[4-*terc.*-butoxykarbonyl-L-valyloxy]-2-(butyryloxymethyl)butyl]guanin

DCC 110 mg, 0,53 mmol) byl rozpuštěn v dichlormethanu (10 ml) a byla přidána kyselina máselná (82 mg, 0,39 mmol). Po uplynutí 4 hodin při teplotě okolí byla směs filtrována a filtrát byl odpařen. Residuum bylo rozpuštěno v pyridinu (5 ml) a byl přidán (R)-9-[4-(N-*terc.*-butoxykarbonyl-L-valyloxy)-2-hydroxymethylbutyl]guanin (200 mg, 0,44 mmol) (Příklad 1, krok a). Směs byla míchána po dobu 120 hodin při teplotě okolí. Podle TLC reakce nebyla ukončena a bylo vytvořeno více anhydridu použitím procedury uvedené výše. Tento anhydrid byl přidán a směs byla míchána po dobu dalších 20 hodin. Reakční směs byla odpařena a chromato-

grafována nejprve na silikagelu a potom na oxidu hlinitém, v obou případech vymýván směsí dichlormethan/methanol, což dalo 79 mg meziproductu.

b) (R)-9-[2-(butyryloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin

Meziproduct kroku a byl zbaven ochrany způsobem analogickým Příkladu 1, krok 3, což dalo 84 mg požadovaného produktu ve formě bistrifluoroctové soli.

^1H NMR (250 MHz, D_2O): δ 0,88 (t, 3H), 1,06 (dd, 6H), 1,53 (m, 2H), 1,93 (q, 2H), 2,25 (t, 2H), 2,36 (m, 1H), 2,60 (m, 1H), 4,06 (d, 1H), 4,14–4,30 (m, 2H), 4,43 (m, 4H), 8,99 (br, s, 1H).

Příklad 5

(R)-9-[2-(dekanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin

Sloučenina z názvu byla získána jako bistrifluoroctová sůl způsobem analogickým Příkladu 1 použitím dekanoylchloridu namísto stearylchloridu v kroku b.

^1H NMR (250 MHz, D_2O): δ 0,90 (m, 3H), 1,01 (d, 6H), 1,28 (br, s, 12H), 1,5 (m, 2H), 1,8 (m, 2H), 2,3 (m, 3H), 2,5 (m, 1H), 4,0–4,4 (m, 7H), 8,1 (br s, 1H).

Příklad 6

(R)-9-[2-dokosanoyloxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl]guanin

Sloučenina z názvu byla získána jako bistrifluoroctová sůl způsobem analogickým Příkladu 1, ale použitím v kroku b DMAP/DCC podmínek Příkladu 1, krok a) ve spojení s dokosanovou kyselinou namísto *N-terc.-Boc-L-valinu* a směsi DMF a dichlormethanu jako rozpouštědla.

^1H NMR (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 0,97 (t, 3H), 1,05 (dd, 6H), 1,34 (br s, 36 H), 1,58 (m, 2H), 1,77 (m, 2H), 2,24 (m, 1H), 2,35 (t, 2H), 2,50 (m, 1H), 3,97–4,17 (m, 5H), 4,35 (t, 2H), 6,7 (br s, 2H), 8,1 (br, s, 1H), 8,4 (br s, 3H), 11,0 (br s, 1H).

Příklad 7

R-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-stearyloxymethyl]butyl]guanin

Tento příklad ilustruje aplikace preparativní schéma B.

a) (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(*terc.*butyldifenylsilyloxy)butyl]guanin H₂G (29,8 mmol) byl společně odpařen dvakrát s bezvodým DMF a byl potom suspendován v bezvodém DMF (120 ml) a pyridinu (1 ml). Do suspenze byl přidán po kapkách *terc.*-butyldifenylchlorsilan (2,1 ml, 8,2 mmol) v dichlormethanu (20 ml) při teplotě 0 °C po dobu 30 min. Z reakční směsi se stal po ukončení přidávání po kapkách čirý roztok. Reakce pokračovala při teplotě 0 °C po dobu dvou hodin a byla potom udržována při teplotě 4 °C přes noc. Do reakční směsi byl přidán methanol (5 ml). Po 20 minutách při teplotě okolí byla reakční směs odpařena na malý objem, vlita na vodný roztok kyselého uhličitanu sodného a extrahována dvakrát dichlormethanem. Organická fáze byla sušena nad síranem sodným a odpařena ve vakuu. Produkt byl izolován chromatografií na koloně silikagelu použitím systému methanol/dichlorethanu a po krocích zvyšovanou MeOH koncentrací. Produkt byl vymýván 7% MeOH v CH_2Cl_2 , což dalo 1,89 g.

b) (R)-9-[2-(stearoyloxymethyl)-4-(*tert.*-butyldifenylsilyloxy)butyl]guanin

(R)-9-[2-Hydroxymethyl-4-*tert.*butyldifenylsilyloxy)butyl]guanin (2,31 g, 5 mmol) byl dvakrát společně odpařen s bezvodým pyridinem a rozpuštěn v pyridinu (20 ml). Do roztoku byl pomalu
 5 přidán po kapkách stearoylchlorid (1,86 ml, 5,5 mmol, technická kvalita) v dichlormethanu (2 ml) při teplotě -5 °C. Reakce byla udržována při stejné teplotě po dobu 1 hodiny a potom při teplotě 5 °C po dobu 2 hodin. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Byl přidán dodatečný stearoylchlorid (0,29 ml) při teplotě -50 °C vzhledem k tomu, že reakce byla úplně dokončena. Po 30 minutách při teplotě 5 °C byl přidán methanol (3 ml) a reakční směs byla míchána po dobu
 10 20 min. Směs byla potom vlita na vodný roztok kyselého uhličitanu sodného a extrahována dichlormethanem. Organická fáze byla sušena a produkt čištěn chromatografií na koloně silikagelu a po krocích vzrůstajícím MeOH, vymývání pomocí 3,5 % MeOH v CH₂Cl₂ (výtěžek 2,7 g).

15 c) (R)-9-[4-hydroxy-2-(stearoyloxymethyl)butyl]guanin (R)-9-[2-(stearoyloxymethyl)-4-(*tert.*-butyldifenylsilyloxy)butyl]guanin (2,7 g, 3,56 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém THF (30 ml) a do roztoku byl přidán fluorovodík-pyridin (1,5 ml). Reakce byla udržována při teplotě 4 °C přes noc a monitorována pomocí TLC. Reakce dosáhla zhruba 80 % konverze. Byl přidán dodatečný HF-pyridin (0,75 ml). Po 4 hodinách TLC ukázala, že výchozí materiál byl
 20 spotřebován. Reakční směs byla koncentrována ve vakuu bez zvýšení teploty a bylo přidáno více pyridinu (5 ml) a znovu odpařeno. Produkt byl izolován chromatografií na koloně silikagelu (výtěžek 1,26 g).

d) (R)-9-[4-(N-BOC-L-izoleucyloxy)-2-(stearoyloxymethyl)butyl]guanin

25 (R)-9-[4-Hydroxy-2-(stearoyloxymethyl)butyl]guanin (135 mg, 0,26 mmol) a N-BOC-L-izoleucin (180 mg, 0,78 mmol) byly dvakrát společně odpařeny s bezvodým DMF a rozpuštěny v též rozpouštědle (3,5 ml). Do roztoku byl přidán 1,3-dicyklohexylkarbodiimid (160 mg, 0,78 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (4,8 mg, 0,039 mmol). Po udržování reakce po dobu
 30 18 hodin, byla reakční směs filtrována přes Celite a zpracována konvenčním způsobem. Produkt byl izolován chromatografií na koloně silikagelu, vymývání 5 % MeOH v CH₂Cl₂. (Výtěžek 160 mg)

e) (R)-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(stearoyloxymethyl)-butyl]guanin

35 Na (R)-9-[4-(N-BOC-L-izoleucyloxy)-2-(stearoyloxymethyl)butyl]guanin (150 mg, 0,205 mmol) v kroku d) bylo působeno kyselinou trifluoroctovou (3 ml) při teplotě 0 °C po dobu 20 min. Roztok byl odpařen ve vakuu. Residuum bylo dvakrát společně odpařeno s toluenem a udržováno ve vakuu po dobu několika hodin. Residuum bylo rozpuštěno v MeOH (2 ml)
 40 a odpařeno, což dalo trifluoroctovou sůl jako sklovitý produkt (výtěžek 191 mg).

¹H NMR (DMSO-d₆ + D₂O): δ 8,35 (s, 1H, báze), 4,21 (t, 2H, H-4), 4,10 (d, 2H), 3,96 (d, 2H), 3,90 (d, 1H, izoleucin), 2,48 (m, 1H, H-2), 2,15 (2H, stearoyl), 1,85 (m, 1H, izoleucin), 1,68 (m, 2H), 1,48 (m, 4H), 1,68 (m, 28H), 0,81 (m, 9H).

Příklad 8

(R)-9-[2-(dekanoyloxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]-guanin

50 Sloučenina z názvu byla získána jako bistrifluoroctová sůl způsobem analogickým Příkladu 7 použitím dekanoylchloridu namísto stearoylchloridu v kroku b).

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 11,1 (s, 1H, NH), 8,35 (s, br, 3H), 8,28 (s, 1H, báze), 6,75 (s 2H, NH_2), 4,23 (t, 2H), 4,07 (d, 2H), 4,05 (m, 3H), 2,4 (m, 1H), 2,21 (t, 2H), 1,83 (m, 1H), 1,66 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 1,39 (m, 2H), 1,22 (s, 12H), 0,84 (m, 9H).

5

Příklad 9

(R)-9-(4-(L-izoleucyloxy)-2-(myristoyloxymethyl)butyl]guanin

10 Sloučenina z názvu byla získána jako bistrifluoroctová sůl způsobem analogickým Příkladem 1 použitím N-BOC-L-izoleucinu namísto N-BOC-valinu v kroku a) a myristoylchloridu v kroku b).

15 ^1H -NMR (DMSO- d_6): δ 10,99 (s, 1H), 8,34 (br s, 3H), 8,15 (s, 1H), 6,67 (br s, 2H), 4,23 (t, 2H), 4,05 (d, 2H), 3,97 (m, 3H), 2,48 (m, 1H), 2,20 (t, 2H), 1,85 (m, 1H), 1,65 (m, 2H), 1,41 (m, 4H), 1,23 (s, 20H), 0,85 (m, 9H).

Příklad 10

20

(R)-9-[2-(4-acetylbutyryloxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl]guanin

25 Sloučenina z názvu byla získána jako bistrifluoroctová sůl způsobem analogickým Příkladem 1 ale použitím DCC/DMAP podmínek Příklad 1, krok a) v kroku b) spolu s 4-acetylmáselnou kyselinou namísto N-terc.Boc-L-valinu.

30 ^1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ 1,05 (dd, 6H), 1,77 (m, 4H), 2,19 (s, 3H), 2,24 (m, 1H), 2,36 (t, 2H), 2,44–2,60 (m, 3H), 3,95–4,20 (m, 5H), 4,36 (m, 2H), 6,8 (br s, 2H), 8,21 (br s, 1H), 8,5 (br s, 3H), 11,1 (br s, 1H).

Příklad 11

35 (R)-9-(2-dodekanoyloxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl]guanin

Sloučenina z názvu byla získána jako bistrifluoroctová sůl způsobem analogickým Příkladem 1 použitím dodekanoyl-chloridu namísto stearylchloridu v kroku b).

40 Příklad 12

(R)-9-(2-palmitoyloxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl]guanin

45 Sloučenina z názvu byla získána jako bistrifluoroctová sůl způsobem analogickým Příkladem 1 použitím palmitoylchloridu namísto stearylchloridu v kroku b).

50 ^1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ 0,97 (t, 3H), 1,05 (m, 6H), 1,35 (br s, 24H), 1,58 (m, 2H), 1,78 (m, 2H), 2,25 (m, 1H), 2,35 (t, 2H), 2,51 (m, 1H), 3,97–4,18 (m, 5H), 4,35 (t, 2H), 6,7 (br s, 2H), 8,1 (br s, 1H), 8,5 (br s, 3H), 11,0 (br s, 1H).

Příklad 13

(R)-2-amino-9-(2-stearoyloxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl)purin

5 Tento příklad ukazuje deoxygenaci skupiny R₁.

a) (R)-2-Amino-9-(2-stearoyloxymethyl-4-(N-*terc.*-butoxykarbonyl-L-valyloxy)butyl)-6-chlorpurin:

10 Do roztoku (R)-9-(2-stearoyloxymethyl-4-(N-*terc.*-butoxykarbonyl-L-valyloxy)butyl)guaninu z kroku 2 Příkladu 1 (646 mg, 0,9 mmol) a acetonitrilu byl přidán tetramethylamoniumchlorid (427 mg, 2,7 mmol), N,N-diethylanilin (0,716 ml, 4,5 mmol) a oxychlorid fosforečný (0,417 ml, 4,5 mmol). Reakce byla udržována při teplotě zpětného toku a její postup monitorován pomocí TLC. Po 3 hodinách byla reakční směs odpařena ve vakuu a residuum bylo rozpuštěno
15 v dichlormethanu, potom vlitto na studený vodný roztok kyselého uhličitanu sodného. Organická fáze byla odpařena a čištěna chromatografií na koloně silikagelu. Výtěžek: 251 mg.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 7,76 (1H, H-8), 5,43 (br, 2H, NH₂), 4,45–4,00 (m, 7H), 2,53 (m, 1H), 2,28 (t, 2H), 2,12 (m, 1H), 1,75 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,43 (9H), 1,25 (m, 28H), 0,96 (d, 3H), 0,87 (m, 6H).
20

b) (R)-2-Amino-9-(2-stearoyloxymethyl-4-(N-*terc.*-butoxykarbonyl-L-valyloxy)butyl)-purin:

25 Do roztoku (R)-2-amino-9-(2-stearoyloxymethyl-4-(N-*terc.*-butoxykarbonyl-L-valyloxy)-butyl)-6-chlorpurinu (240 mg, 0,33 mmol) ve směsi methanol/ethylacetát (6 ml, 3:1 V/V) byl přidán formiát amonný (105 mg, 1,65 mmol) a 10% paládium na uhlíku (15 mg). Reakce byla udržována při teplotě zpětného toku po dobu 1 hodiny a byl znovu přidán formiát amonný (70 mg). Po jedné hodině další TLC ukázala ukončení reakce a směs byla filtrována přes Celite
30 a intenzívně promývána ethanolem. Filtrát byl odpařen a čištěn na koloně silikagelu. Výtěžek: 193 mg.

¹H-NMR (CDCl₃): 5,8,69 (s, 1H, H-6), 7,74 (s, 1H, H-8), 5,18 (br, s, 2H, NH₂), 4,45–4,01 (m, 1H), 2,55 (m, 1H), 2,28 (t, 2H), 2,10 (m, 1H), 1,75 (m, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,25 (s, 28H), 0,96 (d, 3H), 0,87 (m, 6H).
35

c) (R)-2-Amino-9-(2-stearoyloxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl)purin:

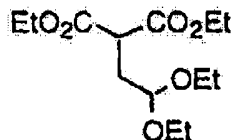
40 Na (R)-2-amino-9-(2-stearoyloxymethyl-4-(N-*terc.*-butoxykarbonyl-L-valyloxy)butyl)purin (180 mg, 0,26 mmol) bylo působeno kyselinou trifluoroctovou (5 ml) při teplotě 0 °C po dobu 40 min. Směs byla potom odpařena ve vakuu a společně odpařena postupně s toluenem a methanolem. Residuum bylo sušenou vymražením přes noc, což dalo 195 mg požadovaného produktu.

45 ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 8,78 (s, 1H, H-6), 8,32 (br, 3H), 8,29 (s, 1H, H-8), 4,27 (t, 2H), 4,13 (d, 2H), 3,98 (t, 2H, 2H), 3,89 (m, 1H), 2,47 (m, 1H), 2,18 (m, 3H), 1,43 (m, 2H), 1,23 (28H), 0,93 (m, 6H), 0,85 (t, 3H).

Příklad 14

Alternativní příprava (R)-9-[4-hydroxy-2-(stearyloxymethyl)butyl]guaninu

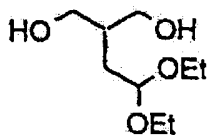
- 5 a) Příprava ethyl 4,4-diethoxy-2-ethoxykarbonyl-mléčnanu



10 Terc.butoxid draselný (141,89, 1,11 ekviv.) byl rozpuštěn v bezvodém DMF (1 l). během 5 minut byl přidán diethylmalonan (266 ml, 1,54 ekviv.). Během 5 minut byl přidán bromacetaldehyd diethylacetal (172 ml, 1,14 mmol). Směs byla zahřívána na 120 °C (vnitřní teplota) a míchána při teplotě 120 °C po dobu 5 hodin. Směs byla ponechána ochladnout na teplotu okolí, vlita do vody (5 ml) a extrahována methyl *terc.*-butyl etherem (MTBE, 3 x 600 ml). Organický roztok byl sušen nad MgSO_4 , filtrován, koncentrován a destilován (0,5 mm, 95 až 140 °C), což dalo požadovaný diester (244 g, 78 %) ve formě bezbarvého oleje.

15 ^1H NMR (CDCl_3) δ 1,19 (t, 3H), 1,28 (t, 6H), 2,22 (dd, 2H), 3,49 (m, 2H), 3,51 (t, 1H), 3,65 (m, 2H), 4,20 (qd, 4H), 4,54 (t, 1H).

- b) Příprava 4,4-diethoxy-2-(hydroxymethyl)-butanolu

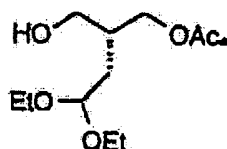


20 LiBH_4 (zakoupený roztok, 2M v THF, 22,5 ml) a produkt Příkladu 14 krok a) (5 g v 15 ml THF, 18,1 mmol) byl zkombinován a zahřátý na teplotu 60 °C a mícháný při teplotě 60 °C po dobu 4 hodin. Reakční směs byla ponechána ochladnout na teplotu okolí a reakční nádoba byla umístěna v studené vodní lázni. Potom byl přidán triethanolamin (5,97 ml, 1 ekviv.) takovou rychlostí, že teplota reakční směsi byla udržována v rozmezí 20 až 25 °C. Solanka (17,5 ml) byla
25 přidána takovou rychlostí, že vývin plynu byl kontrolován a směs byla míchána po dobu 45 minut při teplotě okolí. Vrstvy byly separovány, organická vrstva byla promývána solankou (2 x 15 ml). Sloučené solankové vrstvy byly extrahovány MTBE (methyl *terc.*-butyl ether, 3 x 20 ml). Sloučené organické extrakty byly odpařena a residuum bylo rozpuštěno v MTBE (50 ml) a promýváno solankou (25 ml). Solanková vrstva byla zpětně extrahována MTBE (3 x 25 ml).
30 Sloučené organické extrakty byly sušeny nad Na_2SO_4 , filtrovány a koncentrovány, což dalo požadovaný diol (3,369, 15,5 mmol, 97%) ve formě bezbarvého oleje.

^1H NMR (CDCl_3) δ 1,22 (t, 6H), 1,73 (dd, 2H), 1,92 (m, 1H), 2,67 (bs, 2H), 3,52 (m, 2H), 3,69 (m, 2H), 3,72 (m, 4H), 4,62 (t, 1H).

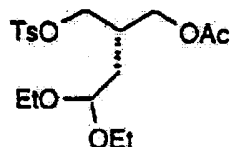
35

c) Příprava (2R)-2-acetoxymethyl-4,4-diethoxy-butanolu



Do 10 ml baňky s jedním hrdlem byl vložen produkt Příkladu 14 krok b) (3,84 g, 20 mmol), následován přidáním vinylacetátu (2,6 g, 30 mmol) a nakonec Lipase PS 30 (69 mg, zakoupené od (Amano, Lombard, Illinois). Směs byla ponechána za míchání při teplotě okolí po dobu 16 hodin. Postup reakce byl důsledně monitorován pomocí TLC (2/1 hexan – EtOAc; označení pomocí $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ a úprava na vyhřívané desce; koeficient retence diolu je 0,1, monoacetátu je 0,3, bisacetátu je 0,75). Reakční směs byla zředěna CH_2Cl_2 a filtrována přes 5 mikronový filtr. Filtr byl promýván dalším CH_2Cl_2 . Filtrát byl potom koncentrován ve vakuu, což dalo požadovaný produkt.

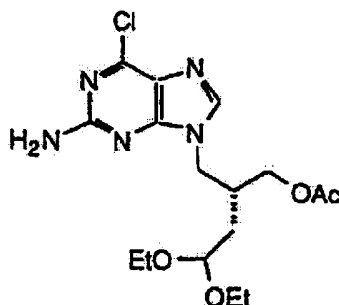
d) Příprava (2S)-2-acetoxymethyl-4,4-diethoxybutyl toluensulfonátu



Do 100 ml kulaté baňky s jedním hrdlem, vybavené magnetickým míchadlem a udržované pod N_2 byl vložen surový produkt Příkladu 14 krok c) (4,62 g, 19 mol), bezvodý CH_2Cl_2 (20 ml) a Et_3N (5,62 ml, 40 mmol). Do tohoto roztoku byl přidán tosylchlorid (4,76 g, 25 mmol). Vzniklá směs byla míchána při teplotě okolí po dobu 4 hodin. Byla přidána H_2O (0,27 g, 15 mmol) a směs byla intenzivně míchána po dobu 4 hodin. Reakční směs byla zředěna 80 ml EtOAc a 50 ml H_2O a vodná vrstva byla separována. Do organické vrstvy bylo přidáno 75 ml 5 % vodného roztoku KH_2PO_4 . Po míchání a separaci vrstev byla vodná vrstva odebrána. Organická vrstva byla promývána 50 ml nasyceného NaHCO_3 roztoku, vysušena nad Na_2SO_4 , filtrována a koncentrována ve vakuu na konstantní hmotnost 7,40 g požadovaného produktu.

^1H NMR (CDCl_3) δ 1,17 (t, 6H), 1,62 (m, 2H); 1,94 (s, 3H); 2,19 (m, 1H); 2,45 (s, 3H); 3,42 (m, 2H); 3,6 (m, 2H); 4,03 (m, 4H); 4,51 (t, 1H), 7,36 (d, 2H); 7,78 (d, 2H).

e) Příprava

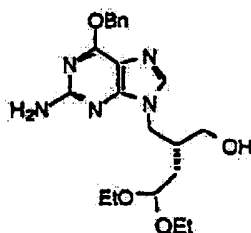


Do 50 ml baňky s jedním hrdlem byl vložen produkt Příkladu 14 krok d) (3,88 g, 10 mmol), bezvodý DMF (20 ml), 2-amino-4-chlor-purin (2,125 g, 12,5 mmol) a K_2CO_3 (4,83 g). Vzniklá suspenze byla míchána při teplotě 40 °C pod atmosférou N_2 po dobu 20 hodin. Směs byla koncentrována a většina DMF byla odstraněna rotační odparkou. Residuum bylo zředěno EtOAc

(50 ml) a H₂O (50 ml). Reakční směs byla přemístěna dělicí nálevky, třepána a vodná vrstva byla separována. Vodná vrstva byla extrahována EtOAc (25 ml). Organické vrstvy byly sloučeniny a promývány 5 % KH₂PO₄ (75 ml). Organická vrstva byla separována a promývána H₂O (75 ml), solankou (75 ml), sušena nad Na₂SO₄, filtrována a koncentrována ve vakuu, což dalo 3,95 g surového produktu. Surový produkt byl suspendován 40 ml methyl-*terc.*-butyl etheru. Tato směs byla míchána přes noc při teplotě 4 °C a směs byla filtrována. Filtrát byl koncentrován, což dalo 3,35 g produktu ve formě oleje (obsahujícího 2,6 g požadovaného produktu na základě HPLC analýzy).

300 MHz ¹H NMR (CDCl₃) δ 1,19 (m, 6H); 1,69 (2H); 1,79 (s, 1H); 2,03 (s, 3H); 2,52 (m, 1H); 3,48 (m, 2H); 3,62 (m, 2H); 4,04 (m, 2H); 4,16 (m, 2H); 4,61 (t, 1H); 5,12 (bs, 2H); 7,81 (s, 1H).

f) Příprava



15

(Bn=benzyl)

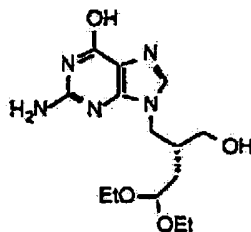
Do 500 ml baňky s jedním hrdlem byl vložen benzylalkohol (136 ml), ochlazen na teplotu 0 °C, následován přidáním po částech KO-*terc.*-Bu (36 g, 321 mmol). Teplota byla ponechána zvýšit se na 40 °C a směs byla míchána 20 minut. Do této směsi byl přidán při teplotě 0 °C surový produkt Příkladu 14 krok e) (24,7 g, 64,2 mmol), rozpuštěný v 25 ml bezvodého THF a benzylalkoholu (30 ml). Teplota byla ponechána pomalu vzrůst na 8 °C v průběhu 2 hodin. Reakční směs byla vlita na 500 ml ledu a byla extrahována 500 ml MTBE. Organická vrstva byla promývána 250 ml solanky, sušena nad Na₂SO₄, filtrována a koncentrována ve vakuu, což přineslo 193 g benzylalkoholového roztoku požadovaného produktu. HPLC analýza ukázala, že roztok obsahoval 25,96 g požadovaného produktu.

300 MHz ¹H NMR (CDCl₃) δ 1,55 (2H); 2,18 (m, 1H); 3,15 (m, 1H); 3,40 (m, 1H); 3,51 (m, 2H); 3,70 (m, 2H); 4,25 (m, 2H); 4,63 (t, 1H); 4,90 (br, 2H); 5,25 (m, 1H); 5,58 (s, 2H); 7,35 (m, 3H); 7,51 (m, 2H); 7,72 (s, 1H).

30

MS = (M + H) + = 416 (Cl).

g) Příprava



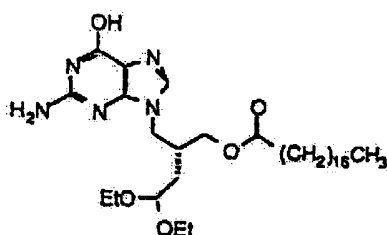
Do 100 ml baňky s jedním hrdlem byl vložen surový produkt Příkladu 14 krok p) (9,65 g benzylalkoholového roztoku, obsahujícího 1,30 g, 3,13 mmol produktu Příkladu 14, krok f) rozpuštěného v absolutním EtOH (20 ml). Do této směsi bylo přidáno 0,45 g 10 % Pd/C suspendovaného v 5 ml absolutního EtOH. Z reakční baňky byl odčerpán vzduch a vpuštěn H₂. Tlak v reakční baňce

byl udržován na 1 atm. H_2 a reakční směs byla míchána přes noc. Reakční směs byla filtrována přes křemelinový filtr, aby bylo odstraněno Pd/C. Těkavé látky byly odstraněny ve vakuu. Residuum bylo smícháno s 25 ml izopropylacetátu a potom koncentrováno ve vakuu. Residuum bylo zředěno EtOAc (10 ml), naočkováno požadovaným produktem, zahřáto na teplotu zpětného toku a potom bylo přidány CH_3CN (2 ml) a MTBE (35 ml). Směs byla míchána po dobu 30 minut. Precipitát byl filtrován a sušen na konstantní hmotnost 600 mg požadovaného produktu.

300 MHz 1H NMR (d_6 -DMSO) δ 1,16 (m, 6H); 1,45 (m, 1H); 1,61 (m, 1H); 2,16 (m, 1H); 3,45 (m, 2H); 3,40 (m, 1H); 3,62 (m, 2H); 4,02 (m, 2H); 4,53 (t, 1H); 4,85 (t, 1H); 6,55 (bs, 1H); 7,75 (s, 1H).

MS =: (M + H) $^+$ = 416 (CI).

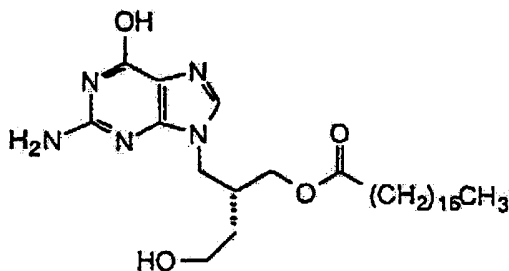
h) Příprava



Do 25 ml baňky s jedním hrdlem byl vložen produkt Příkladu 14 krok g) (0,650 g, 2,0 mmol), pyridin (4 ml), a CH_2Cl_2 (2 ml), DMAP (10 mg). Směs byla ochlazená na teplotu $-5^\circ C$ a v průběhu 5 minut byl přidán stearylchlorid (790 mg, 2,6 mmol), rozpuštěný v CH_2Cl_2 (0,5 ml). Vzniklá směs byla míchána 16 hodin při teplotě $-5^\circ C$. Byl přidán absolutní EtOH (0,138 g, 3,0 mmol) a směs byla míchána další 1 hodinu. Reakční směs byla koncentrována ve vakuu. Do residua byl přidán toluen (30 ml) a potom směs byla koncentrována ve vakuu. Do residua byl znovu přidán toluen (30 ml) a potom směs byla koncentrována ve vakuu. Do residua byl přidán 1% KH_2PO_4 (25 ml) a tato směs byla extrahována CH_2Cl_2 (60 ml). Organická vrstva byla separována a byla sušena nad Na_2SO_4 , filtrována a koncentrována ve vakuu na konstantní hmotnost 1,65 g. Surový produkt byl chromatografován na 40 g SiO_2 , vymýván směsí 95/5 CH_2Cl_2 – EtOH, což dalo 367 mg požadovaného produktu.

300 MHz 1H MMR ($CDCl_3$) δ 0,89 (t, 3H); 1,26 (m, 30 H); 1,65 (m, 3H); 2,32 (m, 1H); 3,45 (m, 1H); 3,60 (m, 2H); 4,08 (m, 2H); 4,60 (m, 1H); 6,0 (bs, 2H);

i) Příprava



Do 25 ml baňky s jedním hrdlem byl vložen produkt Příkladu 14, krok h) (0,234 g, 0,394 mmol) rozpuštěný v THF (1,7 ml). Do tohoto roztoku byla přidána kyselina trifluormethansulfonová (0,108 g) v H_2O 180 mg. Směs byla míchána přes noc při teplotě okolí. Do reakční směsi byl přidán nasycený roztok $NaHCO_3$ (10 ml), THF (5 ml), CH_2Cl_2 (2 ml) a $NaBH_4$ (0,10 g). tato

směs byla míchána po dobu 30 minut. Do reakční směsi byl přidán 5% roztok CH_2PO_4 (30 ml). Tato směs byla extrahována 2 x 15 ml CH_2Cl_2 . Organické vrstvy byly sloučeny a sušeny nad Na_2SO_4 , filtrovány a koncentrovány ve vakuu na konstantní hmotnost 207 mg. Tento materiál byl rekrystalizován z EtOAc (8 ml) a CH_3CN (0,5 ml) což dalo 173 mg požadovaného produktu.

5

300 MHz ^1H NMR (d_6 -DMSO) 5 0,82 (t, 3H); 1,19 (m, 3OH); 1,41 (m, 4H); 2,19 (t, 2H); 2,32 (m, 1H); 3,40 (m, 2H); 3,9 (m, 4H); 4,49 (m, 1H); 6,4 (bs, 2H); 7,61 (m, 1,5H); 9,55 (m, 0,5H).

10 Příklad 15

Alternativní příprava (R)-9-[4-(N-*terc.*-butyloxykarbonyl-L-valyloxy)-2-(stearyloxy-methyl)butyl]guaninu

15 (R)-9-[2-(stearyloxymethyl)-4-(*terc.*-butyldifenylsilyloxy)butyl]guanin (45 g) a THF (950 ml) byly sloučeny v 2 l baňce. Potom byl přidán Boc-L-valin (3,22 g, 0,25 ekviv.), následován tetrabutylamonium fluoridem (1M v THF, 89,05 ml) v průběhu 10 minut. Čirá reakční směs byla míchána při teplotě okolí po dobu 2 hodin a 50 minut a reakce byla monitorována pomocí TLC (90/10 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$).

20

Do reakční směsi byl přidán Boc-L-valin (35,43 g, 2,75 ekviv.), DCC (36,67 g, 2,75 ekviv.) a dimethylaminopyridin (1,1 g, 0,15 ekviv.) a THF (25 ml). Reakční směs byla míchána při teplotě okolí po dobu 24 hodin. DCU byl odfiltrován a promýván CH_2Cl_2 . Filtrát byl koncentrován a residuum bylo vyjmuto v 2 litrech CH_2Cl_2 a promýváno 2 l 1/2 nasyceného kyselého uhlíčitanu sodného a solankou. Po sušení a odpaření bylo získáno přibližně 100 g surového produktu. Materiál byl čištěn chromatografií na oxidu křemičitém (6000 ml oxidu křemičitého) použitím 3% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ až 5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ což dalo 38,22 mg požadovaného produktu.

25

30

Příklad 16

Alternativní příprava (11)-9-[2-(stearyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guaninu

35 a) (R)-9-[2-hydroxymethyl)-4-(*terc.*-butyldifenylsilyloxymethyl)butyl]guanin H₂G (450,0 g, 1,78 mol) a N,N-dimethylformamid (6,4 kg) byly vloženy do Buchiho odparky a směs zahřáta, aby se pevná látka rozpustila. Roztok byl koncentrován do sucha ve vakuu při teplotě ne větší než 90 °C. Vzniklý prášek byl přenesen do 22 litrové baňky s míchadlem, převodem a teplotní sondou. Byl přidán N,N-dimethylformamid (1,7 kg), následovaný pyridinem (3,53 kg). Vzniklá suspence byla ochlazená na teplotu -10 °C pod dusíkovou atmosférou a míchána při teplotě -5 ± 5 °C, zatímco byl přidán po kapkách *terc.*-butylchloridifenylosilan (684 g, 2,49 mol). Vzniklá směs byla míchána při teplotě -5 ± 5 °C, dokud reakce nebyla ukončena (monitorováno TLC (10:1 methylenchlorid/methanol) a HPLC (4,6 x 250 mm Zorbax RXC8 (5 mikronů); 60:40 acetonitril-aq. NH_4OAc (0,05 M) při 1,5 ml/min; UV detekce při 254 nm)). Byla přidána voda (16 kg) a směs byla míchána po dobu 30 minut do precipitace produktu, potom směs byla ochlazená na teplotu 0 °C v průběhu 30 minut. Pevná látka byla izolována filtrací a produkt byl promýván studenou vodou a sušen suchým vzduchem, což dalo surový produkt jako bělavou pevnou látku. Surová pevná látka byla vyjmuta v pyridine (3 kg) a koncentrována ve vakuu při teplotě 60 °C, aby se odstranila voda. Suché residuum ve formě pevné látky bylo suspendováno s methanolem (10 kg) při teplotě 60 °C v průběhu 1 až 2 hodin a filtrováno, dokud bylo horké. Filtrát byl koncentrován ve vakuu a pevná látka byla zahřívána na teplotu zpětného toku s izopropylacetátem (7 kg) po dobu 30 minut. Směs byla ochlazená na teplotu 20 °C a filtrována. Filtrační kláč byl sušen ve vakuu při teplotě 50 °C, což dalo sloučeninu z názvu jako bílou pevnou látku (555 g).

40

45

50

b) (R)-9-[2-(Stearoyloxymethyl)-4-(*terc.*-butyldifenylsilyloxy)butyl]guanin

Produkt Příkladu 16, krok a) (555 g, 1,113 mol) byl vložen do 50 litrové Buchiho odparky. Pyridin (2,7 kg) byl přidán po kapkách aby rozpustil pevnou látku a směs byla destilována do sucha ve vakuu při teplotě 60 °C. Residuum bylo vyjmuto v čerstvém pyridinu (2,7 kg) a přeneseno do 22 litrové baňky s míchadlem, přívodem a teplotní sondou. Roztok byl ochlazen na teplotu -5 °C pod dusíkovou atmosférou. Byl přidán roztok stearylchloridu (440 g, 1,45 mol) v methylenchloridu (1,5 kg), přičemž teplota byla udržována pod 0 °C. Byl přidán 4-(N,N-dimethyl-amino)pyridin (15 g, 0,12 mol) a směs byla míchána při teplotě -5 až 0 °C po dobu 2 až 4 hodin dokud konverze nebyla ukončena (jak bylo monitorováno TLC (10:1 methylenchlorid/-methanol) a HPLC (4,6 x 250 mm Zorbax RXC8 (5 mikronů); 60:40 acetonitril-aq. NH₄OAc (0,05 M) při 1,5 ml/min; UV detekce při 254 nm)). Po ukončení reakce byl přidán acetonitril (8,7 kg) a směs byla míchána po dobu ne kratší než 15 minut, aby produkt precipitoval. Suspence byla ochlazena na teplotu 0 °C v průběhu 2 hodin a pevná látka byla izolována filtrací a filtrační koláč byl promýván acetonitrem (2 kg). Požadovaný produkt byl získán jako bílá pevná látka (775 g).

c) (R)-9-[4-hydroxy-2-(stearoyloxymethyl)butyl]guanin

Roztok produktu Příkladu 16, krok b) (765 g, 0,29 mol) v tetrahydrofuranu (10 kg) byl připraven v reaktoru. Roztok tetra(n-butyl)amonium fluoridu v tetrahydrofuranu (1,7 kg 1 M roztok, 1,7 mol) byl přidán a vzniklý čirý roztok byl míchán při teplotě 20 až 50 °C po dobu 4 hodin. Byla přidána voda (32 kg) a vzniklá suspence byla míchána po dobu 1 hodiny a potom ochlazena na teplotu 0 °C v průběhu 30 minut. Precipitát byl izolován filtrací a filtrační koláč byl promýván postupně vodou (10 kg) a acetonitrem (5 kg). Po sušení ve vakuu při teplotě 25 °C bylo získané 702 g surového produktu. Surový produkt byl rozpuštěn při teplotě zpětného toku v THF (4,2 kg) a vodě (160 g), potom ochlazen na teplotu 40 °C a bylo na něj působeno methylenchloridem (14,5 kg). Směs byla ponechána ochladnout na teplotu 25 ± 5 °C v průběhu 1 hodiny, potom byla ochlazena na teplotu 5 ± 5 °C v průběhu 1 hodiny, aby se ukončila precipitace. Mírně bělavý prášek byl izolován filtrací a sušen ve vakuu při teplotě 40 °C, což dalo požadovaný produkt (416 g).

d) (R)-9-[4-(N-Cbz-L-valyloxy)-2-(stearoyloxymethyl)butyl]guanin

Roztok N-Cbz-L-valinu (169 g, 0,67 mol) v bezvodém THF (750 ml) byl připraven v 2 litrové baňce s mechanickým míchadlem, teploměrem a přívodem. Roztok dicyklohexylkarbodiimidu (69,3 g, 0,34 mol) v THF (250 ml) byl přidán v průběhu 5 minut a vzniklá suspence byla míchána při teplotě 20 ± 5 °C po dobu 2 hodin. Suspence byla filtrována a filtrační koláč byl promýván THF (300 ml). Filtrát byl vložen do 3 litrové baňky s míchadlem a teploměrem. Produkt Příkladu 16, krok c) (116 g, 0,22 mol) byl přidán jako pevná látka, s proplachováním THF (250 ml). Byl přidán 4-(N, N-dimethylamino)pyridin (2,73 g, 0,022 mol) a bílá suspence byla míchána při teplotě 20 ± 5 °C. Během 15 minut byly všechny pevné látky rozpuštěny a reakce byla ukončena za 1 hodinu (jak bylo určeno pomocí HPLC: 4,6 x 250 mm Zorbax RXCS kolona; 85:15 acetonitril 0,2 % aq. HClO₄ při 1 ml/min.; UV detekce při 254 nm; výchozí materiál vymýván po 4,1 min. a produkt vymýván po 5,9 min.). Reakční směs byla propláchnuta přidáním vody (5 ml) a roztok byl koncentrován ve vakuu, což dalo slabě žlutou polotuhou látku. Látka byla vyjmuta v methanolu (1,5 litrů) a zahřáta na teplotu zpětného toku v průběhu 30 minut. Roztok byl ochlazen na teplotu 25 °C a precipitát byl odstraněn filtrací. Filtrát byl koncentrován ve vakuu, což dalo viskózní bledě žlutý olej. Byl přidán acetonitril (1 l) a vzniklá bílá suspence byla míchána při teplotě 20 ± 5 °C po dobu 90 minut. Surová pevná látka byla izolována filtrací, promývána acetonitrem (2 x 100 ml) a sušena na vzduchu přes noc, což dalo požadovaný produkt jako voskovitou lepkavou pevnou látku (122 g). Látka byla dále čištěna krystalizací

z ethylacetátu (500 ml) a sušením ve vakuu při teplotě 30 °C, což dalo požadovaný produkt jako bílou voskovitou pevnou látku (104 g).

e) (R)-9-[4-(L-valyloxy)-2-(stearoyloxymethyl)butyl]guanin

5 Roztok produktu Příkladu 16, krok d), (77 g) v horkém (40 °C) ethanolu (2,3 l) byl vložen do hydrogenačního reaktoru s 5 % Pd/C (15,4 g). Směs byla míchána při teplotě 40 °C za tlaku 40 psi vodíku po dobu 4 hodin, plyn odčerpán a směs byla hydrogenována po dobu dalších 4 až 10 hodin. Katalyzátor byl odstraněn filtrací a filtrát byl koncentrován ve vakuu, což dalo bílou
10 pevnou látku. Látka byl míchána s ethanolem (385 ml) při teplotě 25 °C po dobu 1 hodiny, potom ochlazená na teplotu 0 °C a filtrována. Filtrační koláč byl sušen vzduchem, potom ve vakuu při teplotě 35 °C, což dalo sloučeninu z názvu jako bílý prášek (46 g).

15 Příklad 17

(R)-9-[2-(L-valyloxymethyl)-4-(stearoyloxy)butyl]guanin

a) (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(stearoyloxy)butyl]guanin H₂G (506 mg; 2,0 mol) byl
20 rozpuštěn v bezvodém N,N-dimethylformamidu (40 ml) s pyridinem (400 mg; 5,06 mol) a 4-dimethylaminopyridinem (60 mg; 0,49 mmol). Byl přidán stearoylchlorid (1500 mg; 4,95 mmol) a směs byla udržována přes noc při teplotě okolí. Většina rozpouštědel byla odpařena ve vakuu, residuum mícháno s 70 ml ethylacetátu a 70 ml vody a pevná látka odfiltrována, promývána ethylacetátem a vodou a sušena, což dalo 680 mg surového produktu. Chromatografie
25 na koloně silikagelu (chloroform:methanol 15:1) dala čistou sloučeninu z názvu jako bílou pevnou látku.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 0,86 (t, 3H); 1,25 (s, 28H); 1,51 (gui, 2H); 1,62 (m, 2H); 2,06 (m, 1H);
30 2,23 (t, 2H); 3,34 (d, 2H); 3,96 (ABX, 2H); 4,07 (dd, 2H); 6,30 (br s, 2H); 7,62 (s, 1H); 10,45 (s, 1H).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ: 13,8 (C18); 22,0 (C17); 24,4 (C3); 27,7 (C3'); 28,4–28,8 (C4–6, C15);
35 28,9 (C7–14); 51,2 (C16); 33,5 (C2); 38,0 (C2'); 44,0 (C1'); 60,6/61,8 (C4', C22''); 116,5 (guaC5); 137,7 (guaC7); 151,4 (guaC4); 153,5 (guaC2); 156,7 (guaC6); 172,7 (COO).

b) (R)-9-[2-(N-Boc-L-valyloxymethyl)-4-stearoyloxy]butyl]guanin.

Směs N-Boc-L-valinu (528 mg; 2,1 mmol) a N,N'-dicyklohexyl karbodiimidu (250 mg;
40 1,21 mg) v dichlormethanu (20 ml) byla míchána přes noc při teplotě okolí, dicyklohexyl-močovina odfiltrována a extrahována malým objemem dichlormethanu a filtrát byl odpařen ve vakuu na malý objem. Byly přidány (H)-9-[2-Hydroxymethyl-4-(stearoyl-oxy)butyl]guanin (340 mg; 0,654 mmol), 4-dimethyl-aminopyridin (25 mg; 0,205 mmol) a bezvodý N,N-dimethylformamid (15 ml) a směs byla míchána po dobu 4 hodin při teplotě 50 °C pod N₂.
45 Rozpouštědlo bylo odpařeno ve vakuu na malý objem. Chromatografie na koloně silikagelu, potom na oxidu hlinitém (vymývání ethylacetát:methanol:voda 15:2:1) dala 185 mg (39%) čisté sloučeniny z názvu jako bílé pevné látky.

¹H NMR (CHCl₃) δ 0,85–1,0 (m, 9H) 18-CH₃, CH(CH₃)₂; 1,25 (s, 28H) 4–17-CH₂; 1,44 (s, 9H)
50 terc.Bu; 1,60 (qui, 2H); 3-CH₂; 1,74 (qua, 2H); 3'-CH₂; 2,14 (m, 1H); 2'-CH; 2,29 (t, 2H) 2-CH₂; 2,41 (m, 1H) CH(CH₃)₂; 4,1–4,3 (m, 6H) C1'-CH₂, C2''-CH₂, C4-CH₂; 5,4 (d, 1H); αCH; 6,6 (br s, 2H); gua NH₂; 7,73 (s, 1H); guaH8; 12,4 (br s).

¹³C NMR (CHCl₃) δ 13,9 (C18); 17,5/18,9 (2 Val CH₃); 22,4 (C17); 24,7 (C3); 28,1 (C3');
28,9–29,3 (C4–6, C15); 29,4 (C7–14); 30,7 (Val pc); 31,7 (C16); 34,0 (C2); 35,9 (C2'); 43,9

(C1'); 58,7 (Val ceC); 61,4/63,6 (C4', C2''); 79,9 (CMe3); 116,4 (guaCS); 137,9 (guaC7); 151,7 (guaC4); 153,7 (guaC2); 155,7 (CONH); 158,8 (guaC6); 172,1 (CHCOO); 173,5 (CH₂COO).

c) (R)-9-[2-(L-valyloxymethyl)-4-(stearoyloxy)butyl]-guanin.

5

Ochlazená kyselina trifluoroctová (2,0 g) byla přidána do (R)-9-[2-(N-Boc-L-valyloxymethyl)-4-(stearoyloxy)butyl]guaninu (180 mg; 0,25 mmol) a roztok byl udržován při teplotě okolí po dobu 1 hodiny, odpařen na malý objem a lyofilizován opakovaně s dioxanem dokud nebyl získán bílý amorfni prášek. Výtěžek sloučeniny z názvu, získané jako trifluoracetátová sůl, byl kvantitativní.

10

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 0,87 (t, 3H) 18-CN3, 0,98 (dd, 6H) CH(CH₃)₂; 1,25 (s, 28H), 4-17-CH₂; 1,50 (qui, 2H) 3-CH₂; 1,68 (qua, 2H); 3'-CH₂; 2,19 (m, 1H) 2'-CH; 2,26 (t, 2H); 2-CH₂; 2,40 (m, 1H) CH(CH₃)₂; 3,9-4,25 (m, 7H) C1'-CH₂, C2''-CH₂, OCH; 6,5 (br s, 2H) guaNH₂; 7,79 (s, 1H) guaH8; 8,37 (br s, 3H) NH₃⁺; 10,73 (br s, 1H) guaNH.

15

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ. 14,2 (C18); 17,9/18,3 (s Val CH₃); 22,3 (C17); 24,6 (C3); 27,7 (C3'); 28,7-29,1 (C4-6, C15); 29,2 (C7-14); 29,5 (Val βC); 31,5 (C16); 33,7 (C2); 35,0 (C2'); 44,1 (C1'); 57,6 (Val αC); 61,6/65,2 (C4',C2''); 116,1 (guaC5); 116,3 (qua, J 290Hz, CF₃); 137,9 (guaC7); 151,5 (guaC4); 154,0 (guaC2); 156,7 (guaC6); 158,3 (gua, J 15Hz, CF₃COO) 169,1 (CHCOO); 173,1 (CH₂COO).

20

Příklad 18

25

Alternativní příprava (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(stearoyloxy)butyl]guaninu

H2G (7,60 g, 30 mmol) byl zahříván v roztoku v bezvodém DMF (200 ml). Roztok byl filtrován, aby byly odstraněny nečistoty pevné látky, ochlazen na teplotu 20 °C (H2G krystalizoval) a míchán při této teplotě po dobu přidávání pyridinu (9,0 g, 114 mmol), 4-domethylamino-pyridinu (0,46 g, 3,75 mmol) a potom, pomalu, stearoylchloridu (20,0 g, 66 mmol). Míchání pokračovalo při teplotě okolí přes noc. Většina rozpouštědla byla potom odpařena ve vakuu, residuum bylo mícháno s 200 ml ethylacetát a 200 ml vody a pevná látka byla odfiltrována, promývána ethylacetátem a vodou a sušena, což dalo surový produkt. Jako alternativa k rekrystalizaci, surový produkt byl rychle zahřát téměř na teplotu varu s 100 ml směsí ethylacetát:methanol:voda (15:2:1) a suspence byla pomalu ochlazená na teplotu 30 °C a filtrována, což dalo většinu 2'' izomeru v roztoku (2'' izomer by krystalizoval při nižší teplotě). Extrakční procedura potom byla opakována ještě jednou, což dalo po sušení ve vakuu 6,57 g (42%) produktu takřka prostého izomerů.

40

Příklad 19

Příprava krystalického (R)-9-[2-stearoyloxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl]guaninu

45

Produkt Příkladu 16, krok c) (20,07 g, 32,5 mmol) byl rozpuštěn v absolutním ethanolu (400 ml) s ohříváním, filtrováním a dále ředěn ethanollem (117,5 ml). Do tohoto roztoku byla přidána voda (HPLC kvalita, 103,5 ml) a směs byla ponechána ochladnout na teplotu 35 až 40 °C. Po ochlazení směsi byla přidána voda (HPLC kvalita, 931,5 ml) s konstantním přítokem v průběhu 16 hodin s účinným mícháním. Po přidání veškeré vody míchání pokračovalo po dobu 4 hodin při teplotě okolí. Vzniklý precipitát byl filtrován přes papír a sušen ve vakuu při teplotě okolí, což dalo sloučeninu z názvu jako bílý sypký krystalický prášek (19,42 g, 97%), teplota tání 169 až 170 °C.

50

Příklad 20

9-R-(4-hydroxy-2-(L-valyloxymethyl)butyl)guanin

- 5 a) Do roztoku 9-R-(4-(*tert.*-butyldifenylsilyloxy)-2-(hydroxymethyl)butyl)guaninu (695 mg, 1,5 mmol) v DMF (30 ml) byl přidán N-Boc-L-valin (488 mg, 2,25 mmol), 4-dimethylamino pyridin (30 mg, 0,25 mmol) a DCC (556 mg, 2,7 mmol). Po 16 hodinách byl do reakční směsi znovu vložen N-Boc-L-valin (244 mg) a DCC (278 mg) a reakce byla udržována po dobu
- 10 dalších 5 hodin. Reakční směs byla filtrována přes Celite a vlita na vodný roztok kyselého uhličitanu sodného a potom byla extrahována dichlormethanem. Organická fáze byla odpařena a čištěna chromatografií na koloně silikagelu, což bylo 950 mg N-chráněného monoamino acylovaného meziprojektu.
- 15 b) Výše uvedený meziprojekt (520 mg, 0,78 mmol) byl rozpuštěn v THF (15 ml). Do roztoku byl přidán hydrogenfluorid v pyridinu (70 % / 30 %, 0,34 ml). Po dvou dnech byl roztok odpařen a společně odpařen s toluenem. Čištění chromatografií na koloně silikagelu dalo 311 mg chráněné monoamino acylované sloučeniny.
- 20 ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 10,41 (s, 1H), 7,59 (1H), 6,26 (br s, 2H), 4,32 (t, 1H), 3,95 (m, 5H), 3,46 (m, 2H), 2,41 (m, 1H), 2,06 (m, 1H), 1,45 (m, 2H), 1,39 (s, 9H), 0,90 (d, 6H).
- c) Na produkt kroku b) (95 mg, 0,21 mol) bylo působeno směsí kyseliny trifluoroctové (4 ml) a dichlormethanu (6 ml) po dobu 1 hodiny. Roztok byl odpařen a sušen vymražením, což dalo
- 25 125 mg nechráněného monoaminoacylového produktu.
- ¹H-NMR (D₂O): δ 8,88 (s, 1H), 4,32 (m, 4H), 3,96 (d, 1H), 3,68 (m, 2H), 2,63 (m, 1H), 2,22 (m, 1H), 1,73 (m, 2H), 1,00 (m, 6H).

30

Příklad 21

(R)-9-(2-hydroxymethyl-4-(L-izoleucyloxy)butyl)guanin

- 35 a) Do roztoku (R)-9-(2-hydroxymethyl-4-hydroxybutyl)-guaninu (2,53 g, 10 mmol) v DMF (250 ml) byl přidán N-Boc-L-izoleucin (2,77 g, 12 mmol), 4-dimethylaminopyridin (61 mg, 0,6 mmol) a DCC (3,7 g, 18 mmol). Po reakci po 16 hodin při teplotě 0 °C byly znovu přidány N-Boc-L-izoleucin (1,3 g) a DCC (1,8 g) a reakce byla udržována přes noc při teplotě okolí. Reakční směs byla filtrována přes Celite a filtrát byl odpařen a čištěn chromatografií na koloně
- 40 silikagelu, což dalo 1,25 g N-chráněného monoamino acylovaného meziprojektu.
- ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 10,56 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 6,43 (s, 2H), 4,75 (t, 1H), 4,15 – 3,80 (m, 5 H), 3,25 (m, 2H), 2,05 (m, 1H), 1,80–1,05 (m, 14H), 0,88 (m, 6H).
- 45 b) Na meziprojekt z kroku a) (100 mg, 0,21 mmol) bylo působeno kyselinou trifluoroctovou (3 ml) po dobu 30 minut při teplotě 0 °C. Roztok byl odpařen a sušen vymražením, což dalo nechráněný mono-aminoacylovaný produkt z názvu v kvantitativním výtěžku.
- ¹H-NMR (DMSO-d₆ + D₂O): δ 8,72 (s, 1H), 4,15 (m, 4H), 3,90 (d, 1H), 3,42 (m, 2H), 2,09 (m, 1H), 1,83 (m, 1H), 1,61 (m, 2H), 1,15 (m, H), 0,77 (d, 3H), 0,71 (t, 3H).
- 50

Příklad 22

(R)-9-(2-hydroxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl]guanin

- 5 Produkt Příkladu 1, krok a) byl zbaven ochrany kyselinou trifluoroctovou stejným způsobem jako v Příkladu 1, krok c)

10 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ 1,04 (dd, 6H), 1,55–1,88 (m, 2H), 2,21 (m, 2H), 3,48 (m, 2H), 4,00 (m, 1H), 4,13 (m, 2H), 4,34 (t, 2H), 6,9 (br s, 2H), 8,21 (s, 1H), 8,5 (br s, 3H), 11,1 (br s, 1H).

Příklad 23

- 15 (R)-9-[2-(L-valyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin

a) (R)-9-[4-(N-Boc-L-valyloxy)-2-(N-Boc-L-valyloxymethyl)butyl]guanin

- 20 Aplikace způsobu popsaného v Příkladu 1, krok a), ale s použitím 2,7 ekvivalentů N-Boc-L-valinu, 0,28 ekvivalentů DMAP a 3,2 ekvivalentů DCC dalo sloučeninu z názvu.

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CHCl_3) δ : 0,95 (m, 12H), 1,42 (br s, 18H), 1,8 (m, 2H), 2,14 (m, 2), 2,47 (m, 1H), 4,0–4,4 (m, 8H), 6,5 (br s, 2H), 7,67 (s, 1H).

- 25 b) (R)-[4-(L-valyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin

Sloučenina z názvu byla získána jako tris-trifluoroctová sůl z meziprojektu Příkladu 20 krok a) zbavením ochranných skupin způsobem analogickým Příkladu 1 krok c).

- 30 $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, D_2O) δ : 1,0 (m, 12H), 1,89 (m, 2H), 2,29 (m, 2H), 2,62 (m, 1H), 4,02 (dd, 2H), 4,38 (m, 6H), 4,89 (br s, ca, 10H), 8,98 (s, 1H).

Příklad 24

- 35 (R)-9-[4-hydroxy-2-(stearoyloxymethyl)butyl]guanin

Sloučenina z názvu je připravena podle kroků a) až c) Příkladu 7.

- 40 $^1\text{H NMR}$ (250 Mhz, DMSO-d_6): δ 10,52 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 6,39 (s, 2H), 5,50 (t, 1H), 3,93 (m, 4H), 3,42 (m, 2H), 2,45 (m, 1H), 2,23 (t, 2H), 1,48 (m, 4H), 1,22 (s, 28H), 0,89 (t, 3H).

Příklad 25

- 45 (R)-9-[2-hydroxymethyl-4-(stearoyloxy)butyl]guanin

Sloučenina z názvu je připravena způsobem podle Příkladu 17, krok a)

- 50 $^1\text{HNMR}$ (DMSO-d_6) δ : 0,86 (t, 3H); 1,25 (s, 28H); 1,51 (qui, 2H); 1,62 (m, 2H); 2,06 (m, 1H); 2,23 (t, 2H); 3,34 (d, 2H); 3,96 (ABX, 2H); 4,07 (dd, 2H); 6,30 (br s., 2H); 7,762 (s, 1H); 10,45 (s, 1H).

Příklad 26

Alternativní příprava (R)-9-12-stearoyloxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl]guaninu

- 5 a) (R)-9-[4-N-benzyloxykarbonyl-L-valyloxy)-2-(hydroxymethyl)-butyl]guanin

Bezvodý H₂G (252 mg, 1 mmol), 4-dimethylaminopyridin (122 mg, 1 mmol) a N-Cbz-L-valin p-nitrofenylový ester (408 mg, 1,1 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém dimethylformamidu (16 ml). Po míchání při teplotě 23 °C po dobu 30 hodin bylo odebráno organické rozpouštědlo a residuum
 10 bylo opatrně chromatografováno (oxid křemičitý, 2% až 7% methanol/methylenchlorid) což dalo požadovaný produkt jako bílou pevnou látku (151 mg, 31%).

- b) (R)-9-[4-N-benzyloxykarbonyl-L-valyloxy)-2-(stearoyloxymethyl)butyl]guanin

15 Roztok stearoylochloridu (394 mg, 1,3 mmol) v bezvodém methylenchloridu (2 ml) byl pomalu přidán po kapkách pod dusíkovou atmosférou do roztoku produktu kroku a) (243 mg, 1 mmol) a 4-dimethylaminopyridinu (20 mg) v bezvodém pyridinu (5 ml) při teplotě -5 °C. Reakční směs byla míchána při této teplotě po dobu 12 hodin. Byl přidán methanol (5 ml) a reakční směs byla míchána po dobu 1 hodiny. Po odstranění rozpouštědla bylo residuum rozetřeno s acetonitrilem
 20 a chromatografováno (oxid křemičitý, 0 až 5% methanol/methylenchlorid), což dalo požadovaný produkt (542 mg, 72%).

- c) (R)-9-[2-stearoyloxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl]guanin

25 Produkt kroku b) (490 mg, 1 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (30 ml) a bylo přidáno 5 % Pd/C (100 mg). Na horní části reakční nádoby byl umístěn balón s vodíkem. Po 6 hodinách při teplotě 23 °C TLC prokázala nepřítomnost výchozího materiálu. Reakční směs byla filtrována přes 0,45 mikronů silnou nylonovou membránu, aby byl odstraněn katalyzátor a rozpouštědlo bylo odstraněno, aby se získal požadovaný produkt jako bílá pevná látka (350 mg, 99%), která byl
 30 identická (spektrální a analytická data) látce z Příkladu 16.

Příklad 27

- 35 Alternativní příprava (R)-9-(4-hydroxy-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guaninu

(R)-9-(4-(L-valyloxy)-2-(L-valyloxymethyl)butyl]guanin z Příkladu 23 krok b) (100 mg, 0,126 mmol) byl rozpuštěn v 0,1 N NaOH vodném roztoku (6,3 ml, 0,63 mmol) při teplotě okolí. V intervalech byly odebírány alikvoty a neutralizovány 0,5 N kyselinou trifluoroctovou, odpařeny a analyzovány pomocí HPLC, aby byl monitorován postup reakce. Po 4 hodinách byl
 40 do roztoku přidán roztok 0,5 N kyseliny trifluoroctové (1,26 ml, 0,63 mmol) a reakční směs byla odpařena. Požadovaný produkt byl čištěn pomocí HPLC, (YMC, 50 x 4,6 mm, gradient 0,1% TFA + 0 až 50 % 0,1% TFA v acetonitril, po 20 minutách, UV detekce při 254 nm. Výtěžek. 13,6 %

45 ¹H-NMR (D₂O): δ 8,81 (s, 1H), 4,36 (m, 4H), 4,01 (d, 1H), 3,74 (m, 2H), 2,64 (m, 1H), 2,25 (m, 1H), 1,73 (m, 2H), 1,03 (dd, 6H).

Příklad 28

Alternativní příprava (R)-9-(2-hydroxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl)guaninu

- 5 HPLC separace reakčního roztoku z Příkladu 27 dala sloučeninu z názvu s 29,2% výtěžkem.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 8,38 (s, 3H), 8,26 (s, 1H), 6,83 (br s, 2H), 4,23 (m, 2H), 4,06 (m, 2H), 3,91 (m, 1H), 3,40 (m, 2H), 2,19 (m, 2H), 1,8–1,40 (m, 2H), 0,95 (dd, 6H).

10

Příklad 29

(R)-9-[2-stearoyloxymethyl]-4-(L-valyloxy)]butylguanin monohydrochlorid

- 15 Produkt Příkladu 16, krok d) (360 mg, 0,479 mmol) byl rozpuštěn ve směsi methanolu (10 ml) a ethylacetátu (10 ml). Do roztoku bylo přidáno 10% Pd/C (100 mg) a 1N HCl (520 mikrolitrů). Reakční směs byla míchána při teplotě okolí po dobu 2 hodin pod 1 atm. H_2 . Reakční směs byla filtrována a rozpouštědlo bylo odpařeno z filtrátu, což přineslo požadovaný produkt jako krystalickou pevnou látku (300 mg).

20

Příklad přípravku A

Tablety

25

Následující přísady byly prosívány 0,15 mm sítím a míchány za sucha

- 10 g (R)-9-[2-(stearoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin
40 g laktóza
30 49 g krystalická celulóza
1 g stearan hořečnatý

Byl použit tabletovací stroj pro lisování směsi na tablety obsahující 250 mg aktivní složky.

35

Příklad přípravku B

Potahované tablety

- 40 Tablety podle Příkladu A byly pokryty roztokem, obsahujícím 120 g ethylcelulózy

30 g propylenglykolu
10 g sorbitan monooleátu
ad 1000 ml aq. dist.

45

Příklad přípravku C

Přípravek se zpožděným uvolňováním

50

50 g (R)-9-[2-(stearoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin
12 g hydroxypropylmethylcelulóza (Methocel K15)
4,5 g laktóza

byly smíchány za sucha a granulovány s vodnou pastou povidonu. Byl přidán stearan hořečnatý (0,5 g) a směs byla komprimována v tabletovacím stroji na tablety o průměru 13 mm, obsahující 500 mg aktivního činidla.

5

Příklad přípravku D

Měkké kapsle

- 10 250 g (R)-9-[2-(stearoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guaninu
100 g lecitinu
100 g podzemnicového oleje

- 15 Sloučenina podle vynálezu byla dispergována v lecitinu a podzemnicovém oleji a plněna do měkkých želatinových kapslí.

Biologický příklad 1

- 20 Testování biologické dostupnosti u krys

- Biologická dostupnost sloučenin podle vynálezu byla porovnána se základní sloučeninou H₂G a dalšími H₂G deriváty v krysím modelu. Sloučeniny podle vynálezu a srovnávané sloučeniny byly podávány perorálně (katetr do žaludku), skupinám tří individuálně vážených zvířat, což dalo
25 0,1 mmol/kg rozpuštěného prekursoru ve vodném vehiklu (Příklad 4,5, Srovnávací příklad 1-3,5,8), vehikulu z podzemnicového oleje (Srovnávací příklady 4,9,10) nebo propylenglykolu (Příklady 1-3,6-12,17, Srovnávací příklady 6,7) v závislosti na rozpustnosti složky, představované testovanou sloučeninou. Zvířata byla nechána hladovět 5 hodin před podáváním a přibližně 17 hodin po podávání a byla udržována v metabolických klecích. V průběhu 24 hodin
30 po podávání byla shromažďována moč, který byla zmrazena až do analýzy. H₂G byl v moči analyzován použitím HPLC/UV testu podle Stahle & Oberg, Antimikrob Agents Chemother. 36 NO 2, 339-342 (1992), modifikovaného následujícím způsobem: vzorky po zmrazení byly zředěny 1:100 destilovanou H₂O a filtrovány přes amiconový filtr za centrifugace při
35 3000 ot./min po dobu 10 minut. Duplikované vzorky 30 µl byly chromatografovány na HPLC koloně; Zorbax SB-C18; 75 x 4,5 mm; 3,5 mikronů; mobilní fáze 0,05M NH₄PO₄, 3 až 4% methanol, pH 3,3 až 3,5; 0,5 ml/min; 254 nm, retenční doba pro H₂G v MeOH 4% a PH 3,3, ~ 12,5 min. Biologická dostupnost byla vypočtena jako měřený odběr H₂G od každého zvířete s vytvořením průměru podle alespoň tří zvířat a vyjádřením v procentech středního 24 hodinového odběru H₂G z moči pro skupiny 4 individuálně vážených krys, kterých byla
40 podána injekce i.v. jugularis 0,1 mmol/kg H₂G v Kruherově pufru jako vehikulu, analyzovaného jako bylo uvedeno výše.

- Srovnávací příklad 1 (H₂G) byl z téže dávky, která byla použita pro přípravu Příkladů 1 až 12. Přípravy pro Srovnávací příklad 2 (monoVal-H₂G) a 3 (diVal-H₂G) jsou popsány v Příkladech 21 až 23. Srovnávací příklad 4 (distearoyl H₂G) byl připraven diesterifikací nechráněného H₂G ve
45 srovnatelných esterifikačních podmínkách s podmínkami kroku 2 Příkladu 1. Srovnávací příklad 5 až 8 (Val/Ac H₂G) byly připraveny analogicky Příkladu 4 použitím acethanhydridu s odpovídajícím monovalinovým H₂G. Srovnávací příklad 6 (Ala/stearoyl H₂G) byl připraven analogicky příkladu 6 s použitím N-terc.Boc-L-alaninu v kroku 4. Srovnávací příklad 7 (Gly/dekanoyl) byl připraven analogicky Příkladu 5, ale použitím meziprojektu kroku 1
50 vytvořeného s N-terc.-Boc-L-glycinem. Příprava Srovnávacího příkladu 9 a 10 je popsána v příkladech 24, respektive 25. Výsledky podává následující tabulka:

Tabulka 2

Sloučenina	R ₁	R ₂	biologická dostupnost
Srovnávací příklad 1	atom vodíku	atom vodíku	8 %
Srovnávací příklad 2	valyl	atom vodíku	29 %
Srovnávací příkladu 3	valyl	valyl	36 %
Příklad 1	valyl	stearoyl	56 %
Srovnávací příklad 4	stearoyl	stearoyl	1 %
Příklad 2	valyl	myristoyl	57 %
Příklad 3	valyl	oleoyl	51 %
Příklad 4	valyl	butyryl	45 %
Srovnávací příklad 5	valyl	acetyl	11 %
Příklad 5	valyl	dekanoyl	48 %
Příklad 6	valyl	dokosanoyl	48 %
Příklad 7	izoleucyl	stearoyl	53 %
Příklad 8	izoleucyl	dekanoyl	57 %
Příklad 9	izoleucyl	myristoyl	49 %
Příklad 10	valyl	4-acetylbutyryl	52 %
Příklad 11	valyl	dodekanoyl	46 %
Příklad 12	valyl	palmitoyl	58 %
Příklad 17	stearoyl	valyl	52 %
Srovnávací příklad 6	alanyl	stearoyl	23 %
Srovnávací příklad 7	glycyl	dekanoyl	25 %
Srovnávací příklad 8	acetyl	valyl	7 %
Srovnávací příklad 9	atom vodíku	stearoyl	12 %
Srovnávací příklad 10	stearoyl	atom vodíku	7 %

5 Porovnání biologických dostupností sloučenin podle vynálezu se srovnávacími příklady indikuje, že konkrétní kombinace mastných kyselin v R₁/R₂ s aminokyselinami v R₁/R₂ přináší biologickou dostupnost významně vyšší než v odpovídajícího diaminokyselinového esteru nebo diesteru mastné kyseliny.

10 Například, v tomto modelu, sloučenina podle Příkladu 1 vykazuje o 55 % lepší biologickou dostupnost než odpovídající divalínový ester Srovnávacího příkladu 3. Sloučenina Příkladu 4 vykazuje o 25 % lepší dostupnost než odpovídající divalínový ester.

15 Je také zřejmé, například ze Srovnávacích příkladů 5, 6 a 7, že pouze specifické mastné kyseliny podle předkládaného vynálezu v kombinaci se specifickými aminokyselinami přináší tyto dramatické a neočekávané změny farmakokinetických parametrů.

Biologický příklad 2

20 Plasmové koncentrace u krysy

25 Test plasmové koncentrace byl proveden se samci krysy odvozených od Sprague Dawley. Zvířata byla ponechána hladovět přes noc před dávkováním, aby jim byl dán volný přístup k vodě. Každá z hodnocených sloučenin byla připravena jako roztok/suspense v propylenglykolu v koncentraci odpovídající 10 mg H₂G/ml a třepána při teplotě okolí po dobu osm hodin. Skupiny krysy (alespoň 4 krysy v každé skupině) dostaly 10mg/kg (1 ml/kg) orální dávku každé sloučeniny; dávky byly podávány žaludeční sondou. V určených okamžicích po dávkování (0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 9, 12, 15 a 24 hodin po dávkování), byly z ocasní žíly každého zvířete odebrány heparinizované krevní vzorky (0,4 ml/vzorek). Krevní vzorky byly okamžitě ochlazeny v ledové 30 lázni. Do dvou hodin po odebrání byla z červených buněk separována centrifugací plasma, která

byla až do analýzy zmrazena. Složky, kterých se analýza týkala, byla separována z plasmových proteinů použitím acetonitrilové precipitace. Po lyofilizaci a rekonstituci byly určeny plasmové koncentrace reverzní fázovou HPLC s fluorescenční detekcí. Orální příjem H2G a dalších testovaných sloučenin byl určen porovnáním H2G oblasti pod křivkou, odvozenou z orálních dávek ve srovnání s oblastí získané z 10 mg/kg intravenózních dávek H2G, podávaných oddělené skupině krys. Výsledky jsou znázorněny v Tabulce 1B uvedené výše.

Biologický příklad 3

Biologická dostupnost u opic

Sloučeniny z příkladu 1 a Srovnávacího příkladu 3 (viz Biologický příklad 1 uvedený výše) byla podáván p.o. žaludeční sondou opicím *cynomolgus*. Roztoky obsahovaly:

Příklad 1

150 mg, rozpuštěného v 6,0 ml propylenglykolu, odpovídající 25 mg/kg nebo 0,0295 mmol/kg.

Srovnávací příklad 3

164 mg, rozpuštěno v 7,0 ml vody, odpovídající 23,4 mg/kg nebo 0,0295 mmol/kg.

Krevní vzorky byly odebrány po 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 10 a 24 hodinách. Plasma byla separována centrifugací při 2500 ot./min a vzorky byly inaktivovány při teplotě 54 °C v průběhu 20 hodin před zmrazením před analýzou. Plasmové hladiny H2G byly monitorovány pomocí HPLC/UV testu podle Příkladu 30 uvedeného výše.

Obr. 1 znázorňuje plasmový H2G odběr jako funkci času. I když není možno vyvozovat statisticky významné závěry z pokusu s jedním zvířetem, ukazuje se, že zvíře, kterému byla podávána sloučenina podle vynálezu vykazovalo poněkud rychlejší a poněkud vyšší expozici H2G než zvíře, které dostalo alternativní prekurzor H2G.

Biologický příklad 4

Antivirální účinnost

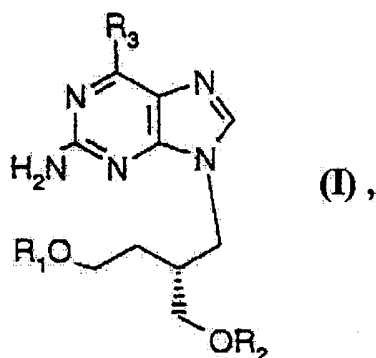
Myši infikované virem-1 herpes simplex (HSV-1) sloužily jako zvířecí model pro určování účinnosti antivirálních činidel *in vivo*. Myším naočkovaným intraperitoneálně HSV-1 v množství 1000 krát vyšším než LD₅₀ byl podáván buďto přípravek obsahující běžně prodávané anti-herpes činidlo acyklovir (21 a 83 mg/kg v 2% propylenglykolu v sterilním vodném vehikulu, třikrát denně, p.o.) v průběhu 5 po sobě následujících dní, počínaje 5 hodin po očkování. Denně byla sledována úmrtnost zvířat. Výsledky jsou znázorněny na obr. 2, který znázorňuje počet přežití v závislosti na čase. V legendě je sloučenina podle vynálezu označena jako Ex, 29 a acyklovir je označen ACV. Procento myší, přežívajících HSV-1 infekci byl významně vyšší po podání dávky sloučeniny podle vynálezu ve srovnání s ekvivalentní dávkou acykloviru.

Předcházející popis je pouhou ilustrací vynálezu a není jeho cílem omezovat zde popisovaný vynález. Odborníkovi jsou zřejmé změny a variace, které zůstávají v rozsahu a povaze vynálezu, tak, jak je definován v přiložených nárocích.

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Sloučenina obecného vzorce I



ve kterém

10 a) R_1 představuje skupinu $-C(O)CH(CH(CH_3)_2)NH_2$ nebo $-C(O)CH(CH(CH_3)CH_2CH_3)NH_2$ a R_2 představuje $-C(O)C_3-C_{21}$ alkyl nebo alkenyl, popřípadě substituované jednou až pěti skupinami vybranými ze souboru, zahrnujícího hydroxylovou skupinu C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkoxy, C_1-C_6 alkoxy- C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkanoyl, skupinu amino, atom halogenu, skupinu kyano, azido, oxo, merkpto a nitro, nebo

15 b) R_1 představuje $-C(O)C_3-C_{21}$ alkyl nebo alkenyl, popřípadě substituované jednou až pěti skupinami vybranými ze souboru, zahrnujícího hydroxylovou skupinu, C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkoxy, C_1-C_6 alkoxy- C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkanoyl, skupinu amino, atom halogenu, skupinu kyano, azido, oxo, mekapto a nitro

20 a R_2 představuje skupinu $-C(O)CH(CH(CH_3)_2)NH_2$ nebo $-C(O)CH(CH(CH_3)CH_2CH_3)NH_2$; a

R_3 představuje skupinu $-OH$ nebo její tautomerní formu $=O$ a nebo atom vodíku;

25 a její farmaceuticky přijatelné soli.

2. Sloučenina podle nároku 1, obecného vzorce I ve kterém substituent

R_1 představuje skupinu $-C(O)CH(CH(CH_3)_2)NH_2$ nebo $-C(O)CH(CH(CH_3)CH_2CH_3)NH_2$ a

30 R_2 představuje $-C(O)C_3-C_{21}$ alkyl nebo mononenasycený alkenyl, popřípadě substituované jednou až pěti skupinami vybranými ze souboru, zahrnujícího hydroxylovou skupinu, C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkoxy, C_1-C_6 alkoxy- C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkanoyl, skupinu amino, atom halogenu, skupinu kyano, azido, oxo, merkpto a nitro.

35 3. Sloučenina podle nároku 1, obecného vzorce I ve kterém $-C(O)$ alkyl zahrnuje 9 až 17 atomů uhlíku.

40 4. Sloučenina podle nároku 1, obecného vzorce I ve kterém R_3 je skupina $-OH$ nebo její tautomerní forma $=O$.

5. Sloučenina podle nároku 1, zvolená ze souboru zahrnujícího

- (R)-9-[2-(stearoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-(myristoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
 5 (R)-9-[2-(oleoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-(butyryloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-(dekanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-(dokosanoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
 10 (R)-9-[2-(dekanoyloxymethyl)-4-(L-izoleucyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[4-(L-izoleucyloxy)-2-(myristoyloxymethyl)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-(4-acetylbutyryloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl],
 (R)-9-[2-dodekanoyloxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
 (R)-9-[2-palmitoyloxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl]guanin,
 15 (R)-2-amino-9-(2-stearoyloxymethyl-4-(L-valyloxy)butyl)-purin,
 (R)-9-[2-(L-valyloxymethyl)-4-(stearoyloxy)butyl]guanin

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.

- 20 6. (R)-9-[2-(stearoyloxymethyl)-4-(L-valyloxy)butyl]guanin podle nároku 1 nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

7. Farmaceutická kompozice, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje sloučeninu podle nároků 1 až 6 spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

- 25 8. Farmaceutická kompozice podle nároku 7, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje sloučeninu podle nároku 5 spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

9. Farmaceutická kompozice podle nároku 7, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje sloučeninu podle nároku 6 spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

10. Použití sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 pro přípravu léčiva k léčení nebo prevenci virálních infekcí.

- 35 11. Použití podle nároku 10 sloučeniny obecného vzorce I pro přípravu léčiva k léčení nebo prevenci herpes infekcí zahrnujících infekci virem Varicella zoster, virem Herpes simplex typu 1 a 2, virem Epstein-Barr nebo virem Herpes typ 6 (HHV-6) a typ 8 (HHV-8).

- 40 12. Použití podle nároku 10 sloučeniny obecného vzorce I pro přípravu léčiva k léčení nebo prevenci retrovirálních infekcí zahrnujících SIV, HIV-1 a HIV-2.

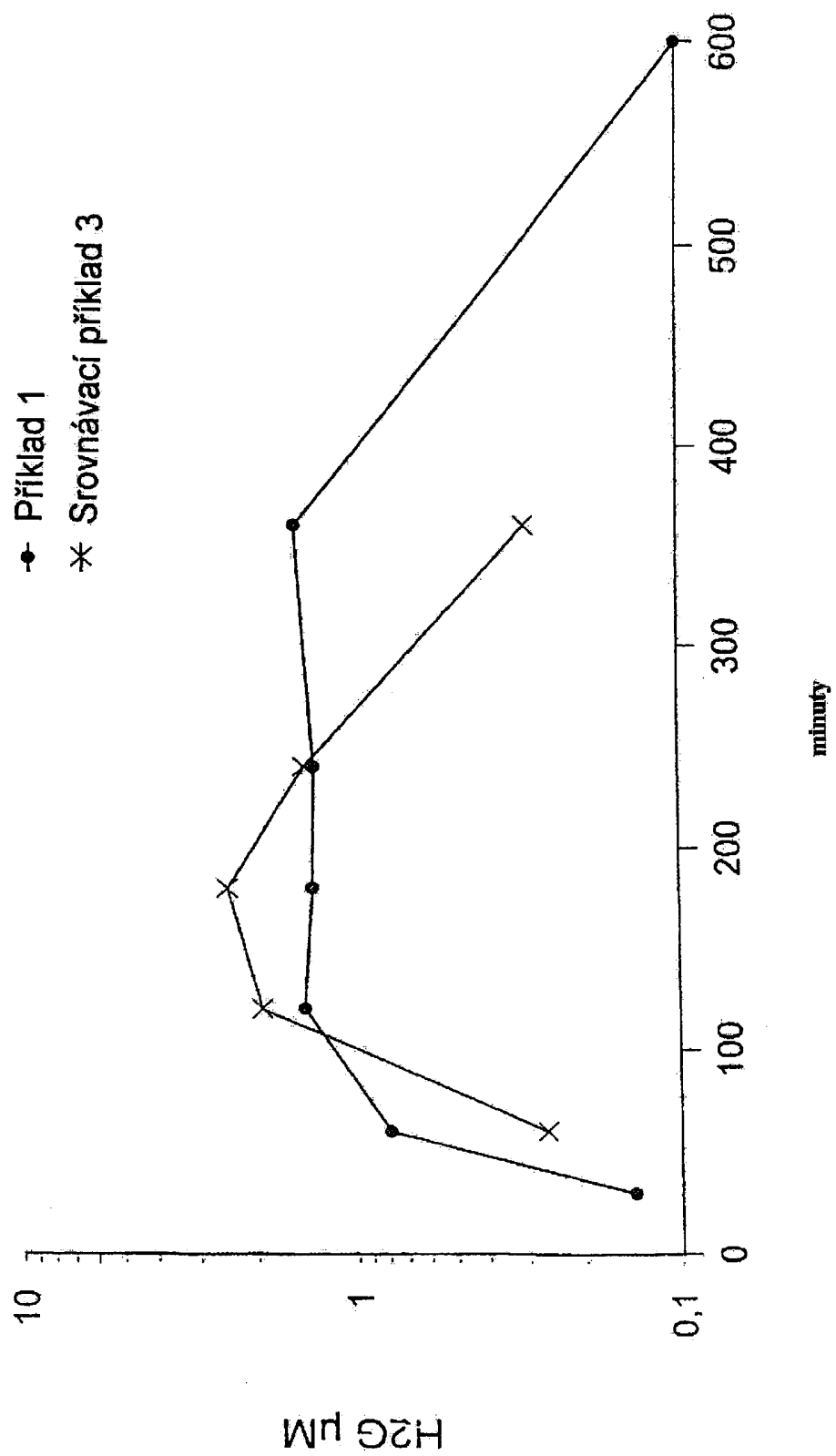
13. Způsob přípravy sloučeniny vzorce I podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se

- 45 a) případně chrání purinové polohy 2 a/nebo 6 sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém R₁ a R₂ jsou každý atom vodíku, a R₃ má význam uvedený v nároku 1, N-ochrannou skupinou;
- b) místně selektivně acyluje sloučenina obecného vzorce I v 4-hydroxy skupině postranního řetězce buď
- 50 i) popřípadě N-chráněnou valinovou nebo izoleucinovou skupinou, nebo
- ii) popřípadě substituovaným, (C₃-C₂₁)alkyl nebo alkeny-COOH derivátem
- iii) místně selektivní ochrannou skupinou;

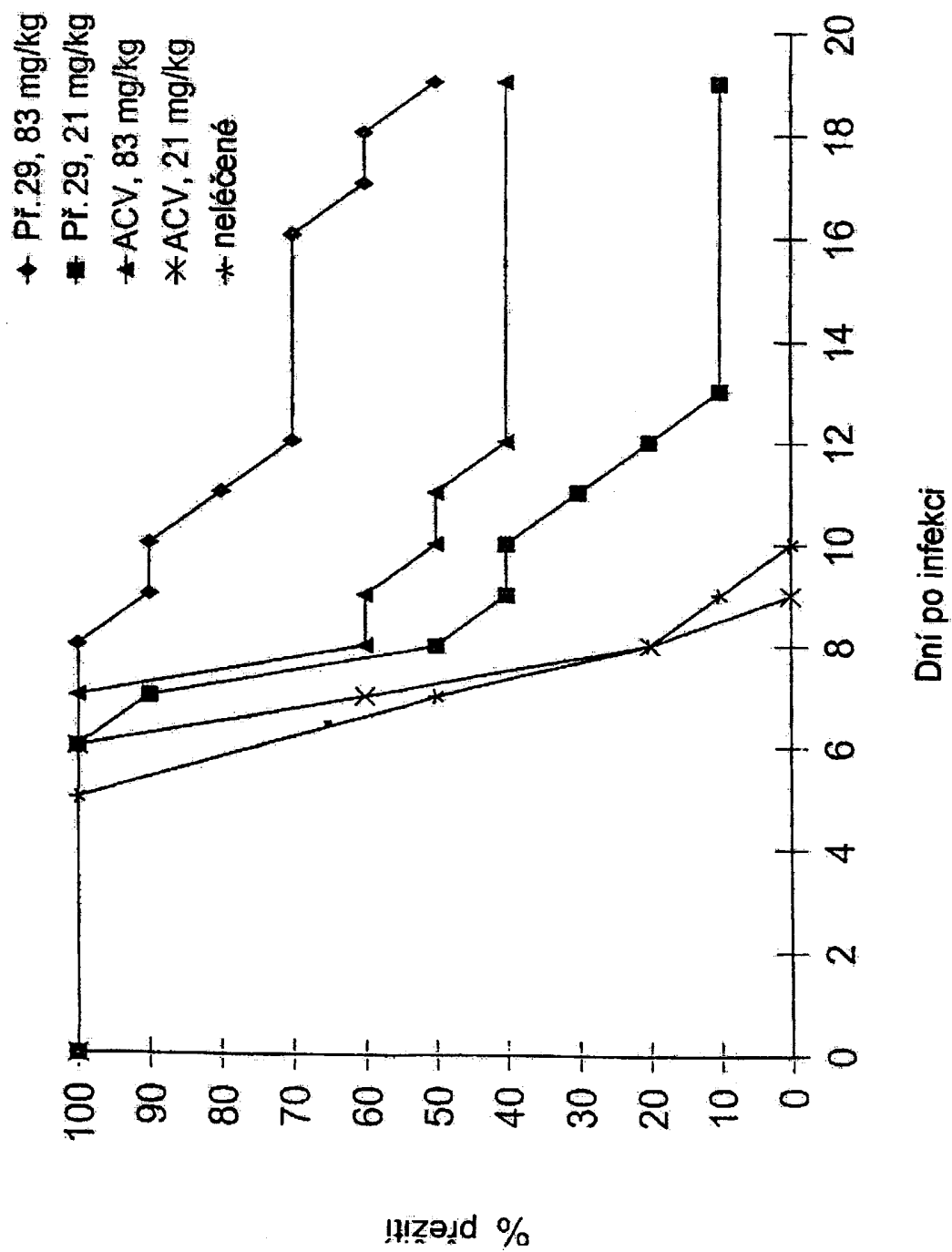
- 5
- c) acyluje 2-hydroxymethyl skupiny v postranním řetězci
- i) popřípadě N-chráněnou valinovou nebo izoleucinovou skupinou, nebo
- ii) popřípadě substituovaným, (C₃-C₂₁)alkyl nebo alkenyl-COOH derivátem
- d) nahradí místně selektivní ochranná skupina v R₁, pokud je přítomna,
- 10 i) popřípadě N-chráněnou valinovou nebo izoleucinovou skupinou; nebo
- ii) popřípadě substituovaným, (C₃-C₂₁)alkyl nebo alkenyl-COOH derivátem.
- 15 e) zbaví výsledná sloučenina ochranných skupin v případě potřeby.

20 2 výkresy

Obr. 1



Obr. 2



Konec dokumentu