



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 199 093

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 20 10 77
(21) PV 6839-77

(11) (B1)

(51) Int. Cl. C 07 D 473/34

(40) Zveřejněno 17 09 79
(45) Vydáno 30 09 82

(75)

Autor vynálezu

HOLÝ ANTONÍN RNDr.CSc., PRAHA (ČSSR)

DECLERCQ ERIK prof.dr., LEUVEN (BELGIE)

(54)

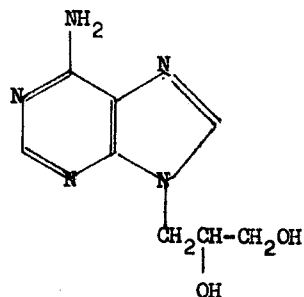
Léčebný prostředek s antivirálním účinkem

1

Některé nukleosidové deriváty, tj. cukerné deriváty heterocyklických sloučenin . vykazují antivirální účinek. Tak např. 9-(β -D-arabinofuranosyl) adenin (v dalších araA) má výraznou účinnost proti DNK-vírům nebo ribavirin (1-(β -D-ribofuranosyl)-1,2,4-triazol-3-karboxamid) má širokou antivirální účinnost na některé RNK- i DNK-viry (Science 177, 705 /1972/; Chemotherapy 21, 505 /1975/.

Náklady na výrobu těchto léčiv vzhledem ke složitosti přípravy jsou značné a jejich použití je značně omezeno úzkým rozsahem koncentrací, v nichž mohou být aplikovány vzhledem k jejich toxicitě a odbourávání v organismu.

Tyto nevýhody odstraňuje léčebný prostředek podle vynálezu, jehož podstatou je, že jako aktivní složku obsahuje (S)- nebo (RS)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenin vzorce I

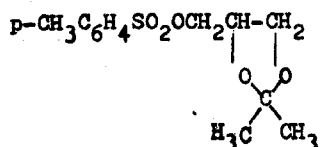


(I).

Účinné netoxické koncentrace aktivní složky jsou od 0,1 mg do 1000 mg/kg živé hmotnosti při jedné dávce, přičemž obsah aktivní složky vzhledem k farmaceutickému nosiči může být v rozsahu 0,1 až 100 % hmotnostních.

Postup přípravy (S)-enantiomeru i racemické (RS)- formy látky vzorce I (v dalším S-DHPA nebo RS-DHPA) je znám.

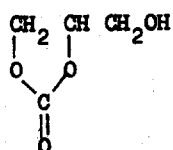
Obě sloučeniny mohou být připraveny reakcí 1-O-p-toluensulfonyl-2,3-O-isopropyliden-D-(nebo -DL-)-glycerinu vzorce II



II.

se sodnou solí adeninu v dimethylformamidu při 100 °C a varem vzniklého meziproductu s 80% kyselinou octovou (Collection Czech. Chem. Commun. 40, 187 /1975/). Tak např. se 11,4 g (40 mmol) látky vzorce II a 7,8 g sodné soli adeninu (50 mmol) zahřívá v dimethylformamidu (100 ml) 8 hod. na 100 °C, odpaří se ve vakuu a zbytek krystaluje z methanolu. Získaný produkt se vaří 1 h s 80% kyselinou octovou, odpaří ve vakuu, odparek odpaří třikrát s 50 ml ethanolu a zbytek se krystaluje z methanolu. Získá se 50 až 60 % (S)- nebo (RS)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adeninu. (S)-Forma: t.t. 202 až 203 °C $[\alpha]_D^{25} = -35,4^\circ$ (c=1, voda). (RS)-Forma: t.t. 205 až 208 °C. UV-Spektrum (pH 7): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{max}} = 14000$, $\lambda_{\text{min}} = 228 \text{ nm}$.

Podle čs. autorského osvědčení č. 191 656 při kterém se (RS)-forma látky I (RS-DHPA) získá zahříváním adeninu s 1,2-cyklickým karbonátem glycerinu vzorce III



III

a hydroxidem nebo uhličitánem sodným nebo draselným v dimethylformamidu nebo dioxanu při 80 až 140 °C. Tak např. směs adeninu (1,35 g, 10 mmol), glycerin-1,2-cyklického karbonátu (III) (2,0 g), uhličitánu sodného (0,3 g) s dimethylformamidu (25 ml) se zahřívá 1 h ve varu, odpaří ve vakuu a zbytek v 50 ml vroucí vody se odbarví aktivním uhlím. Po odpaření ve vakuu se zbytek krystaluje z methanolu: získá se 60 až 70 % (RS)- formy látky I (RS-DHPA), t.t. 205 až 206 °C, UV-spektrum (voda): $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$,

$\epsilon_{\text{max}} = 14000$. Biologickou účinnost vykazuje výhradně D-glycero- tj. (S)-forma látky vzorce I, kdežto L-glycero-, tj. (R)-forma je zcela neúčinná. Vzhledem k tomu, že racemický (RS)-derivát obsahuje 50 % účinné (S)-formy, je řádově stejně účinný jako (S)-enantiomer. (S)-DHPA vzorce I se vyznačuje vysokou antivirální účinností proti RNK- i DNK-virům a velmi nízkou vlastní toxicitou. Tento účinek je zcela neočekávaný, tím

spíše, že další obdobné sloučeniny, buď deriváty adeninu s jinou alifatickou složkou, např. (RS)-2-hydroxypropyl, 2-hydroxyethyl, 2-aminoethyl, β -DL-alanyl-, (S)-3,4-dihydroxybutyl, (RS)-3,4-dihydroxybutyl, (RS)-threo-2,3,4-trihydroxybutyl, (RS)-3,5-dihydroxypentyl, 3-hydroxypropyl a 1,3-dihydroxy-2-propyl nebo 2,3-dihydroxypropylderiváty jiných heterocyklických basí, např. hypoxanthinu, uracilu, cytosinu a thyminu žádnou významnou antivirální účinnost až do koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$ nevykazují. Z ostatních příbuzných sloučenin má uvedený araA účinek omezený na DNK-viry a uvedený ribavirin je vysoce cytotoxický.

Výhodou předmětného léčiva je jeho značná stálost, která umožňuje sterilizaci neutrálních, slabě kyselých nebo slabě alkalických roztoků za zvýšené teploty, jeho prakticky neomezená stálost v pevném stavu a konečně i jeho dostupnost, zvláště u racemického derivátu (RS)-DHPA.

Další výhodou je jeho poměrně jednoduchá příprava a nízké výrobní náklady. Pro průmyslovou výrobu se jedná o řádově nižší výrobní náklady ve srovnání s přípravou výše uvedených známých antivirálních preparátů.

Farmaceutické preparáty s obsahem (S)-DHPA nebo (RS)-DHPA jako aktivní složky mohou mít formu pudrů, suspenzí, roztoků, sprayů, emulzí, mastí a krémů a mohou být použity pro parenterální (intravenosní, intradermální, intramuskulární, intrathekální ap.) aplikace nebo pro orální, rektální, intravaginální a intranasální podání nebo lokální aplikace (lese kožní, slizniční, oční ap.). Tyto preparáty je možno připravit smíšením nebo rozpuštěním účinné látky nebo účinných látek s farmaceuticky použitelnými nosiči k takovým účelům používanými, např. vodnými nebo nevodnými rozpouštědly, stabilizátory, emulgátory, látkami stabilizujícími suspenze, smáčedly sp., vhodnými aditivy (např. polyethylenglykoly) a v případě potřeby i s barvivy nebo aromatizujícími látkami. Preparáty mohou obsahovat různou koncentraci aktivní složky podle povahy podání a podle povahy onemocnění, nejméně však 0,1 % a nejvýše 100 % hmotnostních.

V dalším je biologická účinnost (S)-DHPA a (RS)-DHPA osvětlena v příkladech, aniž se tím jakkoliv omezuje.

Příklad 1

Antivirální účinnost (S)-DHPA na tkáňových kulturách

Buňky v každé kultuře byly infikovány stonásobkem dávky viru potřebné k infekci 50 % buněk a 1 h po infekci byl přidán (S)-DHPA v koncentraci 0 - 40 $\mu\text{g/ml}$ (v některých případech až 200 $\mu\text{g/ml}$). Pro každou kombinaci hostitelských buněk a viru byla stanovena ID_{50} , tj. koncentrace (S)-DHPA potřebná k 50% potlačení cytopathického účinku viru stanoveného kontrolním pokusem (podle L.J. Rosenthal, I.L. Schechmaister, "Tissue Culture", str. 510, Academic Press, New York 1973). Výsledky těchto pokusů jsou uvedeny v Tabulce 1. Je zřejmé, že některé viry na příklad vakcinie, herpes simplex typu 1 a 2,

spalničky, vesikulární stomatitis jsou vůči (S)-DHPA velmi citlivé, kdežto jiné jako poliomyelitis, Coxsackie, Sindbis nejsou ovlivněny. Inhibiční účinek cytopathogenního působení viru v přítomnosti (S)-DHPA je důsledkem snížení nárůstu viru: souvislé jednovrstevné kultury lidských kožních fibroblastů (HSF-buňky) v Petriho miskách byly očkovány virem vesikulární stomatitidy (VSV-virus) ($4,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}/0,5 \text{ ml/miska}$) a po 1 h při 37°C vystaveny látce (S)-DHPA ($100 \mu\text{g/ml}$) (CCID_{50} je dávka min. potřebná k infekci 50ti % buněk). Kultury byly inkubovány při 37°C , v různých časových intervalech zmrazeny na -70°C a titr viru v buněčných homogenátech stanoven tvorbou plaků na L-929 myších fibroblastech. Údaje obr. 1 dokumentují silný pokles titru viru při $\mu\text{g/ml}$ (S)-DHPA ve srovnání s kontrolním pokusem, a to o čtyři řády po 48 h od infekce virem.

Příklad 2

Antivirální účinek (S)-DHPA in vivo byl ověřen metodou podle J. Gen. Virol. 2, 359 (1969) a J. Clin. Invest. 42, 1565 (1970): 20 dní staré NMRI myši samice (prům. hmotnost 15 g) byly infikovány intranasálně VSV-virem ($2,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}/0,01 \text{ ml/myš}$) a potom byl opakovaně intraperitoneálně aplikován (S)-DHPA (2 mg/myš , 133 mg/kg) v intervalech 1h, 1 den až 4 dny po infekci. Výsledky jsou uvedeny v obr. 2 pro 14 následujících dní. Opakované dávky (S)-DHPA působí výrazné prodloužení přežití (67 % proti 37,5 % u kontrolní skupiny); rozdíl v obou skupinách je patrný již 9 dní po infekci. Od čtrnáctého dnu po infekci nebylo zaznamenáno další úmrtí v obou skupinách. Tyto pokusy byly provedeny s různými dávkami (S)-DHPA opakované dávky $0,08 \text{ mg/myš}$ ($5,4 \text{ mg/kg}$) byly neúčinné, kdežto opakované dávky $0,4 \text{ mg/myš}$ (27 mg/kg) vyvolávají signifikantní prodloužení přežití oproti kontrolní skupině (55 % proti 37,5 %). Toxicita (S)-DHPA: Všechna pokusná zvířata přežila opakované dávky do 100 mg/kg/den po dobu 3 až 5 dnů bez jakékoliv známky onemocnění. (S)-DHPA je tedy velmi málo toxický.

Příklad 3

Stanovení účinné koncentrace (RS)-DHPA v krevním séru po intraperitoneální a perorální aplikaci myším. Dvěma skupinám po 20 myších samicích NMRI o průměrné hmotnosti 12 g bylo jednorázově podáno po 10 mg (RS)-DHPA v 0,2 ml fyziologického roztoku buď intraperitoneálně nebo perorálně. Vzorky krve byly odebírány v časech 0, 20, 40, 80, 160 a 320 minut po aplikaci a antivirální účinek krevního séra byl stanoven na tkáňových kulturách lidských kožních fibroblastů infikovaných virem vesikulární stomatitidy (viz Příklad 1). Koncentrace (RS)-DHPA v séru byly vypočteny ze zředění séra, potřebného k dosažení 50% inhibice viru podle vzorce

$$C = f \cdot \text{ID}_{50}$$

kde C je koncentrace (RS)-DHPA v krevním séru, f je zředění séra potřebné k dosažení 50% inhibice viru a ID_{50} je experimentální hodnota koncentrace (RS)-DHPA vyvolávající

50% inhibici viru za pokusných podmínek (20 $\mu\text{g/ml}$). Všechna stanovení jsou průměrem vzorků ze tří myší. Výsledky pokusu jsou uvedeny v tabulce 3. V tabulce 1 je doložena antivirální aktivita (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adeninu ve tkáňových kulturách.

V tabulce 2 je uvedena hladina (RS)-DHPA v krevním seru myší po intraperitoneální a perorální aplikaci.

Na obr. 1 je znázorněn graf vyjadřující inhibiční účinek (S)-DHPA na nárůst viru vesikulární stomatitidy v lidských kožních fibroblastech. Na ose y je znázorněn titr viru (\log_{10} PFU/ml), kde PFU je jednotka tvorby plaků; na ose x je znázorněna doba po infekci v hodinách; -●- kontrola, -○- po aplikaci (S)-DHPA; na obr. 2 je znázorněn graf vyjadřující antivirální účinek (S)-DHPA na myších infikovaných intranasálně virem vesikulární stomatitidy; na ose x je znázorněn počet dní po infekci; na ose y je vynesena celková úmrtnost v %; -●- kontrola, -○- (S)-DHPA; na obr. 3 je znázorněna graficky závislost štěpení araA adenosindeaminasou v přítomnosti (S)-DHPA; na ose x je znázorněna koncentrace (S)-DHPA v $\mu\text{g/ml}$, na ose y pokles absorbance při $\lambda = 265$ nm; -●- 50 nmol araA, -○- 100 nmol araA; na obr. 4 Dixonův diagram závislosti štěpení araA adenosindeaminasou v přítomnosti (S)-DHPA; na ose x je znázorněna koncentrace (S)-DHPA v $\mu\text{g/ml}$, na ose y převrácená hodnota počáteční rychlosti štěpení (1/V); K_i = inhibiční konstanta; -●- 50 nmol araA, -○- 100 nmol araA.

Tabulka 1

Antivirální aktivita (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adeninu ve tkáňových kulturách

Virus	Buňky	ID ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
<u>DNK-viry:</u>		
Vakcinie	PRK	10 až 20
Vakcinie	HSF	10 až 20
Herpes simplex- 1 kmen KOS	PRK	10
Herpes simplex- 1 kmen KOS	HSF	20
Herpes simplex- 2 kmen 333	PRK	4 až 10
Herpes simplex- 2 kmen 333	HSF	7 až 20
<u>RNK-viry:</u>		
Vesikulární stomatitis	PRK	7 až 10
Vesikulární stomatitis	HSF	2 až 7
Vesikulární stomatitis	HeLa	>200
Poliomyelitis-1	HSF	>200
Poliomyelitis-1	HeLa	>200
Coxsackie B-4	HeLa	>200

Coxsackie B-4	Vero	>200
Spalničky	Vero	4 až 40
Sindbis	BHK	>200

Zkratky:

PRK primokultura králíčních ledvin; HSF lidské kožní fibroblasty;

Vero kontinuální linie buněk opičích ledvin; BHK kontinuální linie buněk ledvin křečka.

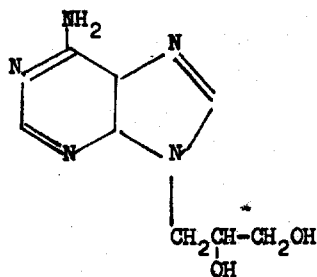
Tabulka 2

Hladina (RS)-DHFA v krevním seru myši po intraperitoneální a perorální aplikaci

Čas (min)	Koncentrace (RS)-DHFA ($\mu\text{g/ml}$ séra) po aplikaci	
	intraperitoneální	perorální
0	100	100
20	1200	1800
40	800	600
80	400	400
160	200	400
320	200	400

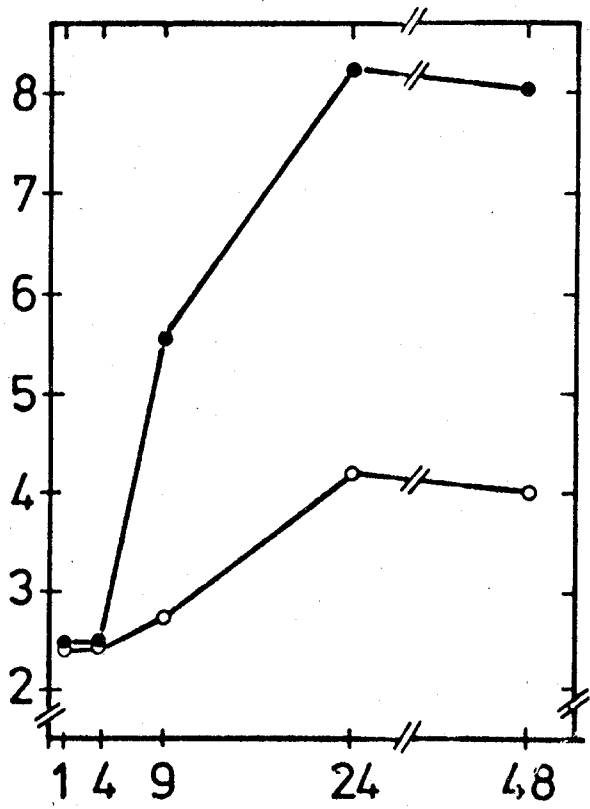
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Léčebný prostředek a antivirálním účinkem, vyznačený tím, že jako aktivní složku (S)- nebo (RS)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenin vzorce I

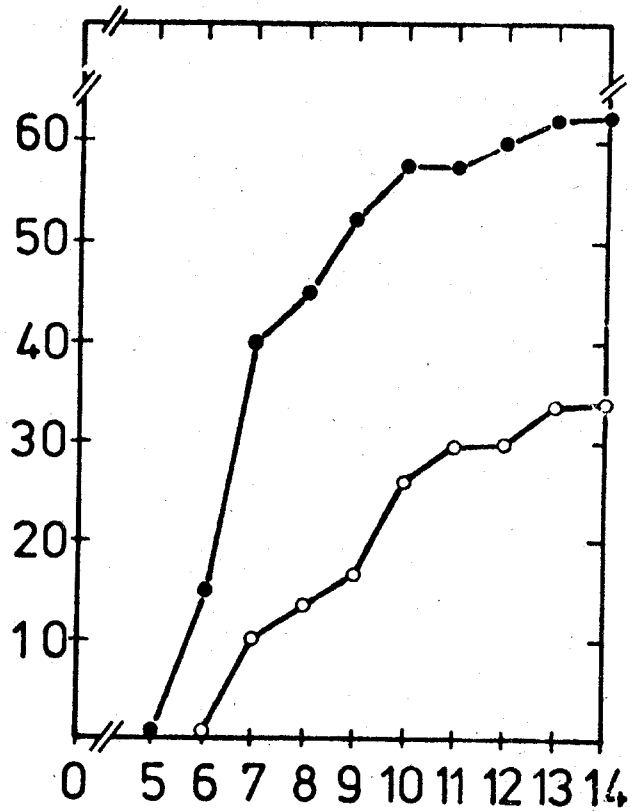


(I)

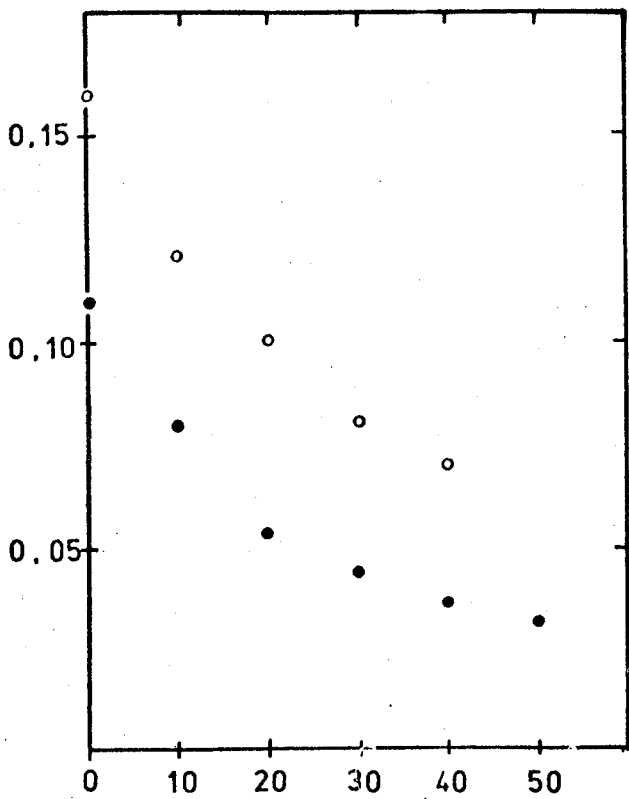
4 výkresy



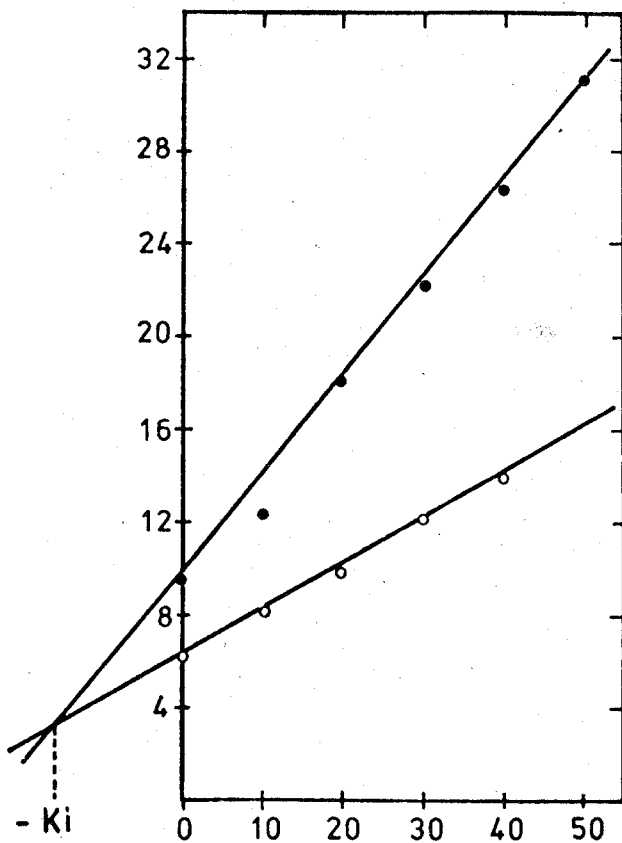
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

