PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:
283 765

(19)
ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **203-94**
(22) Přihlášeno: **24. 07. 92**
(30) Právo přednosti:
01. 08. 91 GB 91/9116601
(40) Zveřejněno: **13. 07. 94**
(Věstník č. 7/94)
(47) Uděleno: **15. 04. 98**
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **17. 06. 98**
(Věstník č. 6/98)
(86) PCT číslo: **PCT/CA92/00321**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 93/03027**

(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.[6]:
C 07 D 411/04
A 61 K 31/505

(73) Majitel patentu:
BIOCHEM PHARMA INC., Quebec, CA;

(72) Původce vynálezu:
Gervais Dionne, Quebec, CA;

(74) Zástupce:
Traplová Jarmila JUDr. advokátka, U průhonu 36, Praha 7, 17000;

(54) Název vynálezu:
(-)-Cis-4-amino-5-fluor-1-(2-hydroxymethyl-1,3-oxathiolan-5-yl)-(1H)-pyrimidin-2-on, směs tuto sloučeninu obsahující, farmaceutická kompozice tuto sloučeninu obsahující, tato sloučenina nebo směs pro použití v terapii a použití této sloučeniny nebo směsi při výrobě léčiva

(57) Anotace:
Vynález se týká (-)-cis-4-amino-5-fluor-1-(2-hydroxymethyl-1,3-oxathiolan-5-yl)-(1H)-pyrimidin-2-onu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, esteru nebo soli takového esteru a jejich farmaceutického využití v rámci výroby léčiv pro léčení virální infekce. Je popsána i farmaceutická kompozice, která jako účinnou látku obsahuje některou z uvedených sloučenin.

CZ 283 765 B6

(–)–Cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–on, směs tuto sloučeninu obsahující, farmaceutická kompozice tuto sloučeninu obsahující, tato sloučenina nebo směs pro použití v terapii a použití této sloučeniny nebo směsi při výrobě léčiva

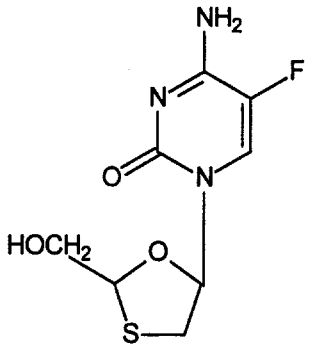
Oblast techniky

Vynález se týká nukleosidových analogů a jejich použití v medicíně. Vynález se konkrétně týká 1,3–oxathiolannukleosidových analogů, farmaceutických kompozic, které tyto analogy obsahují, a jejich použití při léčení virových infekcí.

Dosavadní stav techniky

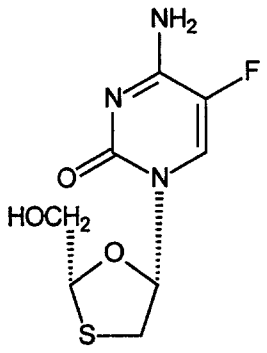
Jedinou v současné době schválenou sloučeninou pro léčení stavů způsobených HIV je 3'–azido–3'–deoxythymidin (AZT, zidovudin, BW 509U). Tato sloučenina však při podání vykazuje výrazně nežádoucí vedlejší účinky a vzhledem k tomu buď nemůže být vůbec použita, a nebo musí být její podávání u značného počtu pacientů opět ukončeno. Vzhledem k tomu je neustále žádoucí získat sloučeniny, které by byly účinné proti HIV a které by však současně měly lepší terapeutický index.

Ve zveřejněné evropské patentové přihlášce 0382526 A2 je popsán způsob přípravy sloučeniny vzorce I



(I)

Nově bylo s překvapením zjištěno, že (–)–enantiomer sloučeniny vzorce 1 je výrazně účinnější než její (+)–enantiomer, přičemž oba enantiomery mají neočekávatelně nízkou toxicitu. Uvedený (–)–enantiomer má chemický název (–)–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–on (dále bude tento enantiomer uváděn jako sloučenina A). Tento enantomer má absolutní stereochemii vymezenou vzorcem I-1



(I-1)

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je (–)–cis–4–amino–5–fluo–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–on nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, ester nebo sůl esteru uvedené sloučeniny.

Předmětem vynálezu je také směs (–)–cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–onu nebo farmaceuticky přijatelné soli, esteru nebo soli esteru uvedené sloučeniny a (+)–cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–onu nebo farmaceuticky přijatelné soli, esteru nebo soli esteru (+)–cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–onu, ve které je (+)–enantiomer přítomen v množství, nepřesahujícím 5 % hmotn., výhodně v množství, nepřesahujícím 2 % hmotn., zejména v množství menším než 1 % hmotn.

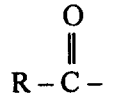
Předmětem vynálezu je také farmaceutická kompozice, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje (–)–cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–on, který je definován výše, nebo směs, která je definována výše.

Předmětem vynálezu je rovněž (–)–cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–on, který je definován výše, nebo směs, která je definována výše, pro použití v terapii.

Předmětem vynálezu je také použití (–)–cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–onu, který je definován výše, nebo směsi, která je definována výše, při výrobě léčiva pro léčení virální infekce, infekce HIV nebo infekce virem hepatitidy B.

Je třeba uvést, že pro odborníka v tomto oboru je rutinní záležitostí modifikace sloučeniny A buď v úrovni funkčních skupin na obou základních částech molekuly, nebo v úrovni hydroxymethylové skupiny oxathiolanového kruhu, a to za účelem získání farmaceuticky přijatelných derivátů sloučeniny A. Modifikace všech takových funkčních skupin rovněž spadá do rozsahu vynálezu. Obzvláště zajímavé jsou však farmaceuticky přijatelné deriváty sloučeniny A, získané modifikací 2–hydroxymethylové skupiny oxathiolanového kruhu.

Výhodné estery sloučeniny A zahrnují sloučeniny, ve kterých je atom vodíku 2–hydroxymethylové skupiny nahrazen acylovou funkcí



ve které nekarbonylový zbytek R esteru je zvolen z množiny, zahrnující atom vodíku, přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu (například methylovou skupinu, ethylovou skupinu, n–propylovou skupinu, terc. butylovou skupinu a n–butylovou skupinu), alkoxyalkylovou skupinu (například methoxymethylovou skupinu), aralkylovou skupinu (například benzylovou skupinu), aryloxyalkylovou skupinu (například fenoxymethylovou skupinu), arylovou skupinu (například fenylovou skupinu, která je případně substituována atomem halogenu, alkylovou skupinou, obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy, nebo alkoxylovou skupinou, obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy), sulfonátové estery, jakými jsou estery odvozené od alkyl nebo aralkylsulfonylové skupiny (například od methansulfonylové skupiny), aminokyselinové estery (například estery, odvozené od L–valylové skupiny nebo L–isoleucylové skupiny) a mono-, di- nebo trifosfátové estery.

Pokud jde o výše popsané estery, potom, pokud není výslovně uvedeno jinak, alkylový zbytek, obsažený v těchto esterech, výhodně obsahuje 1 až 16 uhlíkových atomů a zejména obsahuje 1 až 4 uhlíkové atomy. Libovolný arylový zbytek, který je přítomen v takových esterech, výhodně zahrnuje fenylovou skupinu.

Uvedené estery mohou být zejména alkylestery, ve kterých alkylový zbytek obsahuje 1 až 16 uhlíkových atomů, nesubstituovaným benzylesterem nebo benzylesterem, substituovaným alespoň jedním atomem halogenu (atomem bromu, atomem chloru, atomem fluoru nebo atomem jodu), alkylovou skupinou, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, alkoxylovou skupinou, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, nitro-skupinou nebo trifluormethylovou skupinou.

Farmaceuticky přijatelné soli sloučeniny A zahrnují soli, odvozené od farmaceuticky přijatelných anorganických a organických kyselin a bází. Jako příklady vhodných kyselin lze uvést kyselinu chlorovodíkovou, kyselinu bromovodíkovou, kyselinu sírovou, kyselinu dusičnou, kyselinu chloristou, kyselinu fumarovou, kyselinu maleinovou, kyselinu fosforečnou, kyselinu glykolovou, kyselinu mléčnou, kyselinu salicylovou, kyselinu jantarovou, kyselinu p–toluen-sulfonovou, kyselinu vinnou, kyselinu octovou, kyselinu citronovou, kyselinu methansulfonovou, kyselinu mravenčí, kyselinu benzoovou, kyselinu malonovou, kyselinu naftalen–2–sulfonovou a kyselinu benzensulfonovou. Při přípravě sloučenin podle vynálezu a jejich farmaceuticky přijatelných solí mohou být však použity i další kyseliny, které nejsou samy o sobě farmaceuticky přijatelné, jako například kyselina šťavelová, přičemž takové kyseliny představují při uvedené přípravě pouze meziprodukty.

Soli, odvozené od příslušných bází, zahrnují soli, zahrnující alkalický kov (například sodík), kov alkalických zemin (například hořčík), amonium a NR_4^+ (kde R znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy).

Dále uvedené odkazy na sloučeninu podle vynálezu tudíž zahrnují jak sloučeninu A, tak i její farmaceuticky přijatelné deriváty.

Sloučeniny podle vynálezu mají antivirální účinnost buď samotné, nebo/a jsou metabolizovatelné za vzniku sloučenin s antivirální účinností. Tyto sloučeniny jsou zejména účinné jako inhibitory replikace retrovirů, včetně lidských retrovirů, jakým jsou viry lidské nedostatečnosti imunitního systému (HIV- human immunodeficiency viruses), které se uplatňují v rámci onemocnění AIDS.

Sloučeniny podle vynálezu jsou rovněž použitelné pro léčení živočichů, včetně lidí, infikovaných virem hepatitidy B (HBV).

Dalším předmětem vynálezu je tedy sloučenina A nebo její farmaceuticky přijatelný derivát pro použití jako účinné terapeutické činidlo, zejména jako antivirální činidlo, například při léčení retrovirálních infekcí nebo infekcí HBV.

Dalším nebo alternativním předmětem vynálezu je způsob léčení virální infekce, způsobené virem hepatitidy B (HBV) nebo retrovirem, jakým je HIV, u savců včetně lidí, jehož podstata spočívá v tom, že se pacientovi podá účinné množství sloučeniny A nebo jejího farmaceuticky přijatelného derivátu.

Dalším nebo alternativním předmětem vynálezu je použití sloučeniny A nebo jejího farmaceuticky přijatelného derivátu pro výrobu léčiva pro léčení virální infekce.

Sloučeniny podle vynálezu jsou rovněž použitelné pro léčení stavů, souvisejících s AIDS, jakými jsou komplex provázející AIDS ARC (AIDS-related complex), progresivní celková lymfadenopatie PGL (progressive generalized lymphadenopathy), neurologické stavy, provázející AIDS (jako demence nebo tropická paraparesa), stavy odvozené od pozitivní reakce na HIV-protilátku nebo od pozitivní reakce na HIV, Kaposiho sarkom, trombocytopenie purpurea a přidružené příležitostné infekce, například pneumocystis carinii.

Sloučeniny podle vynálezu jsou rovněž použitelné při prevenci proti progresi nemoci do klinického stavu u pacientů, kteří jsou anti-HIV-protilátka-pozitivní nebo HIV-antigen-pozitivní, a profylaxi, následující po expozici virem HIV.

Sloučenina A nebo její farmaceuticky přijatelné deriváty mohou být rovněž použity při prevenci zamoření fyziologických tekutin, jakými jsou krev nebo sémě, in vitro viry.

Sloučeniny podle vynálezu jsou rovněž použitelné při léčení živočichů včetně lidí, infikovaných virem hepatitidy B.

Pro odborníka v tomto oboru je samozřejmé, že zde použitý výraz léčení se vztahuje jak na profylaxi, tak i na léčení již existujících infekcí nebo symptomů.

Je třeba uvést, že množství sloučeniny podle vynálezu, nezbytné pro uvedené léčení, bude záviset nejen na konkrétní zvolené sloučenině, nýbrž také na způsobu podání této sloučeniny, charakteru stavu, který je léčen, a na věku a stavu pacienta a bude s konečnou platností záviset na rozhodnutí ošetřujícího lékaře nebo veterináře. Obecně se však použité dávky budou pohybovat od asi 0,1 do asi 750 mg/kg tělesné hmotnosti a den, přičemž výhodně se tyto dávky budou pohybovat v rozmezí od 0,5 do 60 mg/kg tělesné hmotnosti a den a nejvýhodněji se tyto dávky budou pohybovat od 1 do 20 mg/kg tělesné hmotnosti a den.

Potřebná dávka může být vhodně podána ve formě jediné dávky nebo ve formě dílčích dávek, podaných ve vhodných intervalech, například ve formě dvou, tří, čtyř nebo více dílčích dávek denně.

Sloučenina podle vynálezu se vhodně podává v jednotkové dávkovací formě, která například obsahuje 10 až 1500 mg, vhodně obsahuje 20 až 1000 mg a nejvhodněji obsahuje 50 až 700 mg účinné látky.

V ideálním případě by měla být účinná látka podána tak, aby se dosáhlo maximální koncentrace účinné látky v plazmě asi 1 až asi 75 μM, výhodně asi 2 až 50 μM a nejvýhodněji asi 3 až asi 30 μM. Toho může být například dosaženo intravenózní injekcí 0,1 až 5 % roztoku účinné látky, případně ve fyziologickém roztoku, nebo perorálním podáním bolusu, obsahujícího asi 1 až asi 100 mg účinné látky. Požadovaná hladina účinné látky v krvi může být udržována kontinuální infuzí, zaručující dodání asi 0,01 až asi 5,0 mg účinné látky/kg tělesné hmotnosti a den, nebo separátními infuzemi, obsahujícími asi 0,4 až asi 15 mg účinné látky/kg tělesné hmotnosti.

I když může být sloučenina v rámci uvedené terapie podána jako taková, je výhodné podat ji ve formě farmaceutické formulace.

Dalším předmětem vynálezu je farmaceutická kompozice, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje sloučeninu A nebo její farmaceuticky přijatelný derivát, jeden nebo několik farmaceuticky přijatelných nosičů a případně další terapeutické nebo/a profylaktické přísady. Použitý nosič nebo použité nosiče musí být přijatelný nebo musejí být přijatelné v tom smyslu, že je, popřípadě že jsou kompatibilní s ostatními přísadami kompozice a nejsou závadné pro příjemce takové kompozice.

Farmaceutické kompozice zahrnují kompozice, vhodné pro perorální, rektální, nasální, topické (také bukvální a sublingvální), vaginální nebo parenterální (také intramuskulární, subkutánní a intravenózní) podání, nebo formy, vhodné pro podání inhalací nebo insulfací. Tyto kompozice mohou mít v případě potřeby formu diskrétních dávkovacích jednotek a mohou být vyrobeny libovolnou ze známých metod, používaných ve farmaceutickém průmyslu. Všechny tyto metody zahrnují stupeň, ve kterém se smísí účinná sloučenina s kapalnými nosiči nebo jemně dezintegrovanými pevnými nosiči, nebo s oběma typy těchto nosičů, načež se získaný produkt tvaruje do požadované formy pro danou kompozici.

Farmaceutické kompozice, vhodné pro perorální podání, mohou mít vhodně formu diskrétních jednotek, jakými jsou kapsle, oplatky nebo tablety, přičemž každá z těchto forem obsahuje předem stanovené množství účinné látky. Dále může mít uvedená kompozice formu prášku nebo granulí, roztoku, suspenze nebo emulze. Uvedená účinná látka může být rovněž podána jako bolus, lektvar nebo pasta.

Tablety a kapsle pro perorální podání mohou obsahovat konvenční pomocné látky, jakými jsou pojiva, plniva, maziva, dezintegrační činidla nebo smáčecí činidla. Tablety mohou být zapouzdřeny o sobě známými postupy. Perorální kapalné přípravky mohou být například ve formě vodných nebo olejových suspenzí, roztoků, emulzí, syrupů nebo elixírů, nebo mohou být prvotně formulovány jako suchý produkt, ze kterého se teprve před použitím smíšením s vodou nebo jiným vhodným kapalným nosičem vytvoří výše uvedená kapalná perorální kompozice. Takové kapalné preparáty mohou obsahovat obvyklé přísady, jakými jsou suspendační činidla, emulgační činidla, nevodná vehikula (která mohou zahrnovat poživatelné oleje) nebo konzervační činidla.

Sloučeniny podle vynálezu mohou být rovněž formulovány pro parenterální podání (například injekcí, například injekcí bolusu nebo kontinuální infuzí) a mohou mít formu jednotkové dávky, například formu ampulí, předběžně naplněných injekčních stříkaček, maloobjemové infúzní nádoby nebo vícedávkového kontejneru, přičemž tyto formy obsahují také přidaná konzervační činidla. Tyto kompozice mohou mít formu suspenzí, roztoků nebo emulzí v olejových nebo vodných nosičích a mohou obsahovat formulační činidla, jakými jsou suspendační činidla, stabilizační činidla nebo/a dispergační činidla. Alternativně může mít účinná složka formu prášku, získaného aseptickou izolací sterilního pevného produktu nebo lyofilizací z roztoku, přičemž se z takového prášku připraví teprve před použitím kapalná kompozice smíšením s vhodným nosičem, jakým je například sterilní apyrogenní voda.

Za účelem topického podání na pokožku mohou být sloučeniny podle vynálezu formulovány jako masti, krémy nebo lotiony, nebo jako transdermální náplasti. Masti a krémy mohou být například formulovány s vodnými nebo olejovými základy za použití přídavku vhodných zahušťovacích nebo/a želatizačních činidel. Lotiony mohou být formulovány s vodnými nebo olejovými základy a budou obvykle obsahovat jedno nebo několik činidel/ zvolených z množiny, zahrnující emulgační činidla, stabilizační činidla, dispergační činidla, suspendační činidla, zahušťovací činidla nebo barvicí činidla.

Kompozice, vhodné pro topické podání do úst, zahrnují pastilky, obsahující účinnou složku v ochuceném základu, kterým je obvykle sacharóza, akáciový extrakt nebo tragant, pastilky, obsahující účinnou složku v inertním základu, jakým je želatina a glycerin, nebo sacharóza a akáciový extrakt, a ústní výplachy, obsahující účinnou látku ve vhodném kapalném nosiči.

Farmaceutické kompozice, vhodné pro rektální podání a mající pevný nosič, mají nejvýhodněji formu čípků, obsahujících jednotkovou dávku účinné látky. Vhodné nosiče zahrnují kakaové máslo nebo jiné materiály, které se obvykle k tomuto účelu používají, přičemž tyto čípky se obvykle připravují smíšením účinné sloučeniny se změkčeným nebo roztaveným nosičem nebo nosiči, následným ochlazením a tvarováním ve formách.

Formulace, vhodné pro vaginální podání, mohou mít formu pesarů, tampónů, krémů, gelu, past, pěn nebo sprejů, které vedle účinné látky obsahují obvyklé vhodné nosiče.

Za účelem intranasálního podání mohou být sloučeniny podle vynálezu použity ve formě kapalného spreje nebo dispergovatelného prášku, nebo ve formě kapek.

Kapky mohou být formulovány společně s vodným nebo nevodným základem, který může rovněž obsahovat jedno nebo několik dispergačních činidel, solubilizačních činidel nebo suspendačních činidel. Kapalné spreje se vhodně vypouští z tlakovaných nádobek.

Za účelem podání inhalací se sloučeniny obvykle vypouští z insuflátoru, mlhového rozprašovače nebo tlakované nádobky, anebo za použití libovolného jiného prostředku, vhodného pro uvolňování aerosolového spreje. Tlakovaná nádobka může obsahovat vhodnou hnací látku, jakou je dichlordifluormethan, trichlorfluormethan, dichlortetrafluorethan, oxid uhličitý nebo jiný vhodný plyn. V případě tlakovaného aerosolu může být jednotková dávka uvolněna za použití ventilu, schopného při každém zmáčknutí ovladače ventilu uvolnit odměřené množství obsahu tlakované nádobky.

Alternativně mohou mít sloučeniny podle vynálezu za účelem podání inhalací nebo insuflací formu suché práškové kompozice, například práškovou směs sloučeniny podle vynálezu a vhodné práškové báze, jakou je laktóza nebo škrob. Tato prášková kompozice může mít jednotkovou dávkovací formu, například formu kapsle nebo patrony, nebo například želatinové tobolky, ze které může být uvedený prášek aplikován pomocí inhalátoru nebo insuflátoru.

V případě, že je to žádoucí, mohou být výše uvedené kompozice upraveny tak, že uvolňují účinnou látku plynule v určitém časovém intervalu.

Farmaceutické kompozice podle vynálezu mohou rovněž obsahovat další účinné přísady, jakými jsou antimikrobiální činidla nebo konzervační činidla.

Sloučeniny podle vynálezu mohou být rovněž použity v kombinaci s dalšími terapeutickými činidly, například s ostatními antiinfekčními činidly. Sloučeniny podle vynálezu mohou být zejména použity společně se známými antivirálními činidly.

Dalším předmětem vynálezu je kombinace, obsahující sloučeninu A nebo její fyziologicky přijatelný derivát a další terapeuticky účinné činidlo, zejména antivirální činidlo.

Výše uvedená kombinace může být vhodně formulována pro použití ve formě farmaceutické kompozice a tudíž farmaceutická kompozice, obsahující výše uvedenou kombinaci společně s farmaceuticky přijatelným nosičem, představuje další předmět vynálezu.

Vhodná terapeutická činidla pro použití v takových kombinacích zahrnují acyklické nukleosidy, jako acyclovir nebo ganciclovir, interferony, jako alfa-, beta- nebo gamma-interferon, inhibitory

renální exkrece, jako probenecid, inhibitory transportu nukleosidů, jako dipyridamole, 2,3–dideoxynukleosidy, jako AZT, 2',3–dideoxycytidin, 2,3'–dideoxyadenosin, 2',3'–dideoxyinosin, 2',3'–dideoxythymidin, 2',3'–dideoxy–2',3'–didehydrothymidin a 2',3'–dideoxy–2',3'–didehydrocytidin, imunomodulátory, jako interleukin–2 (IL–2) a stimulační faktor granulocytové makrofágové kolonie (GM-CSF), erythropoietin, ampligen, thymomodulin, thymopentin, foscarnet, ribavirin a inhibitory vazby HIV k receptorům CD4, například rozpustný CD4, fragmenty CD4, hybridní molekuly CD4, glykosylační inhibitory, jako 2–deoxy–D–glukóza, castanospermine a 1–deoxynojirimycin.

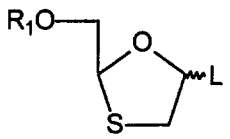
Jednotlivé složky takových kombinací mohou být podány buď následně nebo současně v separátních nebo sloučených farmaceutických kompozicích.

V případě, že se sloučenina A nebo její farmaceuticky přijatelný derivát použije v kombinaci s druhým terapeutickým činidlem účinným proti stejnému viru, potom dávka každé sloučeniny může být stejná jako dávka této sloučeniny, kdy se sloučenina používá samotná, nebo se od této dávky může lišit. Pro odborníka v tomto oboru nebude obtížné takové dávky stanovit.

Sloučenina A a její farmaceuticky přijatelné deriváty mohou být připraveny libovolným vhodným způsobem pro přípravu sloučenin s analogickou chemickou strukturou, například způsobem, popsaným v evropské patentové přihlášce 0382526 A2.

Pro odborníka v tomto oboru je zřejmé, že v případě některého z níže uvedených způsobů může být požadované stereochemie sloučeniny A dosaženo buď tím, že se při syntéze vychází z opticky čistého výchozího materiálu, nebo rozštěpením racemické směsi v libovolném vhodném stupni syntézy. Při všech těchto způsobech může být opticky čistý požadovaný produkt získán rozštěpením finálního produktu každé reakce.

Při jednom takovém způsobu se 1,3–oxathiolan obecného vzorce VIII



(VIII),

ve kterém anomerní skupina L znamená odštěpitelnou skupinu, uvede v reakci s příslušnou bází. Vhodné skupiny L zahrnují -OR, kde R znamená alkylovou skupinu, například alkylovou skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, zejména methylovou skupinu, nebo R znamená acylovou skupinu, například acylovou skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, zejména acetylovou skupinu, nebo atom halogenu, například atom jodu, atom bromu nebo atom chloru.

Sloučenina obecného vzorce VIII se vhodně uvede v reakci s 5–chlorcytosinem nebo jeho prekurzorem, tvořeným příslušnou pyrimidinovou bází (předběžně silylovaným silylačním činidlem, jakým je hexamethyldisilazan), v kompatibilním rozpouštědle, jakým je methylenchlorid, za použití Lewisovy kyseliny, jakou je chlorid titaničitý, trimethylsilyltriflát, trimethylsilyljodid (TMSI) nebo sloučenina čtyřmocného cínu, jakou je chlorid ciničitý.

1,3–Oxathiolany obecného vzorce VIII mohou být například připraveny reakcí aldehydu vzorce VII s merkaptoacetalem vzorce VI v kompatibilním organickém rozpouštědle, jakým je toluen, v přítomnosti kyselého katalyzátoru, jakým je například Lewisova kyselina, zejména chlorid zinečnatý.

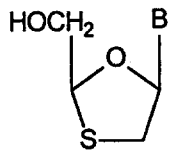
$$HSCH_2CH(OC_2H_5)_2 \qquad (VI)$$

$C_6H_5CO_2CH_2CHO$ (VII)

Merkaptoacetaly obecného vzorce VI mohou být připraveny o sobě známými způsoby, například způsobem, popsaným G. Hesse-m a I. Jorder-rem v Chem.Ber., 85, str.924-932 (1952).

Aldehydy vzorce VII mohou být připraveny o sobě známými způsoby, například způsobem, popsaným E. G. Halloquist-em a H. Hibbert-em v Can. J. Research, 8, str.129-136 (1933). Surový aldehyd vzorce VII může být vhodně přečištěn převedením na krystalický hydrogensiřitanový adukt a následným zpětným převedením na volný aldehyd.

Při druhém způsobu se sloučenina A získá interkonverzí sloučeniny obecného vzorce IX

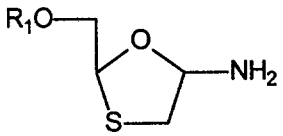


(IX),

ve kterém B znamená bázi, konvertovatelnou na 5–fluorcytosin.

Taková interkonverze může být provedena buď jednoduchou chemickou transformací (například konverzí uracilové báze na cytosin), nebo enzymatickou konverzí za použití deoxyribosyl–transferázy. Takové způsoby a podmínky jejich provádění jsou velmi dobře známé v odvětví chemie nukleosidů.

Při třetím způsobu může být sloučenina obecného vzorce XI



(XI)

převedena na sloučeninu A konverzí anomerní skupiny NH_2 na 5–fluorcytosinovou bázi způsoby, které jsou velmi dobře známé v chemii nukleosidů.

Mnoho z výše uvedených reakcí bylo rozsáhle popsáno v souvislosti se syntézami nukleosidů, například v Nucleoside Analogs - Chemistry. Biology and Medical Applications, R. T. Walker a kol., nakl. Plenum Press, New York (1979), str. 165-192, a v T. Ueda, Chemistry of nucleosides and Nucleotides, sv. I, L. B. Townsend Ed. , Plenum Press, New York (1988), str. 165-192.

Je třeba uvést, že výše uvedené reakce mohou vyžadovat použití výchozích látek s chráněnými funkčními skupinami, přičemž tyto ochranné skupiny mohou být za účelem získání požadované sloučeniny odstraněny v úrovni meziproduktů nebo finálního produktu. Zavedení ochranných skupin a jejich odstranění může být provedeno konvenčními postupy. Tak například aminové skupiny mohou být chráněny skupinou, zvolenou z množiny, zahrnující aralkylovou skupinu (například benzylovou skupinu, acylovou skupinu, arylovou skupinu (například 2,4–dinitrofenylovou skupinu) nebo silylovou skupinu. Následné případné odstranění ochranné skupiny se

případně provádí hydrolýzou nebo hydrogenolýzou, výhodně za standardních podmínek. Hydroxylové skupiny mohou být chráněné za použití konvenčních ochranných skupin hydroxylové funkce, jak je to například popsáno v Protective Groups in Organic Chemistry, J. F.W. Mcomie, nakl. Plenum Press, New York (1973), nebo v T. W. Greene, Protected Groups in Organic Synthesis, John Wiley and sons, New York (1981). Příklady vhodných ochranných skupin hydroxylové funkce zahrnují skupiny, zvolené z množiny, zahrnující alkylovou skupinu (například methylovou skupinu, terc.butylovou skupinu nebo methoxymethylovou skupinu), aralkylovou skupinu (například benzylovou skupinu, difenylmethylovou skupinu nebo trifenylmethylovou skupinu), heterocyklické skupiny, například tetrahydropyranylovou skupinu, acylovou skupinu (například acetylovou nebo benzoylovou skupinu) a silylové skupiny, například trialkylsilylovou skupinu (zejména terc.butyldimethylsilylovou skupinu). Ochranné skupiny hydroxylové funkce mohou být odstraněny konvenčními postupy. Tak například alkylová, silylová, acylová a heterocyklická skupina mohou být odstraněny solvolýzou například hydrolýzou za kyselých nebo bázických podmínek. Aralkylové skupiny, jako například trifenylmethylová skupina, mohou být také odstraněny solvolýzou, například hydrolýzou za kyselých podmínek. Aralkylové skupiny, jako například benzylová skupina, může být odštěpena například za použití systému BF_3/etherát a anhydrid kyseliny octové a následným odstraněním takto vytvořených acetátových skupin v příslušném stupni syntézy. Silylové skupiny mohou být rovněž vhodně odstraněny za použití zdroje fluoridových iontů, jakým je například tetra–n–butylamoniumfluorid.

Při provádění výše uvedených způsobů se sloučenina A obvykle získá ve formě směsi isomerů cis a trans a z těchto isomerů je zajímavou sloučeninou právě isomer cis.

Uvedené isomery mohou být rozděleny fyzikálními postupy, například chromatografií na silikagelu nebo frakční krystalizací, a to buď přímo, nebo ve formě vhodného derivátu, například acetátu (připraveného například za použití anhydridu kyseliny octové), načež se po rozdělení provede zpětná konverze na původní produkt (například deacetylací za použití roztoku amoniaku v methanolu).

Farmaceuticky přijatelné soli sloučenin podle vynálezu mohou být připraveny postupy, popsanými v patentu US 4,383,114. Je-li tedy například žádoucí připravit adiční sůl sloučeniny A s kyselinou, potom může být finální produkt z libovolného výše uvedeného postupu převeden na sůl reakcí rezultující volné báze s vhodnou kyselinou za použití konvenčních postupů. Farmaceuticky přijatelné adiční soli s kyselinami mohou být připraveny reakcí volné báze s příslušnou kyselinou, případně v přítomnosti vhodného rozpouštědla, jakým je ester (například ethylacetát) nebo alkohol (například methanol, ethanol nebo isopropanol). Soli s anorganickými bázemi mohou být připraveny reakcí sloučeniny A s vhodnou bází, jakou je například alkohol (například methanol). Farmaceuticky přijatelné soli mohou být rovněž připraveny z jiných solí sloučeniny A, včetně farmaceuticky přijatelných solí, a to za použití konvenčních metod.

Sloučenina A může být převedena na farmaceuticky přijatelný fosfát nebo jiný ester reakcí s fosforylačním činidlem, jakým je $POCl_3$, nebo reakcí s vhodným esterifikačním činidlem, jakým je halogenid kyseliny nebo anhydrid kyseliny. Ester nebo sůl sloučeniny A může být převedena na původní sloučeninu například hydrolýzou.

Štěpení finálního produktu nebo jeho meziproduktu, nebo výchozí látky, použité pro jeho přípravu, může být provedeno libovolnou vhodnou známou metodou: viz například E. L.Eliel, Stereochemistry of Carbon Compounds, McGraw Hill (1962) a S. H. Wilen, Tables of Resolving Agent.

Tak například sloučenina A může být získána chirální chromatografií za použití vhodné stacionární fáze, jakou je například acetylovaný beta–cyklodextrin nebo triacetát celulózy, a vhodného rozpouštědla, jakým je například alkohol, zejména ethanol, nebo vodný roztok

například triethylamoniumacetátu. Alternativně mohou být sloučeniny štěpeny mechanismem enzymem mediovaného enantioselektivního katabolismu za použití vhodného enzymu, jakým je cytidin–deamináza, nebo selektivní enzymatickou degradací vhodného derivátu s 5'–nukleotidázou. V případě, že se uvedené štěpení provádí enzymaticky, potom může být enzym použit buď v roztoku, nebo vhodněji v imobilizované formě. Enzymy mohou být imobilizovány libovolnou vhodnou známou metodou, například adsorpcí na pryskyřici, jakou je Eupergit C.

V následující části popisu bude vynález blíže objasněn pomocí konkrétních příkladů jeho provedení, které však mají pouze ilustrační charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen formulací patentových nároků.

Příklady provedení vynálezu

Meziprodukt 1

(±)–cis–2–Hydroxymethyl–5–(5'–fluorcytosin–1'–yl)–1,3–oxothiolan

i) 2–Benzoyloxymethyl–5–acetoxy–1,3–oxathiolan

Benzoyloxyacetaldehyd (216,33 g, 1,32 mol) se rozpustí v pyridinu (373 ml, 4,61 mol) a k získanému roztoku se přidá 1,4–dithian–2,5–diol (100,31 g, 0,66 mol). Získaná heterogenní směs se míchá pod atmosférou dusíku po dobu jedné hodiny při teplotě 60 až 65 °C. Po ukončení reakce se získá čirý roztok K reakční směsi se přidá dichlormethan (650 ml) a směs se ochladí na teplotu 0 °C na lázni soli a ledu. K roztoku, chlazenému na teplotu 0 až 5 °C, se v průběhu 1,5 až 2 hodin po kapkách přidá acetylchlorid. Reakční směs se potom míchá po dobu 30 minut při teplotě 0 až 5 °C, načež se opatrně nalije do chladného (0 °C) nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Organická vrstva se oddělí. Vodná vrstva se extrahuje dichlormethanem (3 x 200 ml). Sloučené organické vrstvy se promyjí nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (3 x 200 ml a solankou (200 ml). Roztok se vysuší nad síranem sodným a zahustí za vakua. Stopy pyridinu se odstraní azeotropní destilací s benzenem. Získá se 320,79 g surového produktu, který se přečistí destilací v kuličkovém aparátu nebo filtrací skrze krátký sloupec silikagelu (eluční soustava: směs hexanu a ethylacetátu v objemovém poměru 3:1).

ii) cis- a trans–2–Benzoyloxymethyl–5–(N_4'–acetyl–5'–fluorcytosin–1'–yl)–1'–yl)–1,3–oxathiolan

5–Fluorcytosin (4,30 g, 33,3 mmol), hexamethyldisilazan (25 ml) a síran amonný (120 mg) se zahřívají na teplotu varu pod zpětným chladičem až do okamžiku, kdy se cytosin rozpustí (3 hodiny), načež se v tomto zahřívání na teplotu varu pod zpětným chladičem pokračuje ještě po dobu 2 hodin. Hexamethyl disilazan se odpaří za vakua a ke zbytku se přidá toluen (100 ml) za účelem odpaření rozpouštědel. Rezultující roztok bis(trimethylsilyl)fluorcytosinu v dichlormethanu (40 ml) se pod atmosférou argonu přidá k roztoku 2–benzoyloxymethyl–5–acetoxy–1,3–oxathiolanu (8,537 g, 30,3 mmol) v bezvodém dichlormethanu (100 ml) a molekulárním sítu (4A, 2 g), který byl předběžně připraven pod atmosférou argonu a chlazen na teplotu 0 °C po dobu 20 minut. K této směsi se při teplotě 0 °C přidá /(trifluormethansulfonyl)oxy/trimethylsilan (6 ml, 31 mmol) a rezultující roztok se míchá při okolní teplotě po dobu 2 hodin. Filtrát se dvakrát vytřepe do 300 ml solanky a jednou do destilované vody. Organická vrstva se vysuší nad síranem hořečnatým, zfiltruje a odpaří k suchu. Takto se získá surový 5–fluorcytosinový derivát (10,1 g).

R_f = 0,57 (ethylacetát/methanol v objemovém poměru 9:1).

Tento zbytek se bez jakéhokoliv dalšího čistění v následujícím stupni acetyluje. Surový produkt se rozpustí v bezvodém dichlormethanu (120 ml) a toto rozpuštění se provádí v baňce s kulatým dnem o obsahu 500 ml a pod atmosférou argonu. K získanému roztoku se přidá triethylamin (12,7 ml, 91,1 mmol) a dimethylaminopyridin (111 mg, 0,9 mmol). Baňka se potom ponoří do ledu a zde se přechovává pod atmosférou argonu po dobu jedné hodiny. Do chlazené baňky se pomocí injekční stříkačky zavede anhydrid kyseliny octové (4,3 ml, 45 mmol), který byl předtím předestilován nad octanem sodným. Získaná směs se míchá přes noc, načež se opatrně dekantuje do Erlenmayerovy baňky, obsahující nasycený roztok hydrogenuhličitanu sodného. Produkt potom promyje destilovanou vodou a následně ještě roztokem solanky. Methylenchloridové podíly se vysuší a odpaří k suchu za vysokého vakua, přičemž se získá acetylovaná alfa/beta-směs ve formě bezbarvé pěny, mající po vysušení hmotnost 9,6 g. Vysokotlakou chromatografií za použití eluční soustavy, tvořené směsí ethylacetátu a methanolu v objemovém poměru 9:1, se získá 3,1 g (7,8 mol, 46 %) čistého isomeru trans požadované sloučeniny a 3,5 g (8,9 mmol, 30 %) čistého isomeru cis požadované sloučeniny.

trans-Isomer: R_f = 0,65 v soustavě, tvořené směsí ethylacetátu a vody v objemovém poměru 9:1

U.V.: (MeOH) Lambda max: 309 nm,
^{1}H-NMR δ (ppm in $CDCl_3$)
8,77 (b, 1H; C_4'–N<u>H</u>–Ac), 8,06 (m, 2H; aromat.), 7,70 (d, 1H; C_6'-H, J_{CF} =6,3 Hz), 7,62 (m, 1H; aromat.), 7,49 (m, 2H; aromat.), 6,51 (dd, 1H; C_5-<u>H</u>), 5,91 (dd, 1H; C_2-<u>H</u>), 4,48 (dd, 2H; C_2-<u>CH_2</u>$OCOC_6H_5$), 3,66 (dd, 1H; C_4-<u>H</u>), 3,34 (dd, 1H; C_4-<u>H</u>), 2,56 (s, 3H; NH-CO<u>CH_3</u>)

cis-isomer: R_f = 0,58, ethylacetát/methanol 9:1

U.V.: (MeOH) Lambda max.: 309 nm,
^{1}H-NMR δ (ppm in $CDCl_3$)
8,72 (b, 1H; C_4'–NH–Ac), 8,06 (m, 2H; aromat.), 7,87 (d, 1H; C_6'-<u>H</u>, J_{CF} = 6,2 Hz), 7,60 (m, 1H; aromat.), 7,49 (m, 2H; aromat.), 6,32 (dd, 1H; C_5-<u>H</u>), 5,47 (dd, 1H; C_2-<u>H</u>), 4,73 (dd, 2H; C_2-<u>CH_2</u>$OCOC_6H_5$), 3,62 (dd, 1H; C_4-<u>H</u>), 3,19 (dd, 1H; C_4-<u>H</u>), 2,55 (s, 3H; NH-CO<u>CH_3</u>)

iii) (±)–cis–Hydroxymethyl–5–(5'–fluorcytosin–1'–yl)–1,3–oxathiolan

1,2 g (3,05 mmol) cis–2–benzoyloxymethyl–5–(N_4'–acetyl–5'–fluorcytosin–1'–yl)–1,3–oxathiolanu se míchá ve 30 ml roztoku amoniaku v methanolu při teplotě 0 °C po dobu jedné hodiny a potom ještě přes noc při okolní teplotě. Reakční směs se odpaří za sníženého tlaku. Zbytek se dvakrát rozetře (2 x 30 ml) s bezvodým etherem. Pevný zbytek se rekrystalizuje z absolutního ethanolu, přičemž se získá 655 mg (2,64 mmol , 87 %) čistého požadovaného cis-produktu.

Teplota tání: 204-206 °C,
R_f = 0,21 ve směsi ethylacetátu a methanolu v objemovém poměru 9:1).

Požadovaná sloučenina byla identifikována ^{1}H- a ^{13}C-nukleární magnetickorezonanční spektroskopií a ultrafialovou spektroskopií:
Lambda max. (H_2O) : 280,9 nm.

cis-isomer:

^{1}H-NMR δ (ppm. DMSO-d_6)
8,22 (d, 1H; C_6' -H, J_{CF} =7,26 Hz), 7,84 (d, 2H; C_4' -NH_2), 6,16 (t, 1H; C_5-<u>H</u>), 5,43 (t, 1H; C_2-CH_2-OH), 5,19 (t, 1H; C_2-<u>H</u>), 3,77 (m, 2H; C_2-<u>CH_2</u>OH), 3,35 (dd, 1H; C_4-<u>H</u>),
^{13}C-NMR (DMSO-d_6)

C_6'	C_2'	C_4'	C_5'
153,46	158,14 ($^2J_{CF}$=14,0 Hz)	134,63 (J_{CF}=24,1 Hz)	126,32 (J_{CF}=32,5 Hz)
C_5	C_4	C_2	CH_2OH
86,82	36,80	86,77	62,32

Příklad 1

(–)–4–Amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–on

i) (±)–cis–2–hydroxymethyl–5–(5'–fluorcytosin–1'–yl)–1,3–oxathiolanmonofosfát

K míchané směsi meziproduktu 1 (500 mg, 2,024 mmol) v bezvodém trimethylfosfátu (10 ml), chlazené na teplotu 0 °C, se po kapkách přidá oxychlorid fosforečný (1,22 ml, 13,1 mmol). Reakční směs se míchá při této teplotě po dobu jedné hodiny, načež se prudce nalije do ledové vody. pH ochlazené reakční směsi se nastaví na 3 přidáním vodného 1N hydroxidu sodného a reakční směs se zavede na sloupec aktivního uhlí (5 g, DARCO který se potom eluuje vodou a následně ethanolem a vodným roztokem amoniaku v objemovém poměru 10:10:1. Frakce, obsahující surový monofosfát, se sloučí a odpaří a zbytek se zavede na sloupec 15 g DEAE sephadex A25 (v HCO_3-cyklu). Eluce se provádí za použití gradientu vody (300 ml), 0,1M NH_4HCO_3 (300 ml) a 0,2M NH_4HCO_3 (100 ml). Odpařením příslušných frakcí po zředění vodou (30 ml) se získá (±)–cis–2–hydroxymethyl–5–(5'–fluorcytosin–1'–yl)–1,3–oxathiolanmonofosfát ve formě bílého pevného produktu.

R_f = 0,5 (n-propanol/NH_4OH 6:4),
výtěžek: 612 mg (1,77 mmol, 87,9 %),

^{1}H-nukleární magnetickorezonanční spektrum:
(D_2O, hodnoty delta v ppm)
8,27 (d, 1H, C'$_6$–H, J_{H-F}= 6,47 Hz), 6,33 (dd, 1H, C_5–H), 5,47 (t, 1H, C_2–H), 4,84 (m, 2H,C_2–$C\underline{H_2}OH$), 3,63 (dd, 1H, C_4H), 3,30 (dd, 1H, C_4H),

čistota (stanovená vysokotlakou kapalinovou chromatografií): vyšší než 99 %.

ii) (+)–cis–2–hydroxymethyl–5–(5'–fluorcytosin–1'–yl)–1,3–oxathiolan

K roztoku (+)–cis–2–hydroxymethyl–5–(5'–fluorcytosin–1'–yl)–1,3–oxathiolanmonofosfátu (100 mg, 0,29 mmol) ve 3 ml glycinového pufru (glycin (52,6 mg) a chloridu hořečnatého (19 mg) ve vodě (10 ml) se v jediné porci přidá 5'–nukleotidáza (Sigma, 3,5 mg, 29 jednotek/mg). Rezultující směs se inkubuje za třepání při teplotě 37 °C. Reakce se sleduje vysokotlakou kapalinovou chromatografií (chirální sloupec alfa-AGP, eluční činidlo: 0,2M roztok fosforečnanu sodného, mající pH 7, průtok: 0,15 ml/min) odebíráním vzorků a jejich analyzováním v jednotlivých intervalech. Po 2,5 hodiny byl pozorován pouze (+)-enantiomer. Byl přidán další enzym (2 mg) a v inkubaci bylo pokračováno po dobu dalších 3 hodin. Analýza vysokotlakou kapalinovou chromatografií potvrzuje selektivní a úplnou hydrolýzu (+)-enantiomeru. Rezultující směs se zavede na sloupec DEAE sephadex A-25 (v HCO_3-cyklu). Eluce se provádí za použití vody (155 ml) a potom 0,1 a 0,2M NH_4HCO_3 (100 ml každého). Příslušné frakce, obsahující prvně eluovaný nukleosid, se sloučí a zahustí. Zbytek se přečistí na krátkém sloupci silikagelu za použití eluční soustavy, tvořené směsí ethylacetátu a methanolu v objemovém poměru 4,5:0,5,

a potom rozdělí vysokotlakou kapalinovou chromatografií (za použití výše uvedených podmínek). Takto se získá čistý (+)–cis–2–hydroxymethyl–5–(5'–fluorcytosin–1'–yl)–1,3–oxathiolan (23 mg, 0,093 mmol , 32 %) ve formě bílého pevného produktu.

/alfa/$^{21}_{delta}$ = + 123° /c, 1,00, methanol),
teplota tání: 185 °C,

nukleární magnetickorezonanční spektrum:
(DMSO, hodnoty delta v ppm)
8,26 (d, 1H, C'$_6$-H, J_{H-F} = 5,22 Hz), 7,87 (s, 1H, NH_2, D_2O vyměnitelný), 7,63 (s, 1H, NH_2, D_2O vyměnitelný), 6,20 (dd, 1H, C_5–H), 5,48 (t, 1H, C_2H), 5,24 (t, 1H, CH_2–OH, D_2O vyměnitelný), 3,84 (m, 2H, C_2–CH_2OH), 3,50 (dd, 1H, C_4H), 3,37 (dd, 1H, C_4H),

iii) (–)–cis–2–Hydroxymethyl–5–(5'–fluorcytosin–1'–yl)–1,3–oxathiolan

Příslušné frakce, eluované ze sloupce sephadexu a obsahující v pořadí jako druhý eluovaný nukleosid, popsaný ve stupni ii, se sloučí a odpaří za sníženého tlaku. Zbytek se rozpustí ve 2 ml vody a uvede do styku s alkalickou fosfatázou (Sigma, 1 ml, 60 jednotek/ml), načež se inkubuje při teplotě 37 °C po dobu 1,5 hodiny. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se přečistí chromatograficky na sloupci silikagelu za použití eluční soustavy, tvořené směsí ethylacetátu a methanolu v objemovém poměru 4:1, a potom vysokotlakou kapalinovou chromatografií (při separaci je použito výše zmíněných podmínek). Takto se získá čistý (–)–cis–2–hydroxymethyl–5–(5'–fluorcytosin–1'–yl)–1,3–oxathiolan (20 mg, 0,081 mmol, 28 %).

Teplota tání: 190 °C (za rozkladu),
R_f = 0,21 (ethylacetát/methanol 4:1),
UV-spektrum: (H_2O) max. : 279,1 nm,

^{1}H-nukleární magnetickorezonanční spektrum:
(DMSO-d_6, hodnoty delta v ppm)
8,25 (d, 1H, C'$_6$–H, J_{HF} = 7,26 Hz), 7,88 (b, 1H, C'$_4$–NH_2, D_2O vyměnitelný), 7,85 (b, 1H, C'$_4$–NH_2, D_2O vyměnitelný), 5,24 (t, 1H, C_2–H), 3,83 (m, 2H, C_2–CH_2–OH), 3,19 (dd, 1H, C_4–H), 3,15 (dd, 1H, C_4–H).

V následujícím příkladu bude ilustrován alternativní způsob přípravy sloučeniny A.

Meziprodukt 2

(1'R,2'S,5'R)–Menthyl–5R–(5'–fluorcytosin–1"–yl)–1,3–oxathiolan–2S–karboxylát

K suspenzi 5–fluorcytosinu (155 mg, 1,2 mmol) v methylenchloridu (1 ml) se při okolní teplotě a pod argonovovou atmosférou postupně přidá 2,4,6–kollidin (0,317 ml, 2,4 mmol) a terc.-butyldimethylsilyltrifluormethansulfonát (0,551 ml, 2,4 mmol). Získaná směs se míchá po dobu 15 minut, přičemž se získá čirý roztok. Zavede se roztok (1'R,2'S,5'R)–menthyl5R–acetoxy–1,3–oxathiolan–2S–karboxylátu (330 mg, 1 mmol) v methylenchloridu (0,5 ml) a potom ještě jodtrimethylsilan (0,156 ml, 1,1 mmol). V míchání se pokračuje ještě po dobu 3 hodin. Směs se zředí methylenchloridem (20 ml) a postupně promyje vodným nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vodou a solankou, načež se zahustí. Zbytek se vyjme směsí etheru a hexanů (1:1, 10 ml) a nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2 ml) a míchá při okolní teplotě po dobu 15 minut. Vodná vrstva se oddělí a organická fáze se odstředí, přičemž se získá bílý pevný produkt, který se promyje hexany (3 x 5 ml) a potom vysuší za vakua. Takto získaný (1'R,2'S,5'R)–menthyl–5R–(5"–fluorcytosin–1"–yl)–1,3–oxathiolan–2S–karboxylát

(350 mg, 88 %) obsahuje asi 6 % (1'R,2'S,5',R)menthyl–5S–(5"–fluorcytosin–1"–yl)–1,3–oxathiolan–2S–karboxylát (NMR). Tento produkt se rekrystalizuje ze směsi methanolu, methylenchloridu a benzenu za vzniku krystalického produktu.

/alfa/$^{26}_{D}$ = +22° (c, 0,19, MeOH)
teplota tání: 216-218 °C,

^{1}H-nukleární magnetickorezonanční spektrum:
($CDCl_3$, hodnoty delta v ppm)
0,78 (d, 3H, J=7 Hz), 0,91 (t, 6H, J=7,3 Hz), 1,00 (m, 2H), 1,39-2,04 (m, 7H), 3,12 (dd, 1H, H=6,6 Hz, 6,1 Hz), 3,52 (dd, 1H, J=4,7 Hz, 6,1 Hz), 4,79 (dt, 1H, J=4,4 Hz, 4,3 Hz), 5,46 (S, 1H), 5,75 (šir. s, 1H, vyměnitelný), 6,42 (5t, 1H, J=5,0 Hz), 8,10 (šir.s, 1H, vyměnitelný), 8,48 (d, 1H, J=6,6 Hz),

^{13}H-nukleární magnetickorezonanční spektrum:
($CDCl_3$–DMSO–d6, hodnoty delta) 16,7, 21,2, 22,4, 23,7, 26,6, 31,8, 34,4, 36,6, 40,5, 47,2, 77,1, 79,1, 90,8, 126,3 (d, J=33 Hz), 137,1 (d, J=244 Hz), 154,2, 158,3, (d, J=15 Hz), 170,1.

Příklad 2

2S–Hydroxymethyl–5R–(5'–fluorcytosin–1'–yl)–1,3–oxathiolan

K suspenzi lithiumaluminiumhydridu (10 mg, 0,54 mmol) v tetrahydrofuranu (1 ml) se při okolní teplotě a pod atmosférou argonu pomalu přidá roztok (1'R,2'S,5'R)–menthyl–5R–(5"–fluorcytosin–1"–yl)–1,3–oxathiolanu–2S–karboxylátu (54 mg, 0,135 mmol) v tetrahydrofuranu (2 ml). Reakční směs se potom míchá po dobu 30 minut, načež se k ní přidá přebytek methanolu (2 ml) a potom ještě silikagel (3 g). Získaná suspenze se zavede na chromatografický sloupec silikagelu a sloupec se eluuje eluční soustavou, tvořenou směsí ethylacetátu, hexanu a methanolu v objemovém poměru 1:1:1. Z odpovídajících frakcí eluátu se izoluje gumovitý produkt, který se vysuší azeotropní destilací s toluenem, přičemž se získá 20,7 mg (63 %) bílého pevného produktu.

/alfa/$^{26}_{D}$ = +114° (c = 0,12, methanol),

^{1}H-nukleární magnetickorezonanční spektrum:
(DMSO–d_6, hodnoty delta v ppm)
3,14 (dd, 1H, J=4,3; 11,9 Hz), 3,42 (dd, 1H, J=5,3; 11,9 Hz), 3,76 (m, 2H), 5,18 (m, 1H), 5,42 (t, 1H, J=4,8 Hz), 6,14 (m, 1H), 7,59 (šir. m, 1H, vyměnitelný), 7,83 (šir. m, 1H, vyměnitelný), 8,20 (d, 1H, J=7,66 Hz).

Příklad 3

Biologická účinnost

i) Antivirální účinnost

Antivirální účinnost sloučeniny z příkladu 1 proti HIV-1 byla stanovena za použití následujících buněčných řad:

buňky C8166, lidská T-lymfoblastoidní buněčná řada, infikovaná kmenem RF HIV-1,

buňky MT-4, lidská leukemická T-buněčná řada, infikovaná kmenem RF HIV-1.

Antivirální účinnost v buňkách C8166 byla stanovena inhibicí tvorby buněčných celků, vzniklých spojením jednotlivých buněk nebo dělením jader bez rozdělení plazmatu (syncytium) (Tochikura a kol. Virology, 164, 542-546), zatímco antivirální účinnost v buňkách MT-4 byla stanovena inhibicí konverze formazanu /Baba a kol. , Biochem Biophys Res Commun., 142, str. 128-134 (1987), Mossman. J. Immun. Meth., 65, str.55-57 (1983)/. Antivirální účinnosti v uvedených buněčných řadách byly také stanoveny analýzou množství antigenu HIV p24, syntetizovaného v přítomnosti nebo absenci enantiomerů. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 1 a v tabulce 2.

Tabulka 1

	50 % antivirální účinnost (μg/ ml)		
	Test:	Formazan	Inhibice tvorby syncytia
	Buňky:	MT-4	C8166
	Vir (HIV-1)	HIV-1 RF	HIV-1 RF
Účinná látka			
(+)–enantiomer		více než 1	0,04
(–)–enantiomer		0,14	0,0018
Meziprodukt 1		0,065	0,013
AZT			0,0038

Tabulka 2

	50 % inhibice syntézy HIV p24(μg/ml)
	Buňky: C8166
	Vir RF
(+)–enantiomer	0,1
(–)–enantiomer	0,0022
Meziprodukt 1	10,011
AZT	0,017

ii) Cytotoxicita

Cytotoxicita sloučeniny z příkladu 1 a racemické sloučeniny (meziprodukt 1) byla stanovena za použití dvou CD4-buněčných řad: H9 a CEM. Sloučeniny, které byly takto testovány, byly sériově zředěny z počáteční koncentrace 100 μg/ml na finální koncentraci 0,3 μg/ml v 96 jamkových mikrotitračních plotnách. Do každé jamky bylo zaočkováno 3,6 x 10^4 buněk (v některých jamkách mikrotitrační plotny jsou přítomné buňky bez účinné látky a tyto jamky slouží jako kontrolní pokusy). Po 5 denní inkubaci při teplotě 37 °C se počty živých buněk stanoví převedením obsahu jamek do hemocytometru a obarvením buněk trypanovou modří. Získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce 3.

Tabulka 3

Účinná látka	50 % cytotoxicita (μg/ml) Buňky CEM	Buňky H9
(+)–enantiomer	217	334
(–)–enantiomer	148	296
Meziprodukt 1	173	232

PATENTOVÉ NÁROKY

1. (–)–Cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–on nebo farmaceuticky přijatelná sůl, ester nebo sůl esteru uvedené sloučeniny.

2. Směs (–)–cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–onu nebo farmaceuticky přijatelné soli, esteru nebo soli esteru uvedené sloučeniny, a (+)–cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–onu nebo farmaceuticky přijatelné soli, esteru nebo soli esteru (+)–cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–onu, ve které je (+)–enantiomer přítomen v množství, nepřesahujícím 5 % hmotn..

3. Směs podle nároku 2, **vyznačená tím**, že (+)–enantiomer je přítomen v množství, nepřesahujícím 2 % hmotn..

4. Směs podle nároku 2, **vyznačená tím**, že (+)–enantiomer je přítomen v množství menším než 1 % hmotn..

5. Farmaceutická kompozice, **vyznačená tím**, že obsahuje (–)–cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–on podle nároku 1 nebo směs podle některého z nároků 2 až 4 společně s farmaceuticky přijatelným nosičem.

6. (–)–Cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–on podle nároku 1 nebo směs podle některého z nároků 2 až 4 pro použití v terapii.

7. Použití (–)–cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–onu podle nároku 1 nebo směsi podle některého z nároků 2 až 4 při výrobě léčiva pro léčení virální infekce.

8. Použití (–)–cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–onu podle nároku 1 nebo směsi podle některého z nároků 2 až 4 při výrobě léčiva pro léčení infekce HIV.

9. Použití (–)–cis–4–amino–5–fluor–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–onu podle nároku 1 nebo směsi podle některého z nároků 2 až 4 při výrobě léčiva pro léčení infekce virem hepatitidy B.

Konec dokumentu

CZ 283765B6
Batch : N93039

Date : 01/02/2006

Number of pages : 18

Previous document : CZ 283764B6

Next document : CZ 283766B6