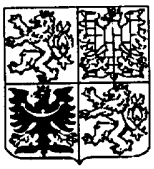
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

285 232

(19)

ČESKÁ REPUBLIKA



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2428-93**

(22) Přihlášeno: **11. 05. 92**

(30) Právo přednosti:
16. 05. 91 GB 91/9110624
08. 10. 91 GB 91/9121381
06. 11. 91 GB 91/9123581

(40) Zveřejněno: **13. 07. 94**
(Věstník č. 7/94)

(47) Uděleno: **15. 04. 99**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **16. 06. 99**
(Věstník č. 6/99)

(86) PCT číslo: **PCT/EP92/01106**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 92/20344**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.[6]:
A 61 K 31/70
// (A 61 K 31/70, A 61 K 31:505)

(73) Majitel patentu:
GLAXO GROUP LIMITED, Greenford, GB;

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

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11196;

(54) Název vynálezu:
Protivirové směsi a farmaceutický prostředek

(57) Anotace:
Nové protivirové směsi obsahují (2R,cis)-4-amino-1-(2-hydroxymethyl-1,3-oxathiolan-5-yl)-1H-pyrimidin--2-on, 3TC, nebo jeho farmaceuticky přijatelný derivát a 3'-azido-3'-deoxythymidin, AZT, nebo jeho farmaceuticky přijatelný derivát, přičemž hmotnostní poměr 3TC k AZT je 250 : 1 až 1 : 250. Farmaceutický prostředek s protivirovým účinkem obsahuje (2R,cis)-4-amino-1-(2-hydroxymethyl-1,3-oxathiolan-5-yl)-1H-pyrimidin-2-on, 3TC nebo jeho farmaceuticky přijatelný derivát a 3'-azido-3'-deoxythymidin, AZT, nebo jeho farmaceuticky přijatelný derivát spolu s farmaceutickým nosičem.

CZ 285 232 B6

Protivirové směsi a farmaceutický prostředek

Oblast techniky

Vynález se týká protivirových směsí s obsahem nukleosidových analogů, kromě této látky směsi obsahují další protivirové látky, s výhodou látky, které jsou účinné proti viru HIV. Součást řešení tvoří také farmaceutický prostředek.

Dosavadní stav techniky

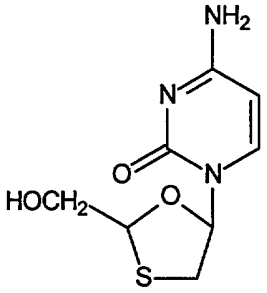
Virus lidské imunodeficience HIV způsobuje řadu klinických stavů včetně získaného syndromu deficience imunitního systému AIDS a chronické neurologické poruchy. Nukleosidy jako AZT, ddC a ddI způsobují inhibici replikace HIV in vitro a mají protivirový účinek na enzym reverzní transkriptázy, pro niž je virus kódem po metabolismu v buňkách za vzniku 5'–trifosfátových derivátů.

AZT snižuje nemocnost a úmrtnost u nemocných s AIDS. Infekce buněk HIV však má za následek integraci genomu viru do chromozomu hostitele a je tedy zapotřebí pokračovat v léčení pomocí AZT po dlouhou dobu. Důsledkem dlouhodobého léčení AZT je však toxicita této látky pro kostní dřeň a vznik variant viru HIV–1, které jsou odolné proti AZT. Podobně také někteří nemocní při léčení ddC mají potíže, související s tímto léčením, například trpí periferní neuropatií a rovněž při podávání ddI vznikají nežádoucí účinky, jako pankreatitida a periferní neuropatie.

Použití směsí účinných látek může vyvolat ekvivalentní protivirový účinek při snížení toxicity nebo zvýšení účinnosti některé účinné látky v případě, že mezi látkami, použitými ve směsi, dochází k synergnímu účinku. Nižší celkové dávky účinných látek patrně také sníží výskyt variant HIV, odolných proti těmto látkám. Byla užita řada různých metod ke zkoumání účinků směsí různých sloučenin. Všechny postupy mají svá omezení, některé metody jsou také prováděny na jiných systémech, než pro které jsou určeny. AZT má synergní protivirový účinek in vitro ve směsi s látkami, které brzdí replikaci HIV–1 v jiné fázi než při reverzní transkripci, jde například o rekombinantní rozpustný CD4 castanospermin a rekombinantní interferon alfa. Je však nutno také uvést, že při kombinacích různých látek může dojít ke zvýšení cytotoxicity. AZT a rekombinantní interferon alfa mají zvýšený cytotoxický účinek na mateřské buňky neporušené lidské kostní dřeně.

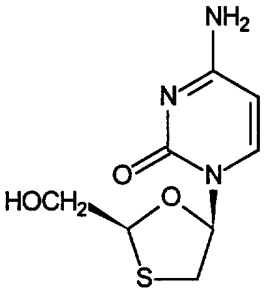
Byla zkoumána také možnost kombinace AZT s dalšími nukleosidy. Při použití ddC dojde ke snížení cytotoxicity vysokých dávek AZT pro kostní dřeň bez ovlivnění protivirového účinku. Při použití ddI a AZT dochází ke zvýšení selektivity synergním protivirovým účinkem, toxicita pro mateřské buňky lidské kostní dřeně se však sčítá.

Bylo popsáno, že sloučenina vzorce I

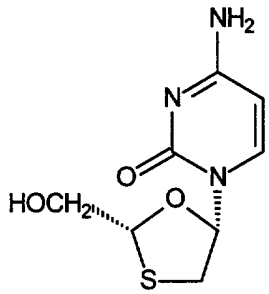


(I)

označovaná také BCH–189 nebo NGPB–21 má protivirový účinek zejména proti virům lidské imunodeficience HIV, které jsou příčinou syndromu AIDS, jak bylo popsáno v publikaci 5th Anti–Aids Conference, Montreal, Kanada, 5. až 9. června 1989, Abstracts T.C.O.1 a M.C.P.63 a také v evropském patentovém spisu č. 382 562. Sloučenina vzorce I je racemickou směsí dvou enantiomerů se vzorcem I–1 a I–2



(I-2)



(I-1)

Přestože enanciomery sloučeniny vzorce I mají proti HIV stejný účinek, jeden z enanciomerů, a to (–)–enanciomer má podstatně nižší toxicitu než (+)–enanciomer.

(–)–enanciomer má chemický název (–)cis–4–amino–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5yl)–(1H)–pyrimidin–2–on. Pokud jde o stereochemii, jde o sloučeninu vzorce I–1 s názvem (2R,cis)–4–amino–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–on. Sloučenina je známa jako 3TC.

Bylo prokázáno, že sloučenina vzorce I a zvláště její (–)–enanciomer má neočekávané výhody v případě použití se známými inhibitory replikace HIV. Zvláště sloučenina obecného vzorce I má synergní protivirový účinek a/nebo dochází ke snížení cytotoxicity při použití v kombinaci se známými inhibitory replikace HIV.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tedy tvoří protivirové směsi, které obsahují (2R,cis)–4–amino–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–1H–pyrimidin–2–on, 3TC, nebo jeho farmaceuticky přijatelný derivát a 3'–azido–3'–deoxythymidin, AZT, nebo jeho farmaceuticky přijatelný derivát, přičemž hmotnostní poměr 3TC k AZT je 250 : 1 až 1 : 250.

Součást podstaty vynálezu tvoří také farmaceutický prostředek s protivirovým účinkem, který obsahuje (2R,cis)–4–amino–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–1H–pyrimidin–2–on, 3TC, nebo jeho farmaceuticky přijatelný derivát a 3'–azido–3'–deoxythymidin, AZT, nebo jeho farmaceuticky přijatelný derivát spolu s farmaceutickým nosičem.

Sloučenina vzorce I se s výhodou užije ve formě svého (–)enantiomeru 3TC.

V případě, že se sloučenina vzorce I uvádí jako (–)–enantiomer, je v podstatě prostá odpovídajícího (+)–enanciomeru, to znamená, že obsahuje nejvýše 5 % hmotnostních (+)–enanciomeru, s výhodou nejvýše 2 a zvláště nejvýše 1 % hmotnostní tohoto druhého enanciomeru.

Pod pojmem „farmaceuticky přijatelný derivát" se rozumí jakákoliv farmaceuticky přijatelná sůl, ester nebo sůl tohoto esteru, která po podání příjemci je schopna přímo nebo nepřímo uvolnit původní látku nebo její metabolit nebo zbytek s protivirovým účinkem.

Je zřejmé, že sloučeninu vzorce I je možno modifikovat za vzniku jejích farmaceuticky přijatelných derivátů, a to na funkčních skupinách základní struktury i na hydroxymethylové skupině oxathiolanového kruhu. Modifikace těchto funkčních skupin rovněž spadají do rozsahu vynálezu. Avšak zvláštní význam mají farmaceuticky přijatelné deriváty, získané modifikací 2–hydroxymethylové skupiny oxathiolanového kruhu.

Výhodnými estery sloučeniny vzorce I jsou také ty sloučeniny, v nichž je atom vodíku 2–hydroxymethylové skupiny nahražen acylovou funkcí obecného vzorce $R-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-$, kde skupina

R esterů, která je odlišná od karbonylové skupiny, se volí ze skupiny atom vodíku, alkyl s přímým nebo rozvětveným řetězcem, jako methyl, ethyl, n–propyl, terc.butyl, n–butyl, dále alkoxyalkyl, jako methoxymethyl, aralkyl, jako benzyl, aryloxyalkyl, jako fenoxymethyl, nebo aryl, jako fenyl, popřípadě substituovaný atomem halogenu, alkylovou skupinou nebo alkoxyskupinou vždy o 1 až 4 atomech uhlíku, dále může jít o sulfonátové estery, a to alkylsulfonyl nebo aralkylsulfonyl, například methansulfonyl, o estery s aminokyselinami, jako L–valyl nebo L–isoleucyl a mono–, di– nebo trifosfátové estery.

Ve svrchu popsaných esterech, není-li uvedeno jinak, obsahují alkylové skupiny 1 až 16 atomů uhlíku, s výhodou 1 až 4 atomy uhlíku. Arylovou skupinou v těchto esterech je s výhodou fenylová skupina.

Vhodnými estery jsou zejména alkylestery o 1 až 16 atomech uhlíku v alkylové části, nesubstituované benzylestery nebo benzylestery, substituované alespoň jedním atomem halogenu, to znamená bromu, chloru, fluoru nebo jodu, alkylovou skupinou nebo alkoxyskupinou vždy o 1 až 6 atomech uhlíku, nitroskupinou nebo trifluormethylovou skupinou.

Farmaceuticky přijatelné soli sloučeniny vzorce I jsou soli, odvozené od farmaceuticky přijatelných anorganických a organických kyselin a zásad. Příkladem vhodných kyselin mohou být kyseliny chlorovodíková, bromovodíková, sírová, dusičná, chloristá, fumarová, maleinová, fosforečná, glykolová, mléčná, jantarová, p–toluensulfonová, vinná, octová, citronová, methansulfonová, mravenčí, benzoová, malonová, naftalen–2–sulfonová a benzensulfonová. Jiné kyseliny, jako kyselina šťavelová nejsou farmaceuticky přijatelné, avšak soli těchto kyselin mohou být použitelné jako meziprodukty pro výrobu sloučenin podle vynálezu a jejich adičních solí s kyselinami, přijatelných z farmaceutického hlediska.

Soli, odvozené od vhodných bází zahrnují soli s alkalickými kovy, například sodíkem, s kovy alkalických zemin, jako hořčíkem, amonné soli a soli typu NR_4^+, v nichž R znamená alkylovou skupinu o 1 až 4 atomech uhlíku.

Sloučenina vzorce I má synergní účinek s druhou složkou, použitou v kombinaci a/nebo je schopna odstranit cytotoxické účinky této druhé složky.

Výhodné účinky sloučeniny vzorce I a druhé protivirové látky je možno pozorovat ve velmi širokém rozmezí poměrů, například 1 : 250 až 250 : 1, s výhodou 1 : 50 až 50 : 1 a zvláště 1 : 10 až 10 : 1. Je vhodné použít každou ze sloučenin v kombinaci v množství, v němž má protivirovou účinnost v případě, že je užita jako taková.

Je možno očekávat, že uvedené kombinace budou obecně použitelné v případě virových infekcí nebo v případě nádorů, spojených s působením virů u lidí. Inhibice infektivity viru nebo nádorového růstu in vitro nebo in vivo spadá rovněž do rozsahu vynálezu.

Virovou infekci u savců včetně člověka je tedy možno léčit tak, že se současně podává protivirová látka vzorce I a inhibitor replikace HIV.

Je zřejmé, že sloučeninu vzorce I a druhou protivirovou látku je možno podávat současně, následně nebo v kombinaci. V případě, že se sloučeniny podávají jedna po druhé, neměl by interval do podání druhé z účinných látek být tak velký, aby došlo ke ztrátě synergního účinku této kombinace. S výhodou se však obě látky podávají současně.

Je zřejmé, že pokud se vyskytuje zmínka o léčení, týká se tato zmínka jak skutečného léčení infekce nebo jejích příznaků, tak profylaktického použití.

Je také zřejmé, že množství uvedené kombinace, které bude k léčení užito, se bude měnit nejen v závislosti na zvolené sloučenině, nýbrž také v závislosti způsobu podání, povaze léčeného onemocnění, věku a stavu nemocného, skutečné dávky určí ošetřující lékař nebo veterinární lékař. Obecně je možno uvést, že vhodná dávka se bude pohybovat v rozmezí 1 až 750 mg/kg, například 10 až 75 mg/kg tělesné hmotnosti za den, jde například o dávku 3 až 120 mg/kg tělesné hmotnosti za den, s výhodou 6 až 90 a zvláště 15 až 60 mg/kg za den pro každou z účinných složek kombinace.

Požadovanou denní dávku je možno podat najednou nebo rozděleně ve vhodných intervalech, například ve dvou, třech, čtyřech nebo větším počtu dávek denně.

Uvedená kombinace se s výhodou podává jako léková forma, obsahující například 10 až 1500, s výhodou 20 až 1000 a zvláště 50 až 700 mg každé z účinných složek v jednotlivé dávce.

V ideálních případech by měla být kombinace podávána tak, aby bylo dosaženo nejvyšší koncentrace každé z účinných složek 1 až 75, s výhodou 2 až 50 a zvláště 3 až 30 mM. Toho je možno dosáhnout například nitrožilní injekcí 0,1 až 5% roztoku účinných složek, popřípadě v roztoku chloridu sodného, nebo perorálním podáním dávky 1 až 100 mg každé z účinných složek. Žádoucí koncentrace v krvi je možno udržovat kontinuální infuzí tak, aby byla dodávána dávka 0,01 až 5,0 mg/kg za hodinu nebo přerušovanou infuzí, obsahující 0,4 až 15 mg/kg každé účinné složky.

I když je k léčebným účelům možno podávat účinné složky kombinace ve formě chemických látek, je výhodné je podávat ve formě farmaceutického prostředku.

Podstatu vynálezu tedy dále tvoří farmaceutický prostředek, který jako svou účinnou složku obsahuje sloučeninu vzorce I nebo její farmaceuticky přijatelný derivát a inhibitor replikace HIV spolu s jedním nebo větším počtem farmaceutických nosičů a popřípadě s dalšími léčivými a/nebo profylaktickými látkami. Nosič musí být „přijatelný“, to znamená kompatibilní s ostatními složkami a neškodný.

Farmaceutické prostředky mohou být určeny pro perorální, rektální, nosní, místní podání (včetně sliznicí dutiny ústní a pod jazykem), vaginální nebo parenterální, například nitrosvalové, podnožní nebo nitrožilní podání nebo mohou mít formu, vhodnou pro podání inhalací nebo

insuflací. Farmaceutické prostředky mohou být připraveny ve formě, rozdělené na jednotlivé dávky a je možno je připravit jakýmkoliv známým způsobem. Při všech postupech se vždy mísí účinná složka s kapalným nebo jemně rozptýleným pevným nosičem nebo oběma typy nosičů a pak se popřípadě výsledný produkt tvaruje.

Farmaceutické prostředky, vhodné pro perorální podání mohou mít tvar jednotek, například kapslí, sáčků nebo tablet, každá z těchto jednotek obsahuje předem stanovené množství účinné složky ve formě prášku, granulátu, roztoku, suspenze nebo emulze. Účinnou složku je také možno zpracovat na jednotku, obsahující větší dávku, na mazání nebo pastu. Tablety a kapsle pro perorální podání mohou obsahovat běžné pomocné látky, jako pojiva, plniva, kluzné látky, desintegrační činidla nebo smáčedla. Tablety je možno povlékat známým způsobem. Kapalné prostředky pro perorální podání mohou mít například formu suspenze, roztoku nebo emulze ve vodě nebo v oleji, sirupu nebo elixíru, nebo může jít o suchý produkt, určený pro smísení s vodou nebo jiným vhodným nosným prostředím těsně před použitím. Kapalné prostředky mohou obsahovat běžné přísady, například činidla, napomáhající vzniku suspenze, emulgátory, nevodná nosná prostředí, například poživatelné oleje nebo také konzervační látky.

Sloučeniny je možno zpracovat také na formy, vhodné pro parenterální podání, například na injekční formy, jako jednorázové injekce větší dávky nebo kontinuální infuze a je možno je ukládat po jednotlivých dávkách do ampulí, předem naplněných injekčních stříkaček, infuzí s malým objemem nebo lahviček, které obsahují větší počet dávek a konzervační činidlo. Farmaceutický prostředek může mít formu suspenze, roztoku nebo emulze v olejovém nebo vodném prostředí a může obsahovat pomocná činidla, jako činidla pro vznik suspenze, stabilizátory a/nebo dispergační činidla. Účinná látka může být dodávána také ve formě prášku, získaného izolací sterilní pevné látky za aseptických podmínek nebo lyofilizací z roztoku, tato forma je určena pro smísení s vhodným nosným prostředím, například sterilní bezpyrogenní vodou těsně před použitím.

Pro místní podání na pokožku je možno zpracovat směs podle vynálezu na mazání, krémy, emulze nebo náplasti pro vstřebání kůží. Mazání a krémy mohou mít vodný nebo olejový základ a mohou obsahovat látky k zahuštění a/nebo pro tvorbu gelu. Emulze mohou být na vodném nebo olejovém základě a budou obvykle obsahovat jeden nebo větší počet emulgátorů, stabilizátorů, dispergačních činidel, činidel pro vznik suspenze, nebo pro zahuštění, nebo také barviva.

Prostředky, vhodné pro místní podání ústní sliznicí jsou například tablety kosočtverečného tvaru, obsahující účinnou složku v ochucené základní hmotě, kterou je obvykle sacharóza a akaciová nebo tragakanthový guma, pastilky, obsahující účinnou složku v inertní základní hmotě, jako je želatina a glycerol nebo sacharóza a akaciová guma a ústní vody, které účinnou složku obsahují ve vhodném kapalném nosiči.

Farmaceutické prostředky, určené pro rektální podání při použití pevného nosiče jsou s výhodou čípky, obsahující jednotlivou dávku účinné látky. Vhodnými nosiči jsou kakaové máslo a další běžně užívané materiály. Čípky se vyrábějí smísením účinné složky se změkčeným nebo roztaveným nosičem nebo nosiči s následným zchlazením a tvarováním ve formách.

Prostředky, vhodné pro podání do pochvy mohou mít formu pesarů, tamponů, krémů, gelů, past, pěn nebo sprejů, obsahujících kromě účinné složky také příslušné typy nosičů.

Pro podání do nosu je možno sloučeniny v kombinaci užít jako kapalné spreje nebo dispergovatelné prášky nebo také ve formě kapek.

Kapky je možno připravit při použití vodné nebo nevodné báze, popřípadě při použití jednoho nebo většího počtu dispergačních činidel, solubilizačních látek nebo činidel pro vznik suspenze. Kapalné spreje se obvykle podávají při použití balení pod tlakem.

Pro podání inhalací je kombinace sloučenin obvykle uložena do insuflačního zařízení, rozprašovače nebo tlakového balení nebo je možno užít jiných běžných prostředků pro tvorbu aerosolu. Tlaková balení mohou obsahovat vhodný hnací plyn, například dichlordifluormethan, trichlorfluormethan, dichlortetrafluorethan, oxid uhličitý nebo jiný vhodný plyn. V případě aerosolu pod tlakem je možno určit dávku zařazením odměrného ventilu.

Při podání inhalací nebo insuflací je možno kombinaci sloučenin použít také v práškové formě, je například možno práškovou kombinaci sloučenin smísit s inertním práškovým nosičem, jako je laktóza nebo škrob. Práškový prostředek může být dodáván ve formě, rozdělené na jednotlivé dávky, jako jsou například želatinové kapsle nebo blistry, z nichž je možno podávat prášek pomocí inhalačního nebo insuflačního přístroje.

V případě potřeby je možno připravit i prostředky s pomalým uvolněním účinné složky.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu mohou obsahovat ještě další účinné složky, například antimikrobiální látky nebo konzervační prostředky.

Sloučeninu vzorce I je možno připravit způsobem podle evropského patentového spisu č. 382 562.

Jednotlivé enanciomery je možno z racemátu získat rozdělením jakýmkoliv způsobem, známým pro dělení racemátů na odpovídající enanciomery, zejména je možno tyto látky získat ze známého racemátu chirální vysokotlakou kapalinovou chromatografií HPLC, enzymaticky zprostředkovaným enancioselektivním katabolismem působením vhodného enzymu, například cytidindeaminázy nebo selektivní enzymatickou degradací vhodného derivátu při použití 5'–nukleotidu. Způsoby výroby 3TC byly popsány v PCT patentové přihlášce č. WO91/17159.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které však nemají sloužit k omezení rozsahu vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Meziprodukt 1

5–methoxy–1,3–oxathiolan–2–methanolbenzoát

Roztok 1,6 g chloridu zinečnatého v 15 ml horkého methanolu se za míchání přidá k roztoku 34,2 g dimethylacetalu merkaptoacetaldehydu a 48,3 g benzoyloxyacetaldehydu v 1300 ml toluenu a směs se pak 50 minut zahřívá pod dusíkem na teplotu varu pod zpětným chladičem. Zchlazená směs se odpaří, zředí malým množstvím toluenu a zfiltruje přes infuzoriovou hlinku. Spojené filtráty a toluen se promyjí dvakrát nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a pak nasyceným vodným roztokem chloridu sodného, vysuší se síranem hořečnatým a odpaří na olej, který se chromatografuje na sloupci s obsahem 2 kg oxidu křemičitého (Merck 9385), jako eluční činidlo se užije chloroform, čímž se získá 45,1 g výsledného produktu ve formě oleje jako směs anomerů v poměru přibližně 1 : 1.

^{1}H–NMR (DMSO–d_6): 3,1 – 3,3 (4H), 3,42 (6H), 4,4 – 4,6 (4H), 5,41 (1H), 5,46 (1H), 5,54 (1H), 5,63 (1H), 7,46 (4H), 7,58 (2H), 8,07 (4H).

IR–spektrum νmax ($CHBr_3$) 1717,6 cm^{-1}.

Meziprodukt 2

(±)–cis–1–(2–benzoyloxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2,4–dion

Směs 9,62 g jemně mletého uracilu, 50 ml hexamethyldisilazanu a 30 mg síranu amonného se zahřívá pod dusíkem na teplotu varu pod zpětným chladičem až do získání čirého roztoku. Roztok se zchladí a pak se odpaří na bezbarvý olej, který se rozpustí pod dusíkem ve 100 ml acetonitrilu. Roztok se přidá k míchanému, ledem chlazenému roztoku 19,43 g 5–methoxy–1,3–oxathiolan–2–methanolbenzoátu (meziprodukt 1) v 600 ml acetonitrilu a pak se přidá ještě 14,7 ml trimethylsilyltrifluormethansulfonátu. Ledová lázeň se odstraní a roztok se zahřívá pod dusíkem 45 minut na teplotu varu pod zpětným chladičem. Po zchlazení a odpaření se odparek čistí chromatografií na sloupci s obsahem 1 kg oxidu křemičitého (Merck 9385), jako eluční činidlo se užije směs chloroformu a methanolu 9 : 1. Příslušné frakce se zchladí a odpaří, čímž se získá surový odparek. Tento odparek se podrobí frakční krystalizaci z co nejmenšího množství, přibližně 1200 ml horkého methanolu, čímž se získá 6,32 g výsledného produktu ve formě bílých krystalků.

^{1}H–NMR (d_6–DMSO): 11,36 (1H, bs), 7,50 – 8,00 (6H, m), 6,20 (1H, t), 5,46 (2H, m), 4,62 (2H, m), 3,48 (1H, m), 3,25 (1H, m).

Meziprodukt 3

(±)–(cis)–4–amino–1–(2–benzoyloxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–on

Postup a)

Suspenze 20,705 g cytosinu a několika miligramů síranu amonného ve 110 ml hexamethyldisilazanu se míchá a zahřívá pod dusíkem 2,5 hodiny na teplotu varu pod zpětným chladičem. Rozpouštědlo se odstraní odpařením a pevný zbytek se rozpustí ve 350 ml bezvodého acetonitrilu. Tento roztok se přenese pomocí ohebné jehly do míchaného, ledem chlazeného roztoku 43,57 g 5–methoxy–1,3–oxathiolan–2–methanolbenzoátu (meziprodukt 1) v 650 ml acetonitrilu pod dusíkem. Pak se přidá 33 ml trimethylsilyltrifluormethansulfonátu, roztok se nechá 1,5 hodiny zteplat na teplotu místnosti a pak se zahřívá přes noc na teplotu varu pod zpětným chladičem. Výsledná směs se odpaří, zředí se 500 ml nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a pak se extrahuje 3 x 500 ml ethylacetátu. Extrakty se spojí, promyjí se 2 x 250 ml vody a 250 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného, vysuší se síranem hořečnatým a odpaří na pěnu, která se chromatografuje na 600 g oxidu křemičitého (Merck 7734), jako eluční činidlo se užije směs ethylacetátu a methanolu, čímž se získá 31,59 g směsi anomerů v poměru přibližně 1 : 1. Směs se nechá krystalizovat ze směsi 45 ml vody a 9,0 ml ethanolu, čímž se získá 10,23 g pevné látky, která se nechá překrystalovat ze 120 ml ethanolu a 30 ml vody, čímž se získá 9,26 g výsledného produktu ve formě bílé pevné látky.

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

^{1}H–NMR (DMSO–d_6): δ 3,14 (1H), 3,50 (1H), 4,07 (2H), 5,52 (1H), 5,66 (1H), 6,28 (1H), 7,22 (2H), 7,56 (2H), 7,72 (2H), 8,10 (2H).

Postup b)

7,0 ml oxychloridu fosforečného se po kapkách za míchání přidá k ledem chlazené suspenzi 11,65 g 1,2,4–triazolu ve 120 ml acetonitrilu a pak se při udržování vnitřní teploty směsi pod 15 °C po kapkách přidá 22,7 ml triethylaminu. Po 10 minutách se pomalu přidá ještě roztok 6,27 g (±)–cis–1–(2–benzoyloxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2,4–dionu (meziprodukt 2) ve 330 ml acetonitrilu. Pak se směs míchá ještě přes noc při teplotě místnosti. Směs se zchladí na ledové lázni a pak se pomalu přidá 30 ml triethylaminu a pak ještě 21 ml vody. Výsledný roztok se odpaří a odparek se dělí mezi 400 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a 3 x 200 ml chloroformu. Chloroformové extrakty se spojí, vysuší síranem hořečnatým, zfiltrují a odpaří, čímž se získá 9,7 g surového odparku. Tento odparek se rozpustí ve 240 ml 1,4–dioxanu a přidá se 50 ml koncentrovaného vodného amoniaku (specifická hmotnost 0,880). Po 1,5 hodině se roztok opaří a odparek se rozpustí v methanolu. Dojde k vysrážení pevné látky, která se odfiltruje. Matečný louh se čistí chromatografií na oxidu křemičitém, užije se 600 g oxidu křemičitého (Merck 9385). Příslušné frakce se spojí a odpaří, čímž se získá 2,18 g produktu ve formě červenohnědožluté pevné látky, produkt je totožný s produktem, získaným postupem za a).

Meziprodukt 4

(±)–(cis)–4–amino–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–on

Suspenze 8,19 g (cis)–4–amino–1–(2–benzoyloxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–onu (meziprodukt 3) a 8,24 g pryskyřice Amberlite IRA–400 (OH) se míchá a zahřívá 1 1/4 hodiny na teplotu varu pod zpětným chladičem. Pevný podíl se odfiltruje a promyje se methanolem. Filtráty se spojí a odpaří. Odparek se rozetře s 80 ml ethylacetátu. Výsledná bílá pevná látka se odfiltruje, čímž se získá 5,09 g výsledného produktu.

^{1}H–NMR (DMSO–d_6): δ 3,04 (1H), 3,40 (1H), 3,73 (2H), 5,18 (1H), 5,29 (1H), 5,73 (1H), 6,21 (1H), 7,19 (2H), 7,81 (1H).

Příklad 1

(–)–cis–4–amino–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–(1H)–pyrimidin–2–on

i) Tři baňky s objemem 50 ml s obsahem živného bujonu (Oxoid Ltd) se naočkují plnou bakteriologickou kličkou Escherichia soli (ATCC 23848), odebranou z plotny živného agaru. Baňky se inkubují přes noc při teplotě 37 °C za protřepávání 250 ot/min a pak se každá baňka užije k naočkování 4 litrů prostředí CDD, obsahující 3 g/l kyseliny glutamové, 0,2 g/l síranu hořečnatého, 2,5 g/l síranu draselného, 2,3 g/l NaCl, 1,1 g/l $NaHPO_4.2H_2O$, 0,6 g/l $NaH_2PO_4.2H_2O$ a 1,2 g/l cytidinu ve fermentoru s objemem 7 litrů. Kultury byly pěstovány při teplotě 37 °C a 750 ot/min za provzdušnění 4 litry za minutu. Po 24 hodinách byly buňky odděleny odstředěním při 5000 g celkem 30 minut, čímž bylo získáno 72 g vlhké hmoty. Tento materiál byl znovu uveden do suspenze v 300 ml 20 mM tris–HCl–pufru o pH 7,5 a buňky byly rozrušeny působením ultrazvuku 4 x 45 sekund. Buněčná drť byla odstraněna odstředěním 30 minut při 30 000 g a bílkovina supernatantu byla vysrážena přidáním síranu amonného do 75% nasycení. Pak byly sraženina oddělena odstředěním 30 minut při 30 000 g a usazenina byla znovu uvedena do suspenze ve 25 ml 100 mM pufru HEPES o pH 7,0 s obsahem síranu amonného až do 75% nasycení. Roztok enzymu byl připraven odstředěním 30 minut při 12 000 ot/min. Supernatant byl odložen a usazenina byla rozpuštěna ve 100 mM tris–HCL–pufru o pH 7,0 na původní objem.

ii) 115 mg meziproduktu 4 se rozpustí ve 100 ml vody a míchá. Pak se přidá 0,5 ml roztoku enzymu a směs se udržuje na stálém pH kontinuálním přidáváním 25 mM kyseliny chlorovodíkové. Přeměna se sleduje chirální HPLC, která prokazuje, že přednostně dochází v substrátu k deaminaci (+)–enanciomeru. Po 22 hodinách je (+)–enanciomer v substrátu (doba retence 12,5 minut) zcela odstraněn a pH roztoku se upraví na 10,5 přidáním koncentrovaného hydroxidu sodného.

Získaný roztok se nechá projít sloupcem QAE Sephadexu s rozměrem 30 x 1,6 cm (A25, Pharmacia) v rovnovážném stavu při pH 11. Sloupec se promyje 200 ml vody a pak se vymývá 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou. Odebírají se frakce po 40 ml a analyzují se pomocí HPLC v reverzní fázi. Frakce 5 až 13, obsahující nezreagovaný (–)–enanciomer se spojí a pH se upraví na 7,5 kyselinou chlorovodíkovou. Frakce 47, obsahující deaminovaný produkt se upraví na pH 7,5 zředěným hydroxidem sodným. Analýzou chirálního HPLC je možno prokázat, že materiál je směsí, tvořenou z 90 % jedním enanciomerem s dobou retence 10,2 minut a obsahuje menší množství druhého enanciomeru s dobou retence 8,5 minut.

iii) Předchozí stupeň za ii) se opakuje ve větším měřítku. 363 mg sloučeniny z příkladu 1 ve 250 ml vody se inkubuje s 0,5 ml roztoku enzymu, připraveného stejným způsobem jako ve stupni i). Další podíly 0,5 ml enzymu se přidají po 18 a 48 hodinách. Reakční směs se míchá 70 hodin a pak se nechá dalších 64 hodin stát. Analýza chirální HPLC prokazuje, že došlo k úplné deaminaci (+)–enanciomeru v substrátu, výsledný roztok byl upraven na pH 10,5 přidáním NaOH.

Získaný roztok byl nanesen na tentýž sloupec QAE a sloupec byl vymýván stejně jako ve stupni i). Frakce 2 až 6, obsahující směs zbylého substrátu a deaminovaného produktu byly spojeny. Frakce 7 až 13, obsahující zbývající substrát, (–)–enanciomer byly rovněž spojeny a pH bylo upraveno na 7,5. Frakce 25 až 26, obsahující deaminovaný produkt byly spojeny a neutralizovány.

Frakce 2 až 6 byly znovu naneseny na tentýž sloupec QAE. Frakce 3 až 11 z tohoto druhého sloupce obsahovaly nezreagovaný substrát, (–)–enanciomer, frakce 70 obsahovala deaminovaný produkt.

iv) Rozdělené frakce ze stupně ii) a iii) byly spojeny a pH bylo upraveno na 7,5. Roztok byl nanesen na sloupec s rozměrem 40 x 2,4 cm s náplní XAD–16 ve vodě. Sloupec byl promyt vodou a jako eluční činidlo pak byla užita směs acetonu a vody v objemovém poměru 1 : 4. Frakce s obsahem požadovaného (–)–enanciomeru byly spojeny a lyofilizovány, čímž bylo získáno 190 mg bílého prášku.

Byly provedeny následující postupy s použitím HPLC.

1. Analytická HPLC v reverzní fázi

sloupec	rozměry 150 x 4,6 mm náplň Spherisorb ODS–2 (5 μM)
eluční činidlo	50 mM dihydrogenfosforečnanu amonného + 5 % MeCN
rychlost průtoku	1,5 ml/min
detekce	UV při 270 nm
doba retence	BCH–189 5,5 min deaminovaný BCH–189 8,1 min.

2. Chirální analytická HPLC

sloupec	rozměry 250 x 4,6 mm náplň Cyclobond I Acetyl
eluční činidlo	0,2 % triethylamoniumacetát o pH 7,2
rychlost průtoku	1,0 ml/min
detekce	UV při 270 nm
doba retence	BCH–189 11,0 a 12,5 min deaminovaný BCH–18í 8,5 a 10,2 min.

Biologická přeměna byla sledována záznamem ubývání z materiálu z vrcholu při době retence 12,5 min a hromadění produktu s dobou retence 10,2 min.

Příklad 2

Protivirový účinek jednotlivé sloučeniny a kombinace

Sloučeniny byly nejprve sériově zředěny na mikrotitračních plotnách s 96 vyhloubeními, každé další ředění bylo dvojnásobné vzhledem k předchozímu ředění. Titrace byly připraveny smísením 25 ml každého ředění sloučeniny jako takové nebo v kombinaci (na konečný objem 50 ml na nových mikrotitračních plotnách s 96 vyhloubeními). Podíly buněk MT–4 (10^6 buněk/ml) v růstovém prostředí RPMI 1640 byly infikovány HIV–1, kmen RF, bylo užito 2 x 10^{-3} infekčních dávek/buňka. Virus byl absorbován 90 minut při teplotě místnosti a pak byly buňky promyty růstovým prostředím RPMI 1640 k odstranění neadsorbovaného viru a znovu uvedeny do suspenze v růstovém prostředí RPMI 1640 v množství 10^6/ml. 50 ml suspenze infikovaných buněk bylo naočkováno do vyhloubení obsahujících účinnou látku nebo pouze živné prostředí. 50 ml suspenze buněk se simulovanou infekcí bylo naočkováno do vyhloubení, neobsahujících účinnou látku. Plotny byly inkubovány 7 dnů při teplotě 37 °C ve vzduchu s 5 % oxidu uhličitého.

Po ukončení inkubace bylo přidáno do všech vyhloubení 10 ml 3–/4,5–dimethylthiazol–2–yl/–2,5–difenyltetrazolimbromidu, MTT s obsahem 7,5 mg/ml této látky a plotny byly inkubovány dalších 90 minut při teplotě 37 °C. Pak bylo přidáno 150 ml roztoku Tritonu X–100 v isopropanolu s koncentrací 10 % objemových a buňky byly znovu uvedeny do suspenze. Po 15 minutách při teplotě místnosti byly plotny analyzovány odečtením na zařízení Multiskan MC (Flow Laboratories, Irvine, UK) při 405 nm. Přeměna žlutého MTT na formazanový derivát je maximální u neinfikovaných neošetřených buněk a nedochází tím u neošetřených infikovaných buněk.

Křivky závislosti účinku na dávce byly vytvořeny pro každou sloučeninu jako takové (hodnoty IC_{50}) a pro reciproční titrace každé sloučeniny při pevné koncentraci druhé látky. Pak byly provedeny isobologramy všech kombinací sloučenin za získání hodnot IC_{50}.

Na obr. 1 až 5 jsou uvedeny isobologramy pro 3 TC v kombinaci s AZT, ddC, ddI, Ro 31–8959 a R–82150 (TIBO). V případě, že hodnota IC_{50} pro kombinaci sloučenin leží na čáře, spojující hodnoty pro každou jednotlivou látku jako takovou, je účinek obou látek aditivní. V případě, že je tato spojnice posunuta do leva, je účinek synergní.

Křivky závislosti odpovědi na dávce pro 3TC v kombinaci AZT, ddC, ddI, Ro 31–8959 a R–82150 (TIBO) jsou uvedeny na obr. 1 až 5.

Při stanovení protivirového účinku těchto kombinací nebyly pozorovány žádné toxické účinky.

Příklad 3

Cytotoxicita sloučenin jako takových a v kombinaci.

Při provádění těchto pokusů byla srovnávána cytotoxicita sloučenin 3TC, AZT a ddC jako takový a v kombinaci (při poměrech mg/ml 1 : 1, 1 : 5 a 5 : 1) pro neinfikované lymfocyty z periferní krve a pro stabilizovanou buněčnou linii T–lymfocyty.

Cytotoxicita byla měřena při použití zkoušky na příjem [^{3}H]–thymidinu. Typické křivky závislosti odpovědi na dávce, získané pro každou jednotlivou sloučeninu nebo pro kombinaci 1 : 1 při použití buněk PBL jsou znázorněny na obr. 6 a 7.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Protivirové směsi, **vyznačující se tím**, že obsahují (2R,cis)–4–amino–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–1H–pyrimidin–2–on, 3TC, nebo jeho farmaceuticky přijatelný derivát a 3′–azido–3′–deoxythymidin, AZT, nebo jeho farmaceuticky přijatelný derivát, přičemž hmotnostní poměr 3TC k AZT je 250 : 1 až 1 : 250.

2. Protivirové směsi podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahují (2R,cis)–4–amino–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–1H–pyrimidin–2–on, 3TC, a 3′–azido–3′–deoxythymidin, AZT, nebo jeho farmaceuticky přijatelný derivát.

3. Protivirové směsi podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že hmotnostní poměr 3TC k AZT je v rozmezí 1 : 10 až 10 : 1.

4. Farmaceutický prostředek s protivirovým účinkem, **vyznačující se tím**, že obsahuje (2R,cis)–4–amino–1–(2–hydroxymethyl–1,3–oxathiolan–5–yl)–1H–pyrimidin–2–on, 3TC, nebo jeho farmaceuticky přijatelný derivát a 3′–azido–3′–deoxythymidin, AZT, nebo jeho farmaceuticky přijatelný derivát spolu s farmaceutickým nosičem.

5. Farmaceutický prostředek podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že je ve formě pro perorální podání.

4 výkresy

FIG. 1

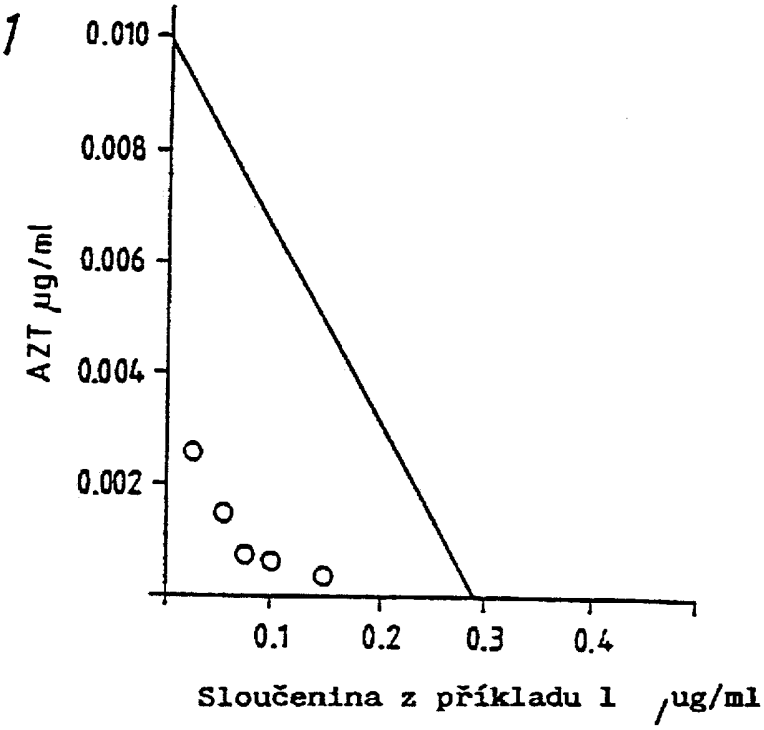

0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
AZT µg/ml
0.1
0.2
0.3
0.4
Sloučenina z příkladu 1 /ug/ml

FIG. 2

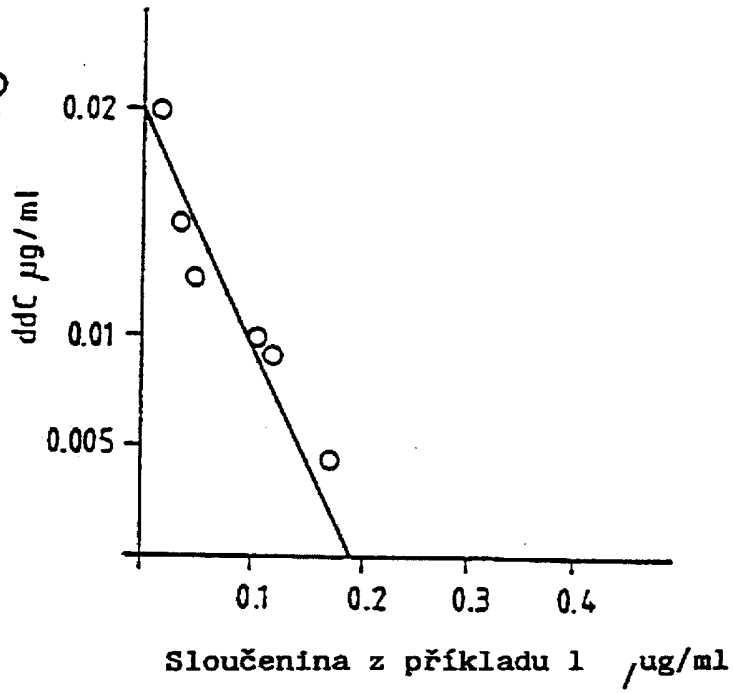

0.02
0.01
0.005
ddC µg/ml
0.1
0.2
0.3
0.4
Sloučenina z příkladu 1 /ug/ml

FIG. 3

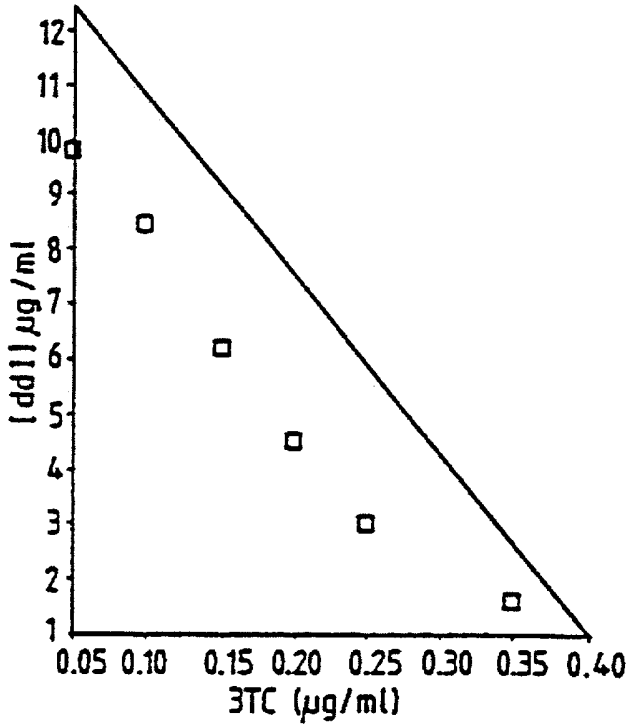

12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
[ddI] µg/ml
0.05 0.10 0.15 0.20 0.25 0.30 0.35 0.40
3TC (µg/ml)

FIG. 4

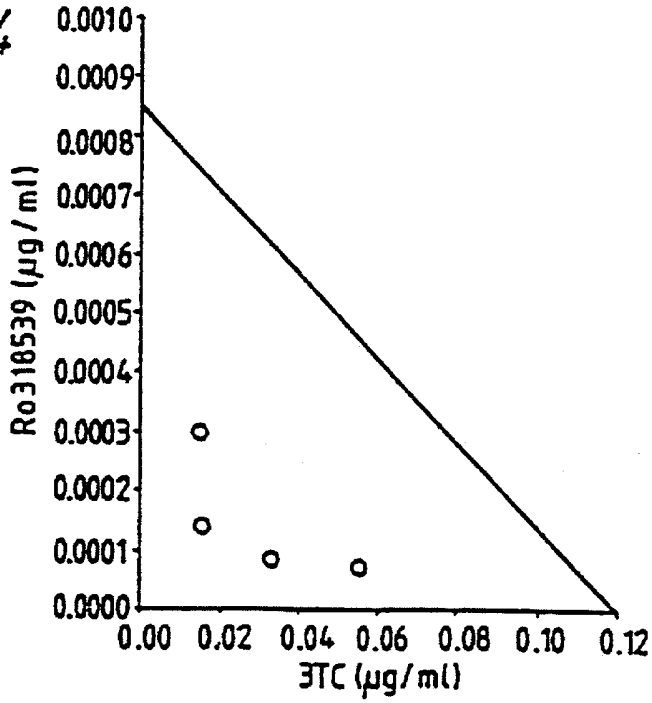

0.0010
0.0009
0.0008
0.0007
0.0006
0.0005
0.0004
0.0003
0.0002
0.0001
0.0000
Ro318539 (µg/ml)
0.00 0.02 0.04 0.06 0.08 0.10 0.12
3TC (µg/ml)

FIG. 5

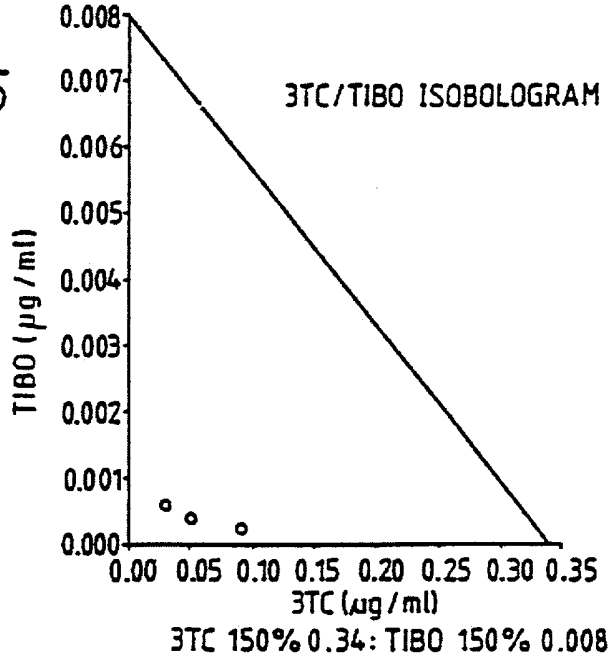
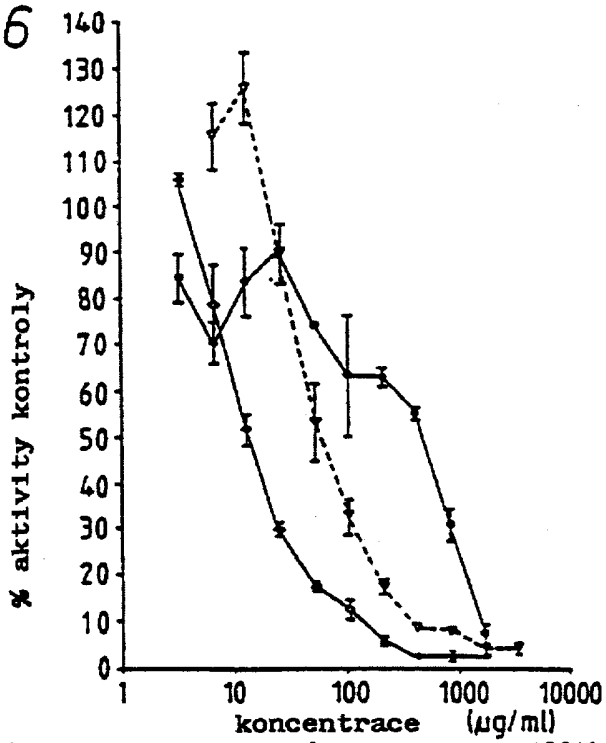
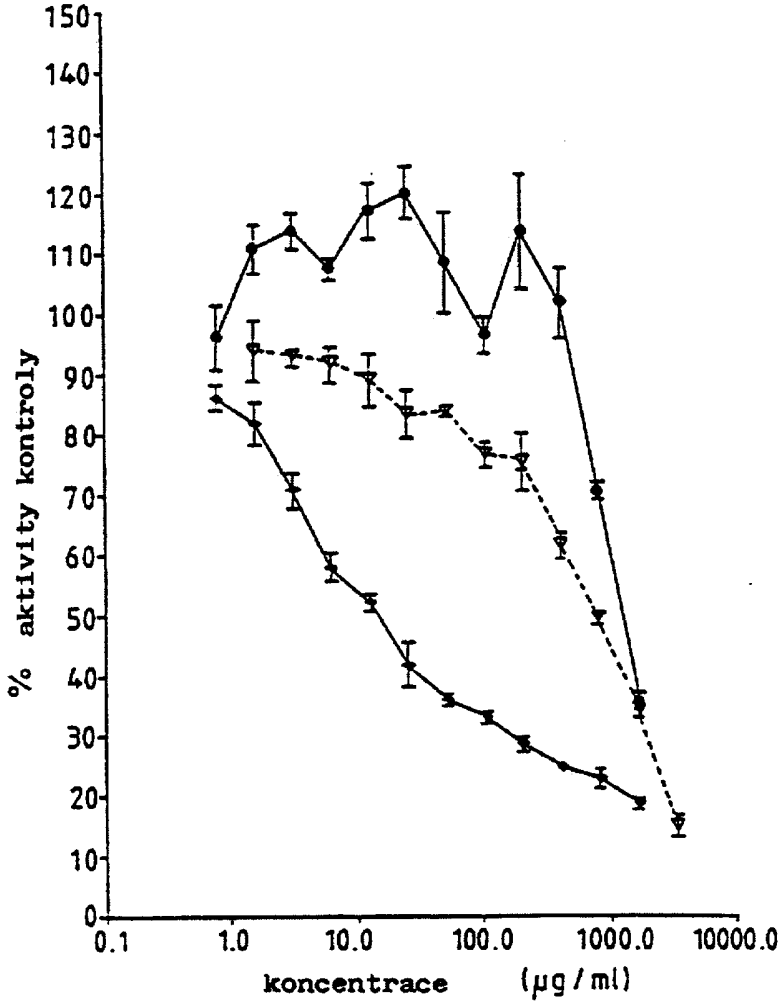


FIG. 6



—•— slouč.z příkladu 1, kontrolní hodnota = 19816 impulsů/min
—○— AZT, kontrolní hodnota 13328 impulsů/min
-·-·- kombinace 1:1, kontrolní hodnota = 13328 impulsů/min

FIG. 7



Konec dokumentu