



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 2568453/23-04

(22) 12.01.78

(46) 30.08.83. Бюл. № 32

(72) М.Н. Преображенская, С.Я. Мельник, А.А. Вахмедова, З.И. Межевич, В.П. Мамаев, О.А. Загуляева, Т.А. Бектимиров, Э.В. Чекунова, О.Г. Анджапаридзе, В.И. Поздняков, Ю.Ф. Майчук и А.И. Щипанова

(71) Онкологический научный центр АМН СССР, Новосибирский институт органической химии СО АН СССР, Московский научно-исследовательский институт вирусных препаратов и Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца

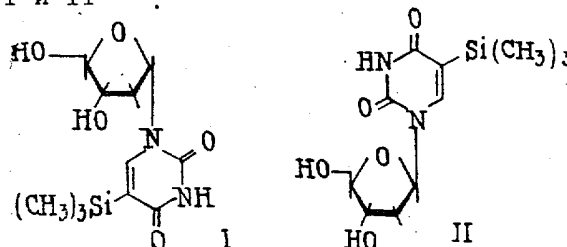
(53) 547.853(088.8)

(56) 1. W.H. Prusoff, D.C. Ward, "Nucleoside analogs with antiviral activity", Biochem. Pharmacol., 25, 1233 (1976).

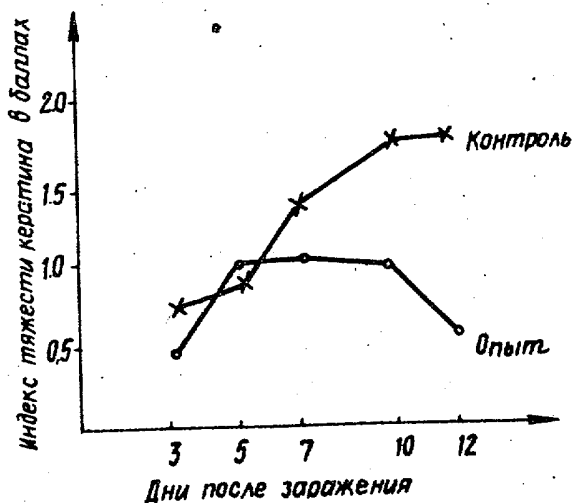
2. M. Hoffer, " α -Thymidin", Chem. Ber., 93, 2477 (1960).

(54) α - и β -ДЕЗОКСИ-D-РИБОФУРАНОЗИДЫ 5-ТРИМЕТИЛСИЛИЛАУРАЦИЛА, ПРОЯВЛЯЮЩИЕ ПРОТИВОВИРУСНУЮ АКТИВНОСТЬ.

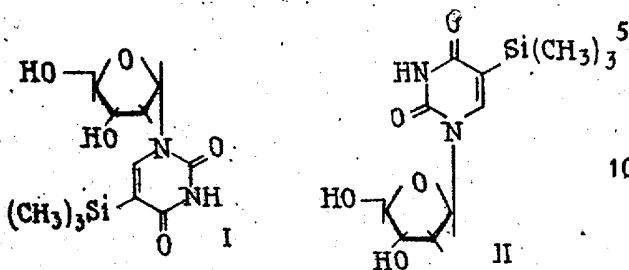
(57) 1- α - и β -Дезокси-D-рибофуранозиды 5-триметилсилилурацила, формулы I и II



проявляющие противовирусную активность.



Изобретение относится к новым химическим соединениям 1- α - и β -дезоксид-рибофуранозидам 5-триметилсилил-урацила формулы I и II



проявляющим противовирусную активность.

Известно применение 5-иод-2'-дезоксигуанидина для лечения вирусных заболеваний герпетической этиологии [1].

Цель изобретения - новые химические соединения: 1- α - и β -дезоксид-рибофуранозиды 5-триметилсилил-урацила, проявляющие противовирусную активность и расширяющие арсенал средств воздействия на живой организм - достигается путем синтеза данных соединений, основанного на известной реакции конденсации триметилсилильных производных урацила с ацилгалогенозой. [2].

Способ получения 1- α - и β -дезоксид-рибофуранозидов 5-триметилсилил-урацила обычно осуществляют превращением 5-триметилсилил-урацила в бис-О-триметилсилильное производное действием гексаметилдисилазана, с последующей конденсацией полученного бис-О-триметилсилильного производного 5-триметилсилил-урацила с 2-дезоксид-3,5-ди-О-п-толуил- α -D-рибофуранозилхлоридом в присутствии SnCl_4 , снятием защитных групп метилатом натрия и разделением изомеров тонкослойной хроматографией обычными приемами.

Пример. 1- α - и β -дезоксид-рибофуранозиды 5-триметилсилил-урацила.

Смесь, состоящую из 3 г (16,3 ммоль) 5-триметилсилил-урацила, 3 мг сульфата аммония и 12 мл гексаметилдисилазана, кипятят в течение 11 ч. Избыток гексаметилдисилазана отгоняют в вакууме, остаток растворяют в 12 мл безводного дихлорэтана и прибавляют к суспензии 5 г (12,9 ммоль) 2-дезоксид-3,5-ди-О-п-толуил- α -D-рибофуранозилхлорида и 0,5 мл (4,2 ммоль) SnCl_4 в 12 мл безводного дихлорэтана. Реакционную массу перемешивают 4 ч при 20-22°C, затем промывают последовательно насыщенным раствором бикарбоната натрия (2x5 мл) и водой. Растворитель отгоняют в вакууме, остаток хроматографируют на пластинках (20x20 см) с силикагелем ЛСЛ₂₅₄ (5-40 мкм (Chemapol, СССР) в системе хлороформ-

метанол (10:1), собирая фракцию с R_f 0,6. Получают 3,5 г (50,7%) 2'-дезоксид-3',5'-ди-О-п-толуил-D-рибофуранозид-5-триметилсилил-урацила. К полученному веществу прибавляют 100 мл 0,1 н раствора метилата натрия в метаноле, через 2 ч реакционную массу нейтрализуют ионообменной смолой Дауэкс-50Wx8 (H^+) до pH 7 по универсальному индикатору, смолу отделяют, растворитель отгоняют в вакууме, остаток (2,56 г) хроматографируют на пластинках с силикагелем в системе этилацетат-метанол (9:1) при двукратном пропускании системы растворителей через пластину.

Из зоны с большей подвижностью выделяют 0,87 г (44,4%) 1- β -D-дезоксид-рибозида 5-триметилсилил-урацила с т.пл. 60-62°C, $[\alpha]_D^{20} +9,9^\circ$ (с 1, спирт). УФ-спектр (96%-ный спирт): $\lambda_{\text{макс}}$ 265 нм, ϵ 9060. ПМР (CD_3OD , TMC): 7,84 м.д. (H_6), 6,31 м.д. (H_1 , $\text{J}_{1'2'}$ 6,6 Гц), 4,42 м.д. (H_3), 3,96 м.д. (H_4 , $\text{J}_{4'5'}$ 3,0 Гц, $\text{J}_{4'5'}$ 3,3 Гц), 3,76 м.д. ($2\text{H}_{5'}$, J_{HH} 12 Гц), 2,27 м.д. ($2\text{H}_{2'}$), 0,21 м.д. (Me_3Si).

Найдено, %: C 47,20; H 6,59; N 9,48; Si 8,97.

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si} \cdot 1/3 \text{H}_2\text{O}$.

Вычислено, %: C 47,03; H 6,80;

N 9,14; Si 9,17.

Из зоны с меньшей хроматографической подвижностью выделяют 0,79 г (40,3%) 1- α -D-дезоксид-рибозида 5-триметилсилил-урацила с т.пл. 64-66°C, $[\alpha]_D^{20} +25,7^\circ$ (с 1, спирт). УФ-спектр (96%-ный спирт): $\lambda_{\text{макс}}$ 265 нм, ϵ 1010. ПМР (CD_3OD , TMC): 7,95 м.д. (H_6), 6,29 м.д. (H_1 , $\text{J}_{1'2'}$ 8,1 Гц, $\text{J}_{1'2'}$ 2,1 Гц), 4,37 м.д. (H_3), 4,28 м.д. (H_4), 3,57 м.д. ($2\text{H}_{5'}$), 2,7 и 2,04 м.д. ($\text{H}_{2'}$ и $\text{H}_{2''}$, $\text{J}_{2'3'}$ 6 Гц, $\text{J}_{2''3''}$ 3 Гц, J_{HH} 15 Гц), 0,23 м.д. (Me_3Si).

Найдено, %: C 46,6; H 6,50; N 9,47; Si 8,98.

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si} \cdot 1/3 \text{H}_2\text{O}$.

Вычислено, %: C 47,03; H 6,80;

N 9,14; Si 9,17.

Определение противовирусной активности.

Противовирусная активность *ин витро* 1- α - β -дезоксид-рибофуранозидов 5-триметилсилил-урацила определяют по следующей методике. Культуры куриных фибробластов в дозе 10 мл вносят в 100-граммовые матрицы Повицкой. Через 48 ч при образовании сплошного монослоя культуры инфицируют вирусом герпеса простого типа 1 или осповакцины с множественностью от 0,01 до 1 ЦПД₅₀ на клетку. После одночасовой инкубации монослой трижды промывают средой 199 и вносят препарат в дозах от 32 до 250 мкг/мл, матрицы помещают при 37°C на 18-20 ч. Каждую дозу препарата и каждую дозу вируса испытывают в двух матрицах. В качестве контроля

служат: а) два матраца с клеточными культурами, инфицированными вирусом, но не обработанные препаратом, б) два матраца, в которые вносят препарат, но культуры не инфицируют вирусом (контроль токсичности препарата). Через 18-20 ч после инфицирования культуры просматривают под микроскопом и трижды замораживают на сухом льду. После последнего оттаивания материал центрифугируют при 1000 об/мин в течение 20 мин. Затем методом титрования на однослойных культурах куриных фибробластов определяют в надосадочной жидкости урожай вируса в опытных и контрольных культурах. Из испытуемых материалов готовят десятикратные разведения на среде 199 и вносят по 1 мл в пробирки с куриными фибробластами. Пробирки инкубируют при 37°C в течение 5 дней и учитывают результаты по цитопатическому действию.

При описанных условиях постановки эксперимента урожай вируса герпеса в контрольных культурах составляет 10^6-10^7 ЦПД₅₀/мл, а вируса осповакцины - $10^{5,0}-10^{6,0}$. При внесении заявленных препаратов урожай вируса в зависимости от дозы препарата и инфицирующей дозы вируса снижается на 2-5 лг ЦПД₅₀. Препараты оказывают не только профилактическое, но и лечебное действие. Выраженной профилактической и лечебной эффективностью обладают дозы 62 мкг/мл и более.

Тимидин снимал ингибирующее действие описанных соединений при внесении в клеточные культуры в эквивалентных концентрациях, что приводило к полному восстановлению репродукции вируса герпеса.

Описанные соединения не являются токсичными для клеток, поскольку они не вызывали видимых цитопатических изменений в неинфицированных клетках при 7-дневном наблюдении. При внутривенной инъекции мышам ЛД₅₀ препарата составляла более 400 мг/кг веса животного.

Данные о противовирусной активности заявляемых препаратов приведены в табл. 1, 2 и 3.

Т а б л и ц а 1

Ингибирующее действие 1- α -дезоксидеоксирибозиде 5-триметилсилилурцила (α -дезоксидеоксирибозиде) на вирус герпеса при внесении в клеточные культуры через 1 ч после инфицирования.

Множественность инфицирования в ЦПД ₅₀ /клетку	Доза препарата, мкг/мл	Число ЦПД ингибируемых препаратом
1	2	3
1	125-250	10^3
0,1	250	10^5

Продолжение табл. 1

1	2	3
0,01	250	10^5
	125	10^4
	62	10^4

Т а б л и ц а 2

Ингибирующее действие α -дезоксидеоксирибозиде на вирус осповакцины при внесении в клеточные культуры через 1 ч после их заражения

Множественность инфицирования в ЦПД ₅₀ /клетку	Доза препарата, мкг/мл	Число ЦПД ₅₀ ингибируемых препаратом
0,1	250	10^3
	125	10^2
0,01	250	10^3
	125	10^3
	62	10^2

Т а б л и ц а 3

Ингибирующее действие 1- β -дезоксидеоксирибозиде 5-триметилсилилурцила (β -дезоксидеоксирибозиде) на вирус простого герпеса при внесении в клеточные культуры через 1 ч после их заражения

Множественность инфицирования в ЦПД ₅₀ /клетку	Доза препарата, мкг/мл	Число ЦПД ₅₀ ингибируемых препаратом
1	125-250	10^2
0,1	250	10^3
	62-125	10^2
	31	не ингибирует

Лечебную эффективность α -дезоксидеоксирибозиде in vitro определяли по следующей методике. Культуры куриных фибробластов инфицируют вирусом простого герпеса с множественностью 0,1 ЦПД₅₀ на клетку. Через 4 ч инкубации культуры трижды промывают средой 199 и вносят препарат в дозе 250 мкг/мл. Далее опыт проводят по описанной

выше методике. Урожай вируса в контрольных культурах составляет 10^7 ЦПД₅₀/мл, а в культурах, обработанных препаратом, он равен 10^3 ЦПД₅₀/мл т.е. препарат ингибировал урожай вируса на 4 лг ЦПД₅₀/мл.

Способность тимидина снимать ингибирующее действие α -дезоксирибозидов определяется по следующей методике. Клеточные культуры заражают вирусом герпеса с множественностью 0,1 ЦПД₅₀ на клетку, после одночасовой инкубации монослой трижды промывают раствором Хенкса и вносят в клеточную культуру последовательно α -дезоксирибозид 15 и тимидин в эквимоллярных концентрациях (по 250 мкг/мл). Эквимоллярные концентрации тимидина практически полностью снимают ингибирующий эффект препарата, что приводит к полному восстановлению репродукции вируса герпеса до 10^7 ЦПД₅₀/мл.

Учитывая высокую противовирусную активность α -дезоксирибозидов *in vitro*, была исследована его терапевтическая эффективность *in vitro* при экспериментальном герпетическом кератите кроликов.

Препарат применялся в виде инстилляций 6 раз в сутки водного раствора в 0,5%-ной концентрации. Предварительно в течение 10 дней изучалась

переносимость 0,5%-ного раствора препарата тканями глаз кроликов. Токсико-аллергических осложнений не наблюдалось.

5 Изучение терапевтической эффективности препарата проведено на 10 кроликах. Из них 5 были контрольными, которыми 6 раз в сутки проводилась инстилляцией дистиллированной воды. Заражение осуществляют по общепринятой методике путем скарификации роговицы и внесения в конъюнктивальную полость глаз кроликов. Лечение начиналось на 5 сутки от момента заражения, когда развивалась типичная картина герпетического точечного кератита. Об эффективности препарата судили по степени снижения индекса тяжести герпетического кератита в баллах в опытной группе по сравнению с контрольной.

20 На чертеже представлены результаты исследования. Как видно из чертежа, уже на вторые сутки от начала лечения отмечается задержка процесса в опытной группе и прогрессирование в контрольной. В последующие сутки разница между лечеными и контрольными глазами возрастает.

25 Таким образом, экспериментальные данные указывают на выраженное противовирусное действие α - и β -дезоксирибозидов, при сравнительно низкой токсичности.

Редактор П. Горькова Техред В. Далекокорей Корректор И. Эрдей

Заказ 8036/2 Тираж 387 Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4