

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.³
C12P 19/38

(45) 공고일자 1984년10월26일
(11) 공고번호 84-001959

| | | | |
|------------|---|-----------|---------------|
| (21) 출원번호 | 특1981-0001391 | (65) 공개번호 | 특1983-0005221 |
| (22) 출원일자 | 1981년04월22일 | (43) 공개일자 | 1983년08월03일 |
| (30) 우선권주장 | 8013413 1980년04월23일 영국(GB) | | |
| (71) 출원인 | 더 웰컴 파운데이션 리미티드 | 미첼 페터잭슨 | |
| | 영국, 엔, 더블유, 1, 런던, 유스톤로우드 183-193 | | |
| (72) 발명자 | 토마스 안소니 크레니츠키 미합중국, 노오스 캐롤라이나 27514, 채플힐, 로렐힐로우드 106 제니트 리스터 리듀트 미합중국, 노오스 캐롤라이나 27607, 롤리, 모닝 사이드 드라이브 3101 | | |
| (74) 대리인 | 이필모 | | |

심사관 : 백남훈 (특자공보 제1003호)

(54) 4-치환-1-β-D-리보퓨라닐-1H-이미다조-(4,5-C)-피리딘의 제조방법

요약

내용 없음.

명세서

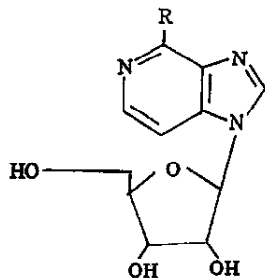
[발명의 명칭]

4-치환-1-β-D-리보퓨라닐-1H-이미다조-(4,5-C)-피리딘의 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 이미다조-(4,5-C) 피리딘유도체의 제조에 관한 것이다. 본 발명은 특히 4-치환-1-β-D-리보실이미다조-(4,5-C)피리딘의 제조에 관한 것이다.

하기식(I)의 4-치환-1-β-D-리보실이미다조-(4,5-C) 피리딘 약리적으로 활성인 화합물이다.



(I)

예를들면, 3-디아자데노신, 4-아미노-1-β-D-리보퓨라노실-1H-이미다조(4,5-C)피리딘(상기식(I)에서 R=NH₂인 화합물)은 생물학적 효능을 지닌 화합물로서 관심의 대상이었다(P.K. Chiang et al., Molec. Pharm. 1977, 13, 939-947 참조).

특히 3-디아자아데노신은 항병소 및 항비루스치료제(미국특허 제4,148,888호) 및 면역억제제(유럽특허출원 제79,103947.2호)로서 공지되어 있다.

4-클로로-1-β-D-리보퓨라노실-1H-이미다조-(4,5-C)피리딘(상기식(I)에서 R=Cl인 화합물)은 상기의 4-아미노유도체를 포함하는 상기식(I)화합물제조에서 중요한 중간물질로서 하기 문헌에 명시되어 있다.

Mizuno et al., Chem. Pharm. Bull 1968, 16,2011; Montgomery & Townsend, J. Med. Chem. 1966, 9, 105; Rosseau et al., Biochemistry 1966, 5, 5,576.

관심을 끄는 상기식(I)의 기타화합물로서 4-메르캅토와 4-티오메틸 유도체를 들 수 있다 (Montgomery & Townsend, Supia).

이러한 4-치환-1-β-D-리보퓨라노실-1H-이미다조-(4,5-C)피리딘의 효능은 용이하게 제조되지 않는다는 이유에 의해 제한된다. 통상의 제조경로는 선택된 중간물질(특히, 4-클로로유도체, 상기식(I)에서 R=Cl인 화합물)을 종래의 유기화학적 방법에 의해 리보실화한후, 4-위치의 치환체를 변화시키는

방법에 따른다.

그러나, 리보실화단계의 수율은 비교적 낮고 (30-40%), 반응은 불확실한 구조의 생성물에 이르는 입체화학적으로 비특정적이며 막대한 정제공정이 요구된다. 더우기, 이러한 화학적반응은 대규모생산에 적합하지 않다.

이러한 4-치환화합물 특히 4-아미노화합물의 개량합성에 대한 시도가 계속되어 왔다. 예를 들면 메이엔드 타운센드, J.C.B. Chem. Commun., 1973, 64에 기술된 바와같이 리보실화를 4,6-디클로로-1H-이미다조(4,5-C)피리딘(III)상에서 실시하는 것이다. 이러한 리보실화단계의 수율은 46%로 증가하는 반면, 중간물질(III)을 용이하게 얻을 수 없으며 리보실화 단계에서 얻은 생성물을 상기식(I)화합물로 변화하기 위한 부가단계가 필요하다는 단점이 나타났다. 이러한 화학적 방법은 상기 언급된 방법에서와 같은 단점도 발생한다.

화학적방법에 의한 퓨린뉴클레오사이드의 제조에 대한 문제는 일반적으로 인식되어 있으며, 퓨린염기와 함께 효소펜토실화에 의해 극복될 수 있는데(유럽특허 제78101295.0호 참조), 퓨린뉴클레오사이드 포스포릴라제가 촉매로 사용된다.

효소는 높은 특이성을 가지며 기질에서의 조그만 변화가 반응을 촉매하는 효소활성에 커다란 영향을 준다는 것은 공지된 사실이다. 질소원자의 헤테로 사이클링시스템에서 제거 또는 첨가에 의한 퓨린염기의 변화에 의해 퓨린뉴클레오사이드 포스포릴라제에 대한 기질로서 작용하는 염기의 활성에 영향을 준다는 것이 보고되어 있다. 따라서, 많은 3-디아자퓨린은 포유동물의 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제에 대한 기질이 아니며(Townsend et al., Lectures in Heterocyclic Chemistry Vol. 4, Supplement to J. Hetero. Chem. 1978, 15, S-19-S-95), 또한 7-디아자아데노신, 7-디아자이노신 및 8-아자구아노신은 미생물의 퓨린뉴클레오사이드 포스포릴라제에 대한 기질이 아니다(Doskocil and Holy, Coll. Czech. Chem. Commun., 1977, 42, 370-370-383). 더우기 3-디아자퓨린 뉴클레오사이드는 이의 푸린카운터파트와 다른 구조를 갖는데(Lndemann et al., A. Naturforsch 1978, 33C, 305-316; May et al., J. Amer. Chem. Soc., 1976, 98, 825-830), 퓨린과 3-디아자퓨린은 관련된 효소계에서 다른 행동을 할 것이다.

본 발명가들은 4-치환-1H-이미다조(4,5-C)피리딘이 리보실화 반응에서 수율이 좋고 대규모생산에 적합한 종래의 화학적 방법보다 좋은 효소방법에 의해 용이하게 리보실화합을 알게 되었다.

따라서 본 발명은 4-치환-1H-이미다조(4,5-C)피리딘과 리보소스-1-포스페이트 및 포스포릴라제형 효소로 이루어지는 리보오스공여체 시스템과의 반응으로 구성되는 4-치환-1-β-D-리보푸라노실-1H-이미다조(4,5-C)피리딘의 제조방법에 관한 것이다.

4-치환체는 최종생성물에서 필요한 어떠한 치환체도 가능하며, 본 발명에 있어서 치환체의 화학적성질은 리보실화에 거의 영향을 주지않으나 종래의 화학적방법에 있어서는 4-치환체의 성질은 리보실화 반응과정에서 매우 큰 영향을 주었다. 특히 관심이 있는 치환체는 할로겐, 아미노리올, 알킬티오 및 치환된아미노(벤질아미노 및 벤즈히드릴아미노와 같은 보호아미노기와 저급(C₁₋₆)알킬아미노 포함)치환체이다.

상기식(I)의 화합물중에서, 4-다미노-1-β-D-리보푸라노실-1H-이미다조-(4,5-C)피리딘(R=NH₂)이 특히 흥미로운 화합물이고, 이 화합물은 4-아미노-1H-이미다조-(4,5-C) 피리딘을 리보실화시킴으로써 직접 제조할 수 있는데, 이 방법은 종래 화학적방법에 의해서는 실시되지 않는 방법이다.

또한, 본 발명의 상기식(I)의 4-아미노화합물은 아미노기가 벤질 또는 벤질히드릴과 같은 블록킹기에 의해 보호된 화합물을 리보실화시킨후 라니니켈, 액체암모니아 또는 수소가스에 존재하는 금속나트륨 및 적당한 촉매를 사용하는 환원반응과 같이 종래의 방법에 의해 블록킹기를 제거함으로써 제조된다.

또한 본 발명의 4-아미노화합물은 종래방법중의 리보실화단계를 수정함으로써 제조된다. 이러한 방법은 4-클로로-1H-이미다조(4,5-C) 피리딘을 리보실화후 클로로기를 아미노기로 전환시키는 방법을 의미한다. 이러한 전환은 직접아민화와 같은 종래 기술에 의하거나 4-아미노화합물을 얻기 위해 4-히드라지노 유도체로 전환시킨후 수소화하는 방법에 의해 실시된다. 또한, 클로로 화합물을 벤질아미노 또는 벤즈히드릴아미노와 같은 보호된 아미노기로 전환하고 블록킹기를 상기 언급된 바와같이 제거하여 얻을 수도 있다.

또한, 본 발명은 R이 할로겐 또는 보호된 아미노기인 상기식(I)화합물을 효소적 리보실화시킨후, 4-치환체를 아미노기로 전환시키는 단계로 구성되는 4-아미노-1-β-D-리보푸라노실-1H-이미다조(4,5-C)피리딘의 제조방법에 관한 것이다.

여기에 기술한 발명에 필요한 리보오스-1-포스페이트는 이미 공지된 문헌(Wright, R.S.와 Khorana, H.G., J. Am. Chem. Soc., 78, 811(1956))의 합성방법에 따라 제조될 수 있지만 리보실공여체 및 무기 인산염으로부터 효소적으로 발생된 리보오스-1-포스페이트를 얻는 것이 편리하고 유익하다. 효소 반응으로부터 리보오스-1-포스페이트를 유리시키거나 또는 리보오스-1-포스페이트를 화학적으로 합성시킨후 형성된 이를 출발물질로서 사용하는 것과 같이 반응을 분리시켜 실시할 수도 있지만 리보오스-1-포스페이트 중간물질의 형성에 의한 "1포트(One pot)"에 의해 두 반응을 동시에 실시하는 것이 훨씬 유리하다. 그러므로 결합된 반응의 유효결과는 리보뉴클레오사이드 공여체의 리보실부를 유리 3-디아자퓨린염기에 이동시켜 원하는 리보뉴클레오사이드를 얻은 것이다.

리보실부 공여체는 퓨린리보뉴클레오사이드(아데노신), 피리미딘 리보뉴클레오사이드(우라실 리보뉴클레오사이드) 또는 여러 리보뉴클레오사이드와 비-뉴클레오사이드 물질의 혼합물이다. 그러나 본 발명의 목적을 위해 리보실부 공여체는 비-뉴클레오사이드가 거의 없으며 피리미딘 리보뉴클레오사이드인 것이 바람직하다.

공여체로서 피리미딘 리보뉴클레오사이드가 사용에 바람직한 이유는 2가지 이유때문이다. 첫째로,

리보뉴클레오사이드공여체의 성질이 원하는 생성물의 성질과 크게달라 정제가 용이하다. 두번째로, 반응도중 유리된 공여체염기가 생성물 합성과 관련된 효소(퓨린뉴클레오사이드 포스포릴라제)에 대한 촉매자리에 있어서 수용체염기와 공여체 염기사이엔 덜 경쟁적인 결과를 주는 것이 퓨린보다는 피리미딘이기 때문이다.

피리미딘 리보뉴클레오사이드 공여체 및 퓨린뉴클레오사이드 공여체는 공지된 방법, 예를들면 R.D.J. Biol. Chem., 175,315(148)에 기술된 방법에 의해 제조될 수 있다.

여기에 기술한 두가지 반응은 미생물 및 포유동물조직에 존재하는 여러 효소에 의해 촉매된다. 예를 들면 리보뉴클레오사이드공여체의 인산분해는 공여체가 퓨린리보뉴클레오사이드인 경우 퓨린뉴클레오사이드포스포릴라제에 의해, 또는 공여체가 피리미딘 리보뉴클레오사이드인 경우 피리미딘뉴클레오사이드 포스포릴라제, 티미딘 포스포릴라제 또는 우리딘포스포릴라제에 의해 촉매된다. 원하는 3-디아자퓨린 리보뉴클레오사이드를 3-디아자퓨린과 리보오스-1-포스페이트로부터 합성시키는 두번째 반응은 퓨린뉴클레오사이드포스포릴라제에 의해 촉매된다.

필요한 리보실이전 효소계는 후자, 즉 퓨린뉴클레오사이드 포스포릴라제 단독으로 또는 리보실공여체가 피리미딘 또는 피리미딘 유사물의 리보뉴클레오사이드인 경우 전자, 즉 피리미딘 뉴클레오사이드 포스포릴라제, 티미딘포스포릴라제 또는 우리딘포스포릴라제중 어느 하나와 조합된 조성물로 구성된다.

상기한 바와같이, 반응의 촉매에 필요한 효소는 포유동물조직 및 여러미생물조직에서 발견된다. 그러나, 본 발명의 목적을 위해 B. 스테아로테르모필루스 특히 E. Coli B와 같은 에어로빅박테리아 (No. ATCC 11303 기탁된 미국형 배양액 수집으로부터 쉽게 이용할 수 있음)는 상기 효소의 우수한 공급원이다. 효소를 제공하는 박테리아는 여러조건하에서 배양된다. 그러나, 글루코스타당을 함유하는 매체는 박테리아세포내의 뉴클레오사이드 포스포릴라제 효소의 농도가 글루코스존재하에 낮아 지므로 좋지않다.

조(粗) 효소생성은 정제방법이보다 부적당하다. 이것은 조생성물이 본 발명의 공정에 필요한 효소이외에 다른 물질뿐만아니라 다른 효소 및 핵산과 같은 곤혹스러운 물질을 함유하기 때문이다. 조생성물중의 이들 효소는 기질 및 생성물을 바람직하지 못한 변화로 촉매시키고, 필요한 효소자체를 단백질 분해시킨다. 이러한 요인은 원하는 생성물의 수율을 저하시킬 뿐만아니라 반응혼합물로부터의 분리를 어렵게 한다.

대부분의 경우에, 반응혼합물에 첨가하기전에 조효소생성물을 정제하는 것이 필요하다. 이러한 정제는 기술상 잘 알려진 방법으로 할 수 있다. 예를들면, 원하는 효소를 이온교환크로마토그래피와 칼슘포스페이트겔의 처리에 의해 세포추출물로부터 분리 또는 농축시켜 얻는다. 또한 세포추출물을 칼슘포스페이트겔처리전에 스토렘토마이신 또는 뉴클레아제(DNA ase+RNA ase) 또는 이온교환크로마토그래피전에 뉴클레아제(DNA ase+RNA ase)로 처리하기도 한다. 뉴클레아제처리는 4 내지 40°C 특히 25°C의 온도조건하에서 유리하게 실시된다. 겔여과는 비교적 소량의 액체를 포함할 경우에만 정제의 최종단계로 사용한다.

효과적인 상태와 농도로 만든 효소는 전술된 반응을 촉매하기 위해 사용한다. 전형적인 반응혼합물은 리보실공여체, 3-디아자 퓨린염기, 무기인산염(디포타슘수소인산염(K_2HPO_4)) 및 수용액 또는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 아세톤, 메틸에틸케톤, 에틸아세테이트, 톨루엔, 테트라하이드로퓨란, 디옥산, 디메틸설폭사이드, 트리클로로메탄, 셀로솔브와 같은 유기용매를 50% 이하로 함유한 매체에 존재하는 효소로 구성되어 있다. 바람직한 농도는 0.001-2,000mM, 바람직하게는 1내지 200mM이다.

반응은 중성 pH 즉 5내지 9 특히 6내지 8.5와 3내지 70 °의 온도에서 실시된다. 퓨린리보뉴클레오사이드의 글리코시딕 결합이 산조건 특히 높은온도에서 이루어지고 효소는 온도와 pH가 초과되면 불안정하게되므로 완만한 조건(mild condition)이 바람직하다. 효소의 바람직한 농도는 사용한 리보실공여체 및 수용체와 기질에 대한 효능과 반응진행에 필요한 시간에 따라 다르다. 어떤 경우에 수용액에서의 생성물의 불안정때문에 반응시간 감축을 위해 효소를 많이 사용하기도 한다. 사용하는 효소의 순도는 편리한대로 한다. 조추출물은 원하는 반응을 촉매화하지만 생성물수율은 보통 낮고 분리는 정제효소를 사용한 경우보다 어렵다. 만일 효소를 암모늄설페이드 현탁액에 보관하면 현탁액으로부터 원심분리하여 반응액에 가하는 것이 바람직하다.

효소는 반응혼합물로부터 회수한다. 예를들면 반응이 만족할 만한 지점에 도달한후, 셀룰로오스상의 배지흡착시키고, 계속해서 반응혼합물의 겔여과 또는 원심분리에 의해 반응혼합물의 용해성 성분을 제거시킴으로써 효소를 회수할 수 있다. 어떤 경우에는, 생성물을 반응혼합물로 침전시킨후 침전물을 제거하자마자 생성물이 다시 형성될 수 있도록 반응유도체에 더 많은 출발물질을 첨가하는 방법에 의해 효소를 재순환시키기도 한다.

일반적으로 모든 성분은 서스펜션 또는 용액에 포함되나, 높은 가용기질이 사용될때 효소가 DEAE-셀룰로오스에 흡착된 경우와 같이 적당한 효소가 고정되어 있는 고정상을 함유한 칼럼을 통해 효소를 제외한 반응혼합물성분의 용액이 통과하는 또 다른 방법이 사용되는 것이 바람직하다. 30일까지 또는 이 이상까지 반응시간을 연장시킴으로써 효소를 보존시킬 수 있다는 것을 알았다. 그러나, 하루 이상 배양된 반응혼합물에 있어서, 반응혼합물이 공지된 기술의 여과에 의해 멸균되지 않는 경우, 반응혼합물에 소듐 또는 포타슘칼륨, 또는 톨루엔과 같은 항균성 치료제가 함유되는 것이 바람직하다.

원하는 퓨린리보뉴클레오사이드는 화합물의 혼합물을 각각의 화합물로 분리하는 공지된 방법으로 회수 또는 분리할 수 있다. 예를들면, 분리는 필요한 최종생성물과 불순물 사이의 여러가지 용매중에서의 용해도차이, 두 용매층사이의 분배율차이, 이온교환수지와 같은 흡착력의 차이, 폴리아크릴아미드와 같은 가교수지를 통한 통과율차이, 용매로부터의 결정도 차이를 사용하여 분리할 수 있다.

생성물을 반응혼합물로부터 결정화시키는 경우에 있어서는 생성물을 원심분리, 또는 여과에 의해 수집한다. 사실상, 분리를 위한 이러한 방법은 생성물의 정도 및 필요한 순도에 의해 조합하거나 반복하여 실시한다.

[실시예 1]

4-아미노-1-β-D-리보퓨라노실-1H-이미다조(4,5-C)피리딘의 제조

4-아미노-1H-이미다조(4,5-C)피리딘(2.4밀리몰), 유리딘(7.2밀리몰), K_2HPO_4 (2.8밀리몰), 포타슘아지드(0.14밀리몰), 퓨린뉴클레오사이드포스포릴라제 (1,120IU)(유럽특허출원 제78101295.0호에 의한 방법으로 제조) 및 *Escherichia coli*(Krenitsky, T.A., *Biochem. Biophys. Acta*, 1976, 429, 352-358)로부터 정제한 유리딘 포스포릴라제(156 IU)를 함유하는 서스펜션수용액(30ml)으로 이루어지는 반응혼합물을 만든다. 그리고 반응혼합물의 pH는 효소첨가전에 수산화칼륨을 사용하여 7.0으로 조정한다. 37°C에서 15일후에, 반응혼합물을 여과하고, 48,000×g로 3°C에서 10분간 원심 분리한다. 표면에 떠오르는 부유물은 세파스 G-10컬럼(2×90cm)에 적용시킨다. 이 컬럼을 물로 용출시킨다. 생성물(TLC/ H_2O)을 포함하는 부분은 조합한후 진공에서 부피를 40ml로 감소시킨다. n-프로판올(20ml)을 용액에 가한다. 여과후에, 용액을 폴리아크릴아미드로 감싼컬럼(P-2, Bio Rad Laboratories 5×90cm)에 가하고 30%의 n-프로판올로 용출시킨다.

30%의 n-프로판올 3리터로 용출후, 30%의 n-프로판올 중의 중탄산암모늄 포화용액 50ml를 컬럼에 가하고 30% n-프로판올로 용출시킨다. 생성물을 용출하고 감압건조한다. 건조물질을 물(5ml)에 용해하고 세파덱스 G-10컬럼(2×90cm)에 가한후 물로 용출한다. 생성물을 함유한 부분은 동결건조시켜 반수화물로서 4-아미노-1-β-D-리보퓨라노실-1H-이미다조(4,5-C)피리딘을 얻는다.

$C_{11}H_{14}N_4O_4 \cdot 1/2H_2O$ 의 분석

이론치 : C, 48.00; H, 5.49; N, 20.35%

실측치 : C, 48.05; H, 5.51; N, 20.40%

| U.V. 스펙트리(nm) | 최대 | 최소 | 쇼울더(shoulder) |
|---------------|-------|-----|---------------|
| 0.1NHCl | | 262 | 230 275 |
| 0.1N NaOH | 265.5 | 232 | |

박층크로마토그래피(TLC) : 용매로서 물을 사용하여 셀룰로오스상에서의 크로마토그래피는 싱글스포트를 나타낸다.

[실시예 2]

4-클로로-1-β-D-리보퓨라노실-1H-이미다조(4,5-C) 피리딘

4-클로로-1H-이미다조(4,5-C)피리딘(23밀리몰), 유리딘(27.4밀리몰), 포타슘포스페이트(11밀리몰), 물(123ml), n-프로판올(20ml), 퓨린뉴클레오사이드 포스포릴라제(실시예 1과 동일, 13,000 I.U.) 및 유리딘포스포릴라제(실시예 1과 동일, 1,100 I.U.)로 이루어지는 반응혼합물을 제조한다. 효소를 가하기전에 반응혼합물의 pH를 6.7로 조절한다. 서스펜션을 37°C에서 11일간 배양하고 퓨린뉴클레오사이드 포스포릴라제(1,000 I.U.)와 유리딘포스포릴라제(100 I.U.)를 가한다. 37°C에서 2일더 방치한후, 반응혼합물을 여과하고 여액을 회전증류기에서 반가량 농축하여 세파덱스컬럼(G-10)(5×90cm)에 넣는다. 그리고 물로 용출한다. 생성물을 함유하고 있는 부분을 혼합하고 진공에서 10ml로 감압 증류한다. 이 용액을 폴리아크릴아미드(P-2 B : 0 Rad Laboratories)(2.5×90cm)로 값산 컬럼에 넣고 30% n-프로판올로 용출한다. 생성물을 함유한 부분(황색아닌것)을 혼합하고 프로판올을 제거한다. 남은물을 동결건조에 의해 제거하여 4-클로로-1-β-D-리보퓨라노실-1H-이미다조(4,5-C) 피리딘 (2.9g)을 얻는다.

$C_{11}H_{12}ClN_3O_3$ 의 분석

이론치 : C, 46.23; H, 4.23; N, 14.70; Cl, 12.41%

실측치 : C, 46.32; H, 4.26; N, 14.66; Cl, 12.38%

U.V. 스펙트라(nm) :

| 용매 | 최소 | 최대 | 쇼울더 |
|----------|---------|-----|---------|
| 0.1NHCl | 257,266 | 236 | 273 |
| 0.1NNaCl | 274 | 235 | 260,269 |

박층크로마토그래피 :

n-프로판올/포화황산암모늄수용액/N소듐아세테이트(2:79:19)용매를 사용한 크로마토그래피에 의해 싱글 스포트를 얻었다.

[실시예 3]

4-클로로유사물로부터 4-아미노-1-β-D-리보퓨라노실-1H-이미다조(4,5-C)피리딘의 제조

(a) 4-히드라지노중간물질

40ml 히드라지노수화물에 용해된 4-클로로-1-β-D-리보퓨라노실-1H-이미다조(4,5-C)피리딘(1g, 3.5밀리몰)(실시예 2)의 용액을 질소존재하에서 1시간동안 환원온도로 가열한다. 용액을 감압건조하고 잔

사는 탈산소수(80ml)에 용해한다. 라니니켈(3.0g)을 가하고 혼합물을 1시간동안 환류시킨후 여과한다. 촉매는 끓는 물로 잘 세척한다. 여액과 세척물을 감압증류하고, 물(30ml)에 재용해하여 암모늄 설파이드용액(1ml)을 가한다. 하룻밤동안 방치하면 침전물이 생성된다. 침전물을 진공에서 여과한후 용액을 동결건조시킨다. 유색물질을 물에 용해하고 용출액으로 물을 사용하여 셀룰로오스상에서 크로마토 그래피한다. 생성물을 함유한 부분액을 모아 진공에서 건조시킨다. 잔사는 클로로포름/메탄올 혼합물중의 실리카겔에서 크로마토그래피한다. 적당한 부분액을 서로 조합하며, 건조시킨후 메탄올을 잔사에 가한다. 생성된 고형분(0.51g)을 물에 용해하고 황화수소 기체로 처리한다. 하룻밤의 방치후 생성된 침전물을 여과에 의해 제거하고 여액은 동결건조시킨다. 잔사는 물에 용해하고 도우엑스-50-HH함유하고 있는 컬럼에 충전시킨다. 물로 세척후에, 0.5N의 수산화암모늄용액으로 용출시킨다. 각 부분액들을 서로 조합하고 감압증류한후 잔사를 물로 결정화하여 4-아미노-1-β-D-리보푸라노실-1 H-이미다조(4,5-C)피리딘(0.23g, 0.86밀리몰, 25%)를 얻는다.

$C_{11}H_{14}N_4O_4$ 의 분석

이론치 : C, 49.62%; H, 5.30%; N, 21.04%;

실측치 : C, 49.36%; H, 5.12%; N, 21.01%;

(b) 4-벤질중간물질

4-클로로-1-β-D-리보푸라노실-1 H-이미다조(4,5-C)피리딘(28.57g), 벤질아민(26.75g)을 질소존재하에 2-메톡시에탄올(142ml)중에서 18시간동안 환류시킨다. 반응혼합물을 증류하고 잔사는 SD 3A-물(1 : 1)에서 두번 재결정하여, 4-벤질아미노-1-β-D-리보푸라노실-1 H-이미다조(4,5-C)피리딘(28.23g)을 얻는다.

이렇게 얻은 4-벤질아미노중간물질(28.1g)을 따뜻한 2-메톡시에탄올 (350ml)와 20%의 탄소상 수산화 팔라듐촉매($Pd(OH)_2/C$, 5g)에 용해한다. 그리고 2-메톡시에탄올에 현탁하여 용액에 가한다.

생성된 반응혼합물은 55°C의 대기압하에서 3시간동안 서서히 수소분해시킨다. 반응혼합물을 여과하고 농축한후 잔사를 운수(600ml)에 넣고 교반하고, 20°C로 냉각후 여과한다. 여액을 에틸아세테이트로 추출하고 추출물을 제거하고 여액을 100ml로 농축한다. 이를 냉각후 여과에 의해 수집하면 원하는 생성물이 제조된다. 두번째부분은 pH10으로 여액을 조절한후 농축시켜 얻는다. 이것은 물로 재결정하고 첫번째 부분과 합하여 $SD_3 A$ -물(2 : 1 ; 200ml)로 재결정하여 4-아미노-1-β-D-리보푸라노실-1 H-이미다조(4,5-C)피리딘(12.5g)을 얻는다.

[실시에 4]

4-벤질아미노-1-β-D-리보푸라노실-1 H-이미다조(4,5-C)피리딘

(a) 4-벤질아미노-1 H-이미다조(4,5-C)피리딘의 제조

클로로-1 H-이미다조(4,5-C)피리딘(2.0g, 13밀리몰), 벤질아민(5ml) 및 물 몇방울의 혼합물을 환류시키면서 4시간동안 가열한다. 반응혼합물을 얼음물에 넣고, 냉각된 혼합물을 디에틸에테르로 2번 추출한다.

에테르를 감압하에 제거하고 잔류오일을 헥산으로 두번 연화시킨다. 오일을 물로 현탁시키고 수용액층을 빙초산으로 중화한다. 수용액층은 감압 증류하고 물(15ml)에 재현탁하여 도엑스 50(H⁺)수지(10g)의 컬럼에 충전시킨다. 컬럼은 용출액의 자외선 흡착도가 0이 될때까지 물로 세척한다. 컬럼팩킹을 제거하고 진한 수산화암모늄용액(400ml)중에서 가열한다. 용액을 감압하에 여과하고 냉각하여 빙초산으로 중화한다. 황색고체를 수취하여 40°C에서 감압건조하여 4-벤질아미노-1 H-이미다조(4,5-C)피리딘 0.94g(용점 60-64°C, 31.5%)을 얻는다.

$C_{13}H_{12}N_4 \cdot 0.3H_2O$ 의 분석

이론치 : C : 67.88 H : 5.53 N : 224.40%

실측치 : C : 68.05 H : 5.26 N : 24.23%

U. V. 데이터 :

| 용매 | 최대(nm) | E | 쇼울더 |
|----------|--------|--------|-----|
| 0.1NHCl | 277 | 13,000 | 263 |
| 0.1NNaCl | 278 | 11,900 | |

(b) 4-벤질아미노-1-β-D-리보푸라노실-1 H-이미다조(4,5-C)피리딘

유리딘(4.1g), 4-벤질아미노-벤질아미노-1 H-이미다조(4,5-C) 피리딘 (0.68g)(실시에 4a와 동일), 0.2M $K_2H_7PO_4$ (pH7.4) (6ml), 0.13mM $Na_2 EDTA$ (6ml), 물(200ml), n-프로판올(10ml), 퓨린뉴클레오사이드 포스포릴라제(실시에 1과 동일, 2,800 I.U.) 및 유리딘 포스포릴라제(실시에 1과 동일, 1,390 I.U.)의 반응혼합물을 제조한다. 이렇게 얻은 현탁액을 37°C에서 4일동안 배양시킨다. 형성된 현탁액을 여과하고 필터케이크를 물로 세척한후 감압건조시켜 4-벤질아미노-1-β-D-리보푸라노실-1 H-이미다조(4,5-C)피리딘(0.39g)을 단일 수화물로서 얻는다.

세척 및 진공건조시킨 여액을 3°C로 냉각시킨 두번째결정의 총수율은 0.43이다.

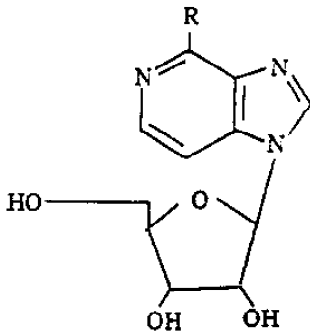
$C_{18}H_{20}N_4O_4 \cdot H_2O$ 의 분석

| | | |
|----------------|------------------------------|-----|
| 이론치 : | C, 57.74; H, 5.92; N, 14.96% | |
| 제 1 생성물실측치 | C, 57.54; H, 5.94; N, 14.38% | |
| 제 2 생성물실측치 | C, 57.45; H, 5.96; N, 14.95% | |
| U.V. 스펙트럼 (nm) | | |
| 용매 | 최대 | 최소 |
| 0.1N HCl | 268 | 236 |
| 0.1N NaCl | 273.5 | 238 |

(57) 청구의 범위

청구항 1

4-치환-1^H-이미다조-(4,5-C)피리딘을 리보스-1-포스페이트 및 포스포릴라제형 효소가 함유된 리보스공여체와 반응시키는 것을 특징으로 하는 하기식(I)의 4-치환-1-β-D-리보퓨라닐-1^H-이미다조-(4,5-C)-피리딘을 제조하는 방법.



(I)