

(19) DANMARK



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(12) PATENTSKRIFT

(11) 167377 B1

(21) Patentansøgning nr.: 4417/86 (51) Int.Cl.5 A 61 K 31/70
(22) Indleveringsdag: 15 sep 1986 C 07 H 19/073
(41) Alm. tilgængelig: 18 mar 1987
(45) Patentets meddelelse bkg. den: 25 okt 1993
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 17 sep 1985 US 776899 27 sep 1985 GB 8523878 12 feb 1986 GB 8603447 14 feb 1986 GB 8603719
04 apr 1986 GB 8608272 23 jun 1986 GB 8615322 23 jun 1986 US 877796 23 jun 1986 US 877284

(73) Patenthaver: THE *WELLCOME FOUNDATION LIMITED; 183-193 Euston Road; London NW1 2BP, GB

(72) Opfinder: Janet Litster *Rideout; US, David Walter *Barry; US, Sandra Nusinoff *Lehrman; US, Martha Heider *St.Clair; US, Phillip Allen *Furman; US, Goerge Andrew *Freeman; US, Thomas Paul *Zimmerman; US, Gerald *Wolberg; US, Paulo M. de *Miranda; US, Sammy Ray *Shaver; US, Leone Edward *Kirk; US, Dannie Hileary *King; US, Richard Harlan *Clemons; US, Geoffrey *White; GB

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) 3'-Azidopyrimidinnucleosider eller farmaceutisk acceptable salte eller estere deraf til anvendelse ved behandling af eller profylakse for en human retrovirusinfektion

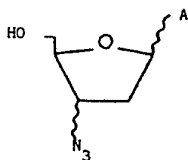
(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 1182/86 (PL § 2.2.3) (166805)
Andre publikationer: J. Med. Chem. 26 (1983), nr. 12, side 1691-1696.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, vol. 71 (1974), nr. 12,
side 4980-4985. J. Org. Chem. 38 (1973), nr. 25,
side 4299-4305.

(57) Sammendrag:

4417-86

3'-Azidonucleosider beskrevet med den almene formel I:



(I)

hvor A er en purin- eller pyrimidinbase, i visse tilfælde bortset fra thymin, tilbundet ved 9- eller 1-stillingen samt farmaceutisk acceptable derivater deraf til anvendelse i human eller veterinær terapi eller sammen med i det mindste ét yderligere terapeutisk middel til anvendelse i kombinationsterapi; anvendelse af sådanne forbindelser eller kombinationer af forbindelser til fremstilling af lægemidler. Visse af forbindelserne er ikke tidligere kendt. Forbindelserne fremstilles ved

Opfindelsen angår 3'-azidopyrimidinnucleosider eller farmaceutisk acceptable salte eller estere deraf til anvendelse ved behandling af eller profylakse for en human retrovirusinfektion.

5 I området antiviral kemoterapi eksisterer der kun få medikamenter, som effektivt bekæmper selve virus'et på grund af vanskeligheden ved at angribe virus'et og samtidig ikke påvirke ikke inficerede værtsceller. På grund af virus overordentlige parasittiske egenskaber
10 mente man længe, at det var værtsceller, der leverede alle de nødvendige hjælpemidler til virusreplikation. Fornylig har man fastslået, at visse trin i en virus liv, varierende fra art til art, specificeres af selve virus'et, og disse trin kan være modtagelige for angreb,
15 når de i tilstrækkelig høj grad afviger fra tilsvarende værtscellefunktioner. Imidlertid har en effektiv behandling været meget vanskelig at finde, da der er en stor lighed mellem funktionerne hos virus og hos vært.

Af denne grund har forbindelser, som man har
20 fundet egnet til behandling af virusinfektioner, normalt været noget giftige for værten. Det ideelle medikament er således ugiftigt ved antiviralt effektive koncentrationer, men så længe et sådant ikke findes, bør forbindelser til dette brug besidde et godt terapeutisk for-
25 hold, dvs. de koncentrationer, hvor behandlingen med medikamentet er giftigt, er betydeligt højere end de koncentrationer, hvor man observerer antiviral aktivitet.

En gruppe vira, som fornylig har vist sig særlig vigtige, er retrovira. Retrovira danner en undergruppe
30 af RNA vira, som for at reproducere først må omvendt transkribere RNA i deres genom til DNA (ordet transkription beskriver konventionelt syntesen af RNA ud fra DNA). Når det virale genom først er på DNA form, kan det inkorporeres i værtscellens genom og der fuldt ud udnyt-
35 te værtscellens transkription/translationsudstyr til replikation. Når det virale DNA først er inkorporeret,

er det i praksis ikke til at skelne fra værtens DNA, og i denne tilstand kan virus'et eksistere så længe, som cellen lever. Da det er i praksis umuligt at angribe i denne form, må enhver behandling være rettet mod et andet trin i virusens liv og må nødvendigvis fortsættes indtil alle virusinficerede celler er døde.

HTLV-I og HTLV-II er begge retrovira, og man ved, at de er årsag til leukæmi hos mennesker. Infektioner med HTLV-I er særlig udbredte, og er ansvarlige for 10 mange dødsfald verden over hvert år.

Man har også på reproducerbar måde isoleret en retrovirusart fra patienter med AIDS. Dette virus er blevet grundigt karakteriseret, og dets internationalt anerkendte navn er human immundefekt virus (HIV). Denne 15 virusart er blevet vist fortrinsvis at inficere og ødelægge T-celler med OKT4 overflademærket, og man accepterer i almindelighed nu, at det er årsag til AIDS. Patienten mister efterhånden sine T-celler, hvorved balancen i immunsystemet forstyrres, og patientens evne til 20 at bekæmpe andre infektioner bliver nedsat, han bliver modtagelig for opportunistiske infektioner, som ofte viser sig dødelige. Den sædvanlige årsag til død hos AIDS ofre er på grund af opportunistiske infektioner, såsom lungebetændelse eller cancere, som kan være forårsaget 25 af vira og ikke nødvendigvis som et direkte resultat af HIV infektionen. Andre tilstande, der står i forbindelse med HIV infektion, inkluderer thrombocytopaenia purpura og Kaposi's sarcom.

Man har fornylig også udvundet HIV af andre vævs- 30 typer, deriblandt B-celler, der eksprimerer T4 markøren, makrofager og væv, der ikke er forbundet med blod i centralnervesystemet. Denne infektion af centralnervesystemet er ikke nødvendigvis forbundet med klassisk AIDS, og man har fundet den hos patienter med asymptomatiske 35 HIV infektioner. HIV infektion af centralnervesystemet er forbundet med fremadskridende demyelinering, der fø-

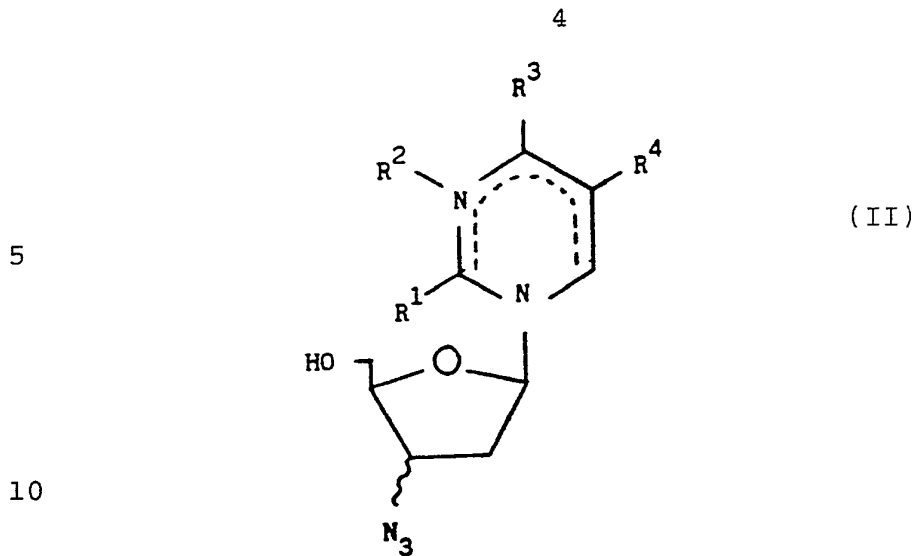
rer til udmarvning og til sådanne symptomer som encephalopati, fremadskridende dysarthri, ataxi og manglende orientering. Andre tilstande i forbindelse med HIV infektioner er den asymptomatiske bærertilstand, den progressive almindelige lymfadenopati (PGL) og det AIDS relaterede kompleks (ARC).

Man mener nu, at visse kroniske neurologiske infektioner er forårsaget af retrovira. Sådanne infektioner inkluderer f.eks. dissemineret sclerose hos mennesker, arthritis encephalitis virusinfektioner hos geder og visna-mædi infektioner hos får.

Der foreligger rapporter og afprøvninger af forbindelser imod forskellige retrovira, f.eks. Friend Leukæmi Virus (FLV), en retrovirus hos mus. F.eks. fortolkede Krieg et al. (Exp. Cell Res., 116 (1978) 21-29) forsøg i retning af, at 3'-azido-3'-desoxythymidin skulle være aktiv overfor FLV ved in vitro eksperimenter, og Ostertag et al. (PKroc. Nat. Acad. Sci. (1974) 71, 4980-85) foreslog på baggrund af denne fortolkning og mangel på cellegiftighed at 3'-azido-3'-desoxythymidin "måske med gunstig virkning kunne erstatte bromdesoxyuridin til medicinsk behandling af sygdomme forårsaget af DNA vira". Imidlertid fastslog De Clerq et al. (Biochem.Pharm. (1980) 29, 1849-1851) seks år senere, at 3'-azido-3'-desoxythymidin ikke udviser nogen særlig aktivitet overfor de vira, som de afprøvede, deriblandt sådanne DNA vira som vaccinia, HSV I og varicella zoster virus (VZV).

Man har nu overraskende fundet, at visse 3'-azidopyrimidinnucleosider som beskrevet nedenfor er nyttige ved behandling af humane retrovirale infektioner, deriblandt HIV infektioner.

I overensstemmelse hermed er 3'-azidopyrimidinnucleosidforbindelserne ifølge opfindelsen til anvendelse ved behandling af eller profylakse for en human retroviral infektion ejendommelige ved, at de har den almene formel (II)



hvor

den punkterede linie betegner en eller flere eventuelle yderligere bindinger i C_2-N_3 , N_3-C_4 , C_4-C_5 og/eller C_5-C_6 stillinger;

R^1 betegner hydroxy, oxo, mercapto, thio, amino eller alkoxy;

R^2 betegner hydrogen, methyl, C_{1-2} alkanoyl eller benzoyl, eller mangler, hvis R^1 og R^3 begge er monovalente substituentter;

R^3 betegner hydroxy, oxo, mercapto, thio, amino, alkyl-amino eller dialkylamino; og

R^4 betegner alkyl, hydroxy, alkenyl, alkynyl eller hydrogen;

idet dog R^4 ikke kan være methyl, når R^1 og R^3 begge er oxo, og R^2 er hydrogen;

eller er farmaceutisk acceptable salte eller estere deraf.

Ovennævnte forbindelser betegnes i denne sammenhæng som forbindelser til anvendelse ifølge opfindelsen eller blot omhandlede forbindelser.

Retrovirale infektioner påvirker ofte centralnervesystemet af den angrebne, og i denne forbindelse er det en fordel ved de omhandlede forbindelser, at de eksperimentelt er blevet bestemt at være i stand til at overskride blod-hjerne barrieren i klinisk effektive

mængder.

Betegnelsen "retrovirale infektioner" betegner i denne forbindelse infektioner med en hvilken som helst virus, som i løbet af en væsentlig del af sin livscyklus
5 benytter en revers transkriptase.

Forbindelserne til anvendelse ifølge opfindelsen besidder især god aktivitet overfor følgende vira: human T-celle lymfotropiske vira HTLV-I og HTLV-II, samt HIV; virus for kattleukæmi, virus for infektiøs anæmi hos
10 heste, arthritis virus hos geder og andre lentivira, såvel som andre humane vira, såsom hepatitis B virus, Epstein-Barr virus (EBV) og årsagen til dissemineret sclerose (MS). Man har også fundet, at forbindelserne ifølge opfindelsen er effektive ved behandling af
15 Kaposi's sarcoma (KS) og thrombocytopaenia purpura (TP).

I den ovenfor nævnte almene formel I skal de punkterede linier i 2- til 6-stillingerne betegne tilstedeværelsen af enkelt- eller dobbeltbindinger i disse stillinger, idet de relative forekomster af enkelt- og
20 dobbeltbindinger bestemmes af, om substituenterne R^1 og R^2 er grupper, der kan indgå i f.eks. en keton-enol tautomeri.

Foretrukne grupper af omhandlede forbindelser er cytidinderivater, f.eks. forbindelser med formel
25 (II), hvori R^3 betegner amino eller alkylamino, især når 3'-azidogruppen er i erythrokonfiguration ("azido nedad"); uridinderivater (f.eks. forbindelser med formel (I), hvori R^3 er andet end amino eller alkylamino), hvori 3'-azidogruppen enten er i erythro- eller threo-
30 ("azido opad") konfiguration; og nucleosider, der er umættede imellem 5C og 6C stillingerne.

Angående forbindelser med formlen (II) ovenfor indeholder alkylgrupper med fordel 1-8 carbonatomer, især 1-4 carbonatomer, f.eks. methyl eller ethylgrupper.
35 De ovenfor nævnte alkenyl- og alkynylgrupper indeholder med fordel 2-8, især 2-4 carbonatomer, f.eks. ethenyl

eller ethynyl.

Yderligere klasser af foretrukne forbindelser med formel (II) omfatter sådanne, hvori én eller flere af grupperne R^1 , R^2 og R^3 og R^4 er som defineret nedenfor
5 (med de ved formel (II) givne begrænsninger):

R^1 betegner hydroxy/oxo, mercapto/thio, C_{1-4} alkoxy eller amino;

10 R^2 betegner hydrogen, methyl, C_{1-2} alkanoyl eller benzoyl;

R^3 betegner hydroxy/oxo, mercapto/thio, amino eller mono- eller dialkylsubstitueret amino;

15

R^4 betegner hydrogen, når R^3 er amino eller substitueret amino, og C_{2-3} alkyl, C_{2-3} alkenyl eller ethenyl, når R^3 er andet end amino eller substitueret amino, og
5'-derivater af sådanne forbindelser inkluderende lige-
20 kædede eller forgrenede alkylestere, eventuelt substitueret med carboxygrupper (f.eks. succinat), C_{1-6} thioestere, eventuelt substituerede arylestere, mesylat, glucoronid eller mono-, di- eller triphosphater.

Foretrukne forbindelser med formel (II) til anvendelse ved behandling af eller profylakse for humane retrovirale infektioner er sådanne forbindelser med formel (II), hvori (med de ved formel (II) anførte begrænsninger), R^1 betegner hydroxy/oxo, mercapto/thio, C_{1-5} alkoxy eller amino;

30 R^2 betegner hydrogen, methyl eller benzoyl;

R^3 betegner hydroxy/oxo, mercapto/thio, amino eller mono- eller dialkylsubstitueret amino;

R^4 er som defineret ovenfor, og farmaceutisk acceptable salte eller estere. Azidogruppen er med fordel i erythrokonfiguration. Særlig foretrukket er sådanne omhandlede forbindelser, som kun varierer i én af substituen-

terne R^1 - R^4 i pyrimidinringen fra sådanne i en thyminrest (hvor R^1 og R^3 er oxo, R^2 er hydrogen og R^4 er methyl).

Et hvilket som helst farmaceutisk acceptabelt salt, ester, eller salt af en sådan ester kan efter indgivelse til modtageren tilvejebringe (direkte eller indirekte) det oprindelige 3'-azidonucleosid eller en terapeutisk effektiv metabolit eller residue deraf.

Foretrukne estere af forbindelser med formel (II) omfatter carboxylsyrestere, hvori den del af estergruppen, der ikke er carbonyl, udvælges blandt ligekædede eller forgrenede alkyl, alkoxyalkyl (f.eks. methoxymethyl), aralkyl (f.eks. benzyl), aryloxyalkyl (f.eks. phenoxymethyl), aryl (f.eks. phenyl, eventuelt substitueret med halogen, C_{1-4} alkyl eller C_{1-4} alkoxy); sulfonatestere, såsom alkyl- eller aralkylsulfonyl (f.eks. methansulfonyl); og mono-, di- eller triphosphatestere. Alle henvisninger til en hvilken som helst af de ovennævnte forbindelser omfatter også en henvisning til farmaceutisk acceptabelt salte deraf.

Angående de ovenfor beskrevne estere vil, hvis ikke andet angives, enhver alkylenhed, der findes, med fordel indeholde 1-18 carbonatomer, især 1-4 carbonatomer. Enhver arylenhed der findes i sådanne estere, indeholder med fordel en phenylgruppe.

Eksempler på farmaceutisk acceptable salte af forbindelser med formel (II) og farmaceutisk acceptable estere deraf, inkluderer basesalte, f.eks. afledt af en passende base såsom alkalimetal (f.eks. natrium), jordalkalimetal (f.eks. magnesium) salte, ammonium og NX_4 (hvor X betegner C_{1-4} alkyl) og mineralsyresalte såsom hydrochlorider.

Specielle eksempler på farmaceutisk acceptable salte eller estere af forbindelser med formel (II) til anvendelse ifølge opfindelsen inkluderer mononatrium-saltet og de følgende 5'-estere: monophosphat, dina-

triummonophosphat, diphosphat, triphosphat, acetat, 3-methylbutyrat, octanoat, palmitat, 3-chlorbenzoat, benzoat, 4-methylbenzoat, hydrogensuccinat, pivalat og mesylat.

5 Forbindelserne med formlen (II) og deres farmaceutisk acceptable salte og estere, også i denne sammenhæng betegnet det aktive middel, kan ved terapi indgives på en hvilken som helst passende måde inkluderende oral, rectal, nasal, topisk (omfattende bucal og sublingual),
10 vaginal og parenteral (omfattende subcutan, intramuskulær, intravenøs og intradermal) indgivelse. Man bør bemærke, at indgivelsesmåden vil afhænge af modtagerens tilstand og alder, af infektionsart og af den valgte aktive forbindelse.

15 I almindelighed vil en passende dosis være i området 3,0-120 mg pr. kg. kropsvægt af modtageren pr. dag, foretrukken i området 6-90 mg pr. kg. kropsvægt pr. dag, mest foretrukken i området 15-60 mg pr. kg. kropsvægt pr. dag. Den ønskede dosis indgives foretrukken som
20 to, tre, fire, fem, seks eller flere mindre doser, der indgives med passende intervaller i løbet af dagen. Disse mindre doser kan indgives på enhedsdosisform, f.eks. med indhold af 10-1500 mg, fortrinsvis 20-1000 mg, og mest foretrukken 50-700 mg aktivt middel pr. en-
25 hedsdosisform.

Eksperimenter tyder på, at dosis skal indgives, så man opnår de største plasmakoncentrationer af det aktive middel på ca. 1-75 μM , foretrukken ca. 2-50 μM , mest foretrukken ca. 3-30 μM . Dette kan f.eks. opnås ved
30 intravenøs indsprøjtning af en 0,1-5% opløsning af det aktive middel, eventuelt i saltvand eller en oral indgivelse af en bolus, der indeholder ca. 1-100 mg pr. kg. af det aktive middel. Man kan opretholde de ønskede niveauer i blodet ved kontinuert infusion, der tilveje-
35 bringer ca. 0,01-5,0 mg. pr. kg. pr. time eller ved afbrudte infusioner, der indeholder ca. 0,4-5 mg. pr. kg.

af aktivt middel.

Selv om det er muligt at indgive det aktive middel alene, er det foretrukken at indgive det i et farmaceutisk præparat. Sådanne præparater indeholder i det
5 mindste ét aktivt middel, som defineret ovenfor, sammen med en eller flere acceptable bærere derfor og eventuelt andre terapeutiske midler. Alle bærere skal være "acceptable", idet de skal være forligelige med de andre ingredienser i præparatet og ikke være skadelige for patienten. Præparaterne inkluderer sådanne, der er egnede
10 til oral, rectal, nasal, topisk (inkluderende buccal og sublingual), vaginal eller parenteral (inkluderende subcutan, intramuskulær, intravenøs og intradermal) indgivelse. De kan bekvemt foreligge på enhedsdosisform og
15 kan fremstilles ved en hvilken som helst måde, kendt i farmacien. Sådanne fremgangsmåder omfatter, at man sammenbringer det aktive middel med bæreren, som indeholder én eller flere hjælpeingredienser. Almindeligvis fremstiller man præparaterne ved homogen og tæt sammenbringning af det aktive middel med væskeformige bærere eller
20 findelte faste bærere eller begge og derefter om nødvendigt formgive produktet.

Præparater, der er egnet til oral indgivelse, kan foreligge som enkelte enheder, såsom kapsler, cachetter
25 eller tabletter, der hver indeholder en forud bestemt mængde af aktivt middel; som et pulver eller granulat; som en opløsning eller en suspension i en vandig eller ikke-vandig væske; eller som en olie-i-vand væskeformig emulsion eller en vand-i-olie væskeformig emulsion. Det
30 aktive middel kan også formuleres som en bolus, en latværg eller en pasta.

Tabletter kan presses eller formstøbes, eventuelt sammen med en eller flere hjælpeingredienser. Man kan fremstille pressede tabletter, idet man i en passende
35 maskine sammenpresser det aktive middel på en fritflydende form, såsom et pulver eller et granulat evt.

blandet med et bindemiddel (f.eks. povidon, gelatin, hydroxypropylmethylcellulose), smøremiddel, inert fortyndingsmiddel, præserverende middel, sønderdelende middel (f.eks. natriumstivelsesglycolat, tværbundet povidon, 5 tværbundet natriumcarboxymethylcellulose), overfladeaktivt eller dispergerende middel. Formstøbte tabletter kan fremstilles, idet man i en passende maskine formstøber en blanding af den pulveriserede forbindelse be-
fugt med et inert flydende fortyndingsmiddel. Tablet-
10 terne kan evt. overtrækkes eller forsynes med kærve og kan formuleres, så de tilvejebringer langsom eller kontrolleret afgivelse af det aktive middel, idet man der-
ved benytter f.eks. hydroxypropylcellulose i forskellige mængdeforhold for at opnå den ønskede frigørelsesprofil.

15 Præparater, der er egnet til topisk indgivelse i munden, inkluderer pastiller, der omfatter det aktive middel på en aromatiseret basis, sædvanligvis sucrose og acacia eller tragant, andre typer pastiller, der indeholder det aktive middel på en inert basis såsom gela-
20 tine og glycerin eller sucrose og acacia; og mundskyllemidler, der indeholder det aktive middel i en passende væskeformig bærer.

Præparater til rectal indgivelse kan foreligge som stikpiller på en passende basis, der f.eks. består
25 af cacaosmør eller salicylat.

Præparater, der er egnet til vaginal indgivelse kan foreligge som vagitorier, tamponer, cremer, geler, pastaer, skum eller sprays, der foruden det aktive
30 middel indeholder sådanne bærere, som fagmanden ved er egnede.

Præparater egnede til parenteral indgivelse, omfatter vandige og ikke-vandige isotoniske sterile injektionsopløsninger, som kan indeholde antioxidanter, puffere, bakteriestatiske midler og opløste stoffer, som
35 gør formuleringen isotonisk med modtagerens blod; og vandige og ikke-vandige sterile suspensioner, som kan

omfatte suspenderende midler og fortykkende midler. Præparaterne kan foreligge som enhedsdoser eller som multidoser i lukkede beholdere, f.eks. ampuller og småglas og kan opbevares i frysetørret (lyofiliseret) tilstand, hvorved de kun kræver tilsætning af den sterile væskeformige bærer, f.eks. injektionsvand, umiddelbart før de skal anvendes. Injektionsopløsninger og suspensioner, der pludselig skal anvendes, kan fremstilles ud fra sterilt pulver, granulat og tabletter af typer som tidligere beskrevet.

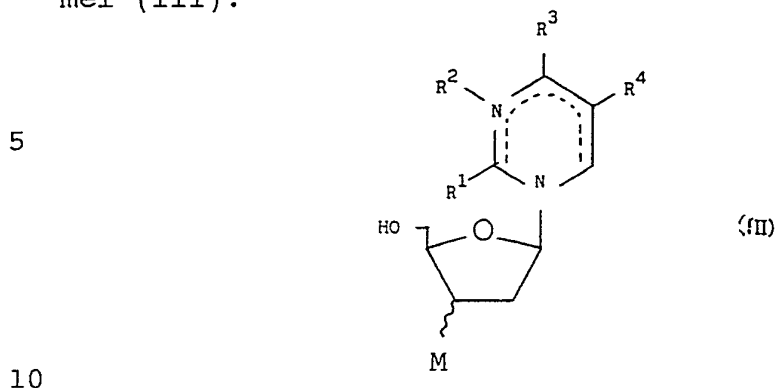
Foretrukne enhedsdosispræparater indeholder en daglig dosis eller enhed, en daglig deldosis, som nævnt ovenfor, eller en passende brøkdel deraf af aktivt middel.

Det bør forstås, at de ovenfor omtalte præparater foruden de særlig nævnte ingredienser ovenfor også kan omfatte andre midler, der er kendt af fagmanden med hensyn til denne type af præparater, f.eks. kan præparater, der er egnet til oral indgivelse yderligere indeholde sødemidler, fortykningsmidler og aromastoffer.

Forbindelserne med formel (II), og deres farmaceutiske acceptable salte og estere, kan fremstilles på konventionel vis ved hjælp af fremgangsmåder, som er kendt af fagmanden, f.eks. beskrevet i: Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry (1, 321 (1968), T.A. Krenitsky et al.), J. Med. Chem. (26, 981 (1983)); Nucleic Acid Chemistry, Improved and New Synthetic Processes, Methods and Techniques (Parts 1 and 2, Ed. L. D. Townsend, R.S. Tipson, (J.Wiley) 1978); J.R. Horwitz et al. (J. Org. Chem. 29, (July 1964) 2076-78); M. Imazawa et al. (J. Org. Chem, 43, (15) (1978) 3044-3048); K.A. Watanabe et al. (J. Org. Chem., 45, 3274 (1980)); og R.P. Glinski et al. (J. Chem., Soc. Chem. Commun., 915 (1970)), til hvis indhold vi hertil referer, eller ved hjælp af fremgangsmåder, der er analoge til sådanne, der er beskrevet heri.

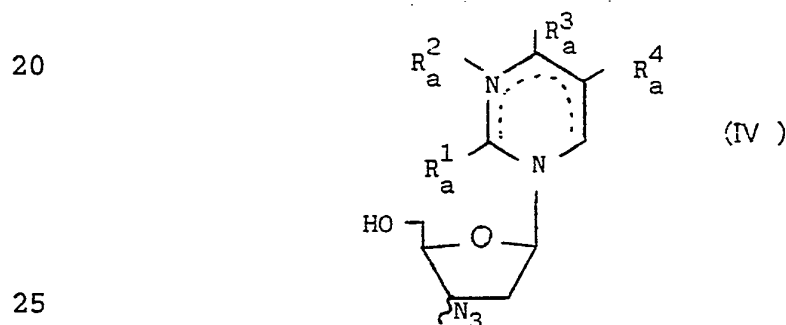
12

Eksempelvis kan man lade en forbindelse med for-
mel (III):



(hvori R^{1-4} er som defineret ovenfor og M repræsenterer
en precursorgruppe for 3'-azidogruppen) eller en ester
eller et salt deraf reagere med et middel eller under
betingelser, der er egnede til at omdanne nævnte precu-
15 sorgruppe til den ønskede azidogruppe;

(B) lade en forbindelse med formlen:

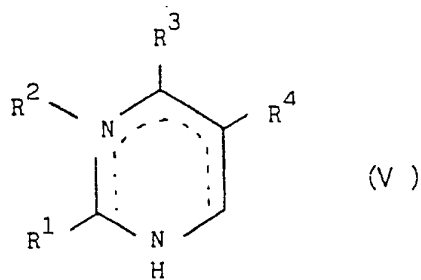


hvor R^1 , R^2 , R^3 og R^4 henholdsvis repræsenterer grupper-
ne R^1 , R^2 , R^3 og R^4 eller precursorgrupper derfor, for-
30 udsat at i det mindste en af R^1 , R^2 , R^3 og R^4 i formel
(IV) repræsenterer en precursorgruppe, reagere med et
middel eller under betingelser, der er egnet til at om-
danne nævnte precursorgruppe eller precursorgrupper til
den eller de tilsvarende ønskede grupper;

35

(C) lade en forbindelse med formlen:

5



10

hvor R^1 , R^2 , R^3 og R^4 er som defineret ovenfor, eller en funktionel ækvivalent dermed, reagere med en forbindelse, der skal indføre den ønskede ribofuranosyrling ved 1-stillingen i forbindelsen med formel (IV);

15 og derefter eller samtidig udføre en eller flere af de følgende eventuelle omdannelser:

(i) når en forbindelse med formel (II) er dannet, kan man omdanne nævnte forbindelse til et farmaceutisk acceptabelt salt eller ester deraf; og

20

(ii) når et farmaceutisk acceptabelt salt eller ester af en forbindelse med formel II er dannet, kan man omdanne nævnte derivat til udgangsforbindelsen med formel (II) eller til en andet farmaceutisk acceptabelt salt eller ester af en forbindelse med formel (II).

25

I den ovenfor beskrevne fremgangsmåde bør man 30 bemærke, at valget af precursorforbindelserne i processerne (A) til (C) i det store hele vil blive bestemt af, hvilken forbindelse man ønsker at fremstille; man vælger de ovenfor nævnte midler og betingelser blandt sådanne, der er kendt indenfor nucleosidsyntesen. Nedenfor beskrives eksempler på sådanne omdannelsesprocedurer til 35 vejledning, og man bør forstå, at de kan ændres på kon-

ventionel vis, afhængig af den ønskede forbindelse. Især f.eks. når man beskriver en konversion, som ellers ville føre til en uønsket reaktion ved labile grupper, kan man beskytte sådanne grupper på konventionel vis, og senere
5 fjerne de beskyttende grupper efter at konversionen er fuldført.

F.eks. angående proces (A) kan gruppen M i forbindelse med formel (III) f.eks. repræsentere et halogen, (f.eks. chlor) hydroxy eller organosulfonyloxy
10 (f.eks. trifluormethylsulfonyloxy, methansulfonyloxy eller p-toluensulfonyloxy) gruppen.

Til fremstilling af forbindelser med formel (II), hvori 3'-azidogruppen er i threokonfigurationen, kan man behandle en forbindelse med formel (III), hvori
15 gruppen M er en hydroxygruppe i erythrokonfigurationen (hvori 5'-hydroxygruppen med fordel er beskyttet f.eks. med en tritylgruppe) f.eks. med triphenylphosphin, carbontetrabromid og lithiumazid. Eller M kan repræsentere en organosulfonyloxy fraspaltelig gruppe i erythrokonfi-
20 guration, som kan omdannes til en azidogruppe i threokonfiguration ved behandling med f.eks. lithium eller natriumazid, og idet 5'-hydroxygruppen på lignende måde som ovenfor beskyttes. Man kan senere fjerne 5'-trityl beskyttelsen, f.eks. ved behandling under svagt sure om-
25 stændigheder, eller ved hjælp af zinkbromid.

Til fremstilling af forbindelser med formel (II), hvori 3'-azidogruppen er i erythrokonfigurationen, kan man behandle en forbindelse med formel (III), hvori gruppen M betegner et halogen, (f.eks. chlor) i threo-
30 konfigurationen (og hvori 5'-hydroxygruppen med fordel er beskyttet med f.eks. en tritylgruppe) f.eks. med lithium eller natriumazid. Udgangsmaterialet med 3'-threo-halogen (f.eks. chlor) kan f.eks. opnås ved reaktion med den tilsvarende 3'-erythro-hydroxyforbindelse med
35 f.eks. triphenylphosphin og carbontetrachlorid eller alternativt ved behandling med organosulfonylhalid

(f.eks. trifluormethansulfonylchlorid) til dannelselse af en tilsvarende 3'-erythro-organosulfonyloxyforbindelse, som derefter halogeneres f.eks. som beskrevet ovenfor. Eller man kan behandle en 3'-threo-hydroxy eller organo-
5 sulfonyloxyforbindelse med formel (III), f.eks. med triphenylphosphin, carbontetrabromid og lithiumazid til dannelselse af den tilsvarende 3'-erythroazidoforbindelse.

Angående proces (B) repræsenterer det følgende eksempler på forskellige fremgangsmåder ved hvilke pre-
10 cursorgrupper i formel (IV) kan omdannes til de ønskede R^1 , R^2 , R^3 og R^4 grupper:

- a) Når R^1 repræsenterer en alkoxygruppe (f.eks. methoxy eller ethoxy) kan man fremstille sådanne
15 forbindelser ud fra tilsvarende forbindelser med formel (IV), hvori R^1 repræsenterer en 2,5'-O-anhydro sammenbinding, f.eks. ved behandling med et passende nukleofilt reagens, f.eks. et alko-
xid, med fordel under tilstedeværelse af kalium-
20 carbonat;
- b) Når R^1 repræsenterer en mercaptogruppe, kan man fremstille sådanne forbindelser ud fra tilsva-
rende forbindelser med formel (IV), hvori R^1
25 repræsenterer en alkoxygruppe (f.eks. ethoxy), f.eks. ved behandling med hydrogensulfid;
- c) Når R^2 repræsenterer en methylgruppe, kan man fremstille sådanne forbindelser ud fra de tilsva-
30 rende forbindelser med formel (IV), hvori R^2 repræsenterer et hydrogenatom, f.eks. ved be-
handling med et methylerende middel, f.eks. N,N-dimethylformamid dimethylacetal;
- 35 d) Når R^3 repræsenterer en mercaptogruppe, kan man fremstille sådanne forbindelser ud fra tilsva-

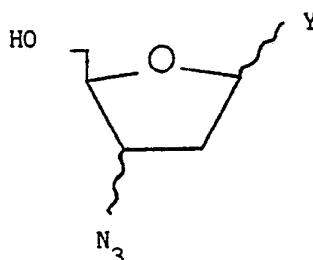
rende forbindelser med formel (IV), hvori R^3 repræsenterer en passende fraspaltelig gruppe, f.eks. 1,2,4-triazolyl, ved behandling f.eks. med et alkalimetal (f.eks. natrium) mercaptan;

5

- e) Når R^3 repræsenterer en aminogruppe, kan man fremstille sådanne forbindelser ud fra tilsvarende forbindelser med formel (IV), hvori R^3 repræsenterer en hydroxygruppe, ved behandling med et aminerende middel, f.eks. hexamethyldisilazan og ammoniumsulfat i en trykbeholder;

Angående proces (C) kan man f.eks. udføre denne ved at behandle en passende pyrimidin med formel (V) eller et salt eller et beskyttet derivat deraf med en forbindelse med formel:

20



(hvori Y betegner en fraspaltelig gruppe, f.eks. acetoxy eller benzoyloxy eller halogen, f.eks. chlor, og 5'-hydroxygruppen evt. er beskyttet f.eks. med en p-toluensulfonyloxygruppe), og derefter fjerne eventuelle beskyttende grupper.

Når en forbindelse med formel (II) er dannet, kan man omdanne en sådan forbindelse til et farmaceutisk acceptabelt fosfat eller en anden ester, idet man lader forbindelse med formel (II) reagere med henholdsvis et phosphorylerende middel, f.eks. $POCl_3$ eller et passende forestrende middel, f.eks. et syrehalogenid eller anhydrid. Forbindelserne med formel (II), inkluderende este-

35

re deraf, kan omdannes til farmaceutisk acceptable salte deraf på konventionel vis, f.eks. ved behandling med en passende base.

Når et salt eller ester af en forbindelse med formel (II) er blevet dannet, kan man omdanne en sådan forbindelse til udgangsforbindelsen, f.eks. ved hydrolyse.

De følgende eksempler skal illustrere opfindelsen. Betegnelsen "aktivt middel" i eksemplerne betyder en forbindelse med formel (II) eller et farmaceutisk acceptabelt salt eller en farmaceutisk acceptabel ester deraf.

Eksempel 1

15

Tabletpræparater

De følgende præparater A og B fremstilles ved vådgranulering af ingredienser med en opløsning af povidon, hvorefter man tilsætter magnesiumstearat og komprimerer.

	<u>mg/tablet</u>	<u>mg/tablet</u>
<u>Præparat A</u>		
(a) Aktivt middel	250	250
25 (b) Lactose B.P.	210	26
(c) Povidon B.P.	15	9
(d) Natriumstivelsesglycolat	20	12
(e) Magnesiumstearat	<u>5</u>	<u>3</u>
	500	300

18

	<u>mg/tablet</u>	<u>mg/tablet</u>
<u>Præparat B</u>		
	250	250
5 (a) Aktivt middel		
(b) Lactose 150	-	
(c) Avicel® PH 101	60	26
(d) Povidon B.P.	15	9
(e) Natriumstivelsesglycolat	20	12
(f) Magnesiumstearat	<u>5</u>	<u>3</u>
10	500	300

	<u>mg/tablet</u>
<u>Præparat C</u>	
15 Aktivt middel	100
Lactose	200
Stivelse	50
Povidon	5
Magnesiumstearat	<u>4</u>
20	359

De følgende præparater D og E fremstilles ved direkte sammenpresning af de sammenblandede ingredienser. Lactosen anvendt i præparat E er af direkte sam-
25 menpresningstype (Dairy Crest - Zeparox®).

	<u>mg/tablet</u>
<u>Præparat D</u>	
30 Aktivt middel	250
Forudgelatiniseret stivelse NF 15	<u>150</u>
	400

mg/tabletPræparat E

	Aktivt middel	250
5	Lactose	150
	Avicel®	<u>100</u>
		500

Præparat F (Til kontrolleret frigivelse)

10

Præparatet fremstilles ved vådgranulering af de nedennævnte ingredienser med en opløsning af povidon, hvorefter man tilsætter magnesiumstearat og presser.

15

mg/tablet

	(a) Aktivt middel	500
	(b) Hydroxypropylmethylcellulose (Methocel® K4M Premium)	112
	(c) Lactose B.P.	53
20	(d) Povidon B.P.C.	28
	(e) Magnesiumstearat	<u>7</u>
		700

25

Eksempel 2

Kapselpræparater

Præparat A

30

Man fremstiller et kapselpræparat ved at blande ingredienserne i præparat D i eksempel 1 ovenfor og fylde dem i en todelt kapsel af hård gelatine. Præparat B (se nedenfor) fremstilles på lignende måde.

Præparat B

	<u>mg/kapsel</u>
(a) Aktivt middel	250
(b) Lactose B.P.	143
5 (c) Natriumstivelsesglycolat	25
(d) Magnesiumstearat	<u>2</u>
	420

Præparat C

	<u>mg/kapsel</u>
10 (a) Aktivt middel	250
(b) Macrogol 4000 BP	<u>350</u>
	600

15 Man fremstiller kapsler ved at smelte Macrogol 4000 BP, uddispergere det aktive middel i smelten og fylde smelten i en todelt kapsel af hård gelatine.

Præparat D

	<u>mg/kapsel</u>
20 Aktivt middel	250
Lecithin	100
Arachisolie	<u>100</u>
	450

25

Man fremstiller kapsler ved at uddispergere det aktive middel i lecithin og arachisolie og fylde dispersionen i bløde elastiske gelatinekapsler.

30 Præparat E (kapsler til kontrolleret frigivelse)

Man fremstiller det følgende kapselpræparat til kontrolleret frigivelse, idet man ved hjælp af en ekstruder ekstruderer ingredienserne a, b og c, hvor-
 35 efter man omdanner ekstrudatet til småkugler og tørrer det. De tørrede småkugler overtrækkes derefter med mem-

branen (d), der kontrollerer frigivelsen og fyldes i en todelt kapsel af hård gelatine.

	<u>mg/kapsel</u>
(a) Aktivt middel	250
5 (b) Mikrokrystallinsk cellulose	125
(c) Lactose BP	125
(d) Ethylcellulose	<u>13</u>
	513

10

Eksempel 3

Præparat til injektion

Præparat A

15 Aktivt middel	0,200 g
Saltsyreopløsning, 0,1 M	
q.s. til pH	4,0 til 7,0
Natriumhydroxidopløsning, 0,1 M	
q.s. til pH	4,0 til 7,0
20 Sterilt vand	
q.s. til	10 ml

Det aktive middel opløses i det meste af vandet (35-40°C) og man tilpasser pH til mellem 4,0 og 7,0 med 25 saltsyre eller natriumhydroxid, som det nu er passende. Man fylder op med vand og filtrerer gennem et sterilt mikroporefilter over i en steril, ravfarvet 10 ml glasbeholder (type 1) og forseglers med dobbelt sterilt lukke.

30

Præparat B

Aktivt middel	0,125 g
Steril, pyrogenfri, pH 7 fosfatpuffer, q.s. til	25 ml

Eksempel 4

Intramuskulær injektion

	<u>vægt(g)</u>
5 Aktivt middel	0,20
Benzylalkohol	0,10
Glycofurol 75	1,45
Injektionsvand q.s. til	3,00 ml

10 Man opløser det aktive middel i glycofurol. Derefter tilsætter man benzylalkohol og opløser det og tilsætter vand til rumfanget 3 ml. Man filtrerer blandingen gennem et sterilt mikroporefilter og forseglers den i sterile 3 ml ravfarvede glasbeholdere (type 1).

15

Eksempel 5

Sirup

Præparat A

	<u>vægt(g)</u>
20 Aktivt middel	0,2500
Sorbitolopløsning	1,5000
Glycerol	2,0000
Natriumbenzoat	0,0050
25 Ferskenaroma 17.42.3169	0,0125 ml
Renset vand q.s. til	5.0000 ml

Man opløser det aktive middel i en blanding af glycerol og det meste af det rensede vand. Derefter tilsætter man en vandig opløsning af natriumbenzoat til opløsningen, hvorefter man tilsætter sorbitolopløsningen og til slut aromaen. Man fylder op med rensede vand og blander grundigt.

35 Når det aktive middel er dårligt opløseligt, benytter man følgende præparatformulering.

Præparat B

	<u>vægt(g)</u>
Aktivt middel	0,250
Sorbitolopløsning	1,500
5 Glycerol	0,005
Dispergerbar cellulose	0,005
Natriumbenzoat	0,010 ml
Aroma og rensed vand q.s. til	5.000 ml

10 Man blander sorbitolopløsningen, glycerol og en del af det rensede vand. Man opløser natriumbenzoat i rensed vand og tilsætter denne opløsning til den første. Heri uddispergeres den dispergerbare cellulose og aromaen. Til sidst tilsætter og dispergerer man det

15 aktive middel og fylder op med rensed vand.

Eksempel 6

Stikpiller

	<u>mg/stikpille</u>
20 Aktivt middel (63µm)x	250
Hårdfedt, BP (Witepsol [®] H15 - Dynamit NoBel)	<u>1770</u>
	2020

25 x Det aktive middel benyttes som et pulver, hvori i det mindste 90% af partiklerne er på 63µm's diameter eller mindre.

Man smelter en femtedel af Witepsol[®] H15 i en

30 dampopvarmet gryde ved 45°C, højst. Man sigter det aktive middel gennem en 200 µm sigte og tilsætter det under blanding til den smeltede basis, idet man benytter en silverson med skærehoved, indtil man har opnået en homogen dispersion. Idet man stadig opretholder tempera-

35 turen af blandingen ved 45°C sætter man resten af Witepsol[®] H15 til suspensionen og rører, så blandingen stadig

er homogen. Man lader hele suspensionen passere gennem en 250 µm sigte af rustfrit stål og lader den, stadig under omrøring køle til 40°C. Når den har nået en temperatur på 38-40°C, fylder man 2,02 g af blandingen i passende 2 ml plasticforme. Derefter lader man stikpillerne afkøle til stuetemperatur.

Eksempel 7

Vagitorier

	<u>mg/vagitorie</u>
10	
Aktivt middel (63 µm)	250
Vandfrit dextrose	380
Kartoffelstivelse	363
Magnesiumstearat	<u>7</u>
15	1000

Man blander de ovennævnte ingredienser direkte og fremstiller vagitorier direkte ved sammenpresning af den resulterende blanding.

20

Eksempel 83'-Azido-3'-desoxy-5'-O-acetyl-4-thiothymidin

Man opløste 3'-Azido-3'-desoxy-5'-O-acetyl-4-(1,2,4-triazol)thymidin (Lin, et al., J. Med. Chem. 26,1691 (1983)) (1,41 g; 3,9 mmol) i 100 ml acetone og 25 30 ml H₂O og behandlede derefter med 0,39 g NaSH, xH₂O (Sung, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 522, (1982)). Man holdt blandingen under omrøring i 30 minutter, reducerede rumfanget til det halve og ekstraherede med 200 ml CHCl₃. Man vaskede CHCl₃ med 100 ml H₂O og tørrede over Na₂SO₄. 30 Man fjernede solventet under vakuum og anbragte den dannede olie på en silicagelskive (6,5 x 3 cm), hvorefter man eluerede med 750 ml CHCl₃. Opløsningsmidlet blev fjernet under vakuum til opnåelse af en gul olie, som blev omkrystalliseret fra i-PrOH til opnåelse af 0,64 g 35 (1,9 mmol; 48,7%); smp = 75-78°C.

Eksempel 93'-Azido-3'-desoxy-4-thiothymidin

Man opløste 3'-Azido-3'-desoxy-5'-O-acetyl-4-thiothymidin (0,25 g; 0,76 mmol, Eksempel 8) i en
5 blanding af 5 ml dioxan og 5 ml koncentreret NH_4OH og holdt under omrøring i 18 timer. Man fjernede opløsningsmidlet under vakuum og påsatte remanensen en silicagelsøjle, hvorefter man eluerede med $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ (3:1 v/v). De relevante fraktioner blev kombineret og man
10 fjernede opløsningsmidlet under vakuum til opnåelse af en gul olie, som blev opløst i Et_2O , hvorfra der ved indkoncentrering udskiltes krystaller: 0,16 g (0,56 mmol; 74%) smp = 116-118°C.

15

Eksempel 103-N-methyl-3'-azido-3'-desoxythymidin

Man holdt 3'-Azido-3'-desoxythymidin (0,5 g; 1,9 mmol) og N,N-dimethylformamidimethylacetal (Zemlicka, Coll. Czech. Chem. Comm. 35, 3572 (1972)) (0,9 ml; 7,5
20 mmol) under tilbagesvaling i 20 ml CHCl_3 i 48 timer. Man fjernede opløsningsmidlet under vakuum og anbragte materialet på en silicasøjle. Elueringen med $\text{EtOAc}/\text{CHCl}_3$ (1:1 v/v) førtes til det rene materiale som en viskøs olie: 0,26 g (0,9 mmol, 47%).

25

Eksempel 113'-Azido-3'-desoxy-2-thiothymidin

Man foretog syntesen af 3'-azido-3'-desoxy-2-thiothymidin ved en fem-trins reaktionsrækkefølge, idet
30 man udgik fra 2,3'-O-anhydro-5'-tritylthymidin (J.J. Fox, J. Org. Chem, 28, 936, (1963)).

Man satte 2,3'-O-anhydro-5'-tritylthymidin (10,5 g, 22,4 mmol) til en opløsning af natrium (0,52 g, 22,4 mmol) i vandfri ethanol (1,2 l) og blandingen blev holdt
35 under tilbagesvaling i 6 timer. Man afkølede og neutraliserede med 1N HCl. Man fjernede opløsningsmidlet under

vakuum og rensede den dannede olie ved flashchromatografi på silicagel med CHCl_3 :MeOH (96:4 v/v) som elueringsmiddel. Udbyttet af 1-(2'-desoxy-5'-trityl-D-lyxofuranosyl)-2-ethoxythymidin var 30%. Man opløste 2-ethoxythymidinderivatet (3,5 g, 16,8 mmol) i 35 ml DMF, der indeholdt 2,2 ml triethylamin. Den kolde opløsning blev mættet med H_2S . Man anbragte blandingen i en stålbeholder og ophevede til 95°C . Efter 27 timer påviste man ved hjælp af TLC, at der intet udgangsmateriale var tilbage. Blandingen blev gennemskyllet med N_2 i adskillige timer og derefter udhældt i isvand. Produktet blev igen frafiltreret og rensat i isvand. Produktet blev frafiltreret og rensat ved flashchromatografi på silicagel med CHCl_3 :MeOH (97:3 v/v) som elueringsmiddel. Udbyttet af 1-(2'-desoxy-5'-trityl- β -D-lyxofuranosyl)-2-thiothymidin var 37%. UV toppen ved pH 1 på 277 nm og ved pH 11 på 241 nm er tegn på dannelsen af 2-thiothymidin.

Man mesylerede 3'-hydroxygruppen på thiothymidinderivatet på følgende måde: Til en opløsning af 1-(2'-desoxy-5'-trityl- β -D-lyxofuranosyl)-2-thiothymidin (1,25 g) i vandfri pyridin (15 ml) satte man methansulfonylchlorid (665 ml, 3,5 ækvivalenter) i fire portioner i løbet af seks timer ved 5°C . Man opretholdt temperaturen ved 5°C natten over og udhældte derefter reaktionen i isvand og frafiltrerede produktet. Man rensede ved flashchromatografi på silicagel med ethylacetat: hexan (1:1 v/v) som elueringsmiddel. Udbyttet var 50%.

Man opløste lithiumazid (0,3 g, 6 mmol) i 20 ml vandfri DMF og tilsatte 1-(2'-desoxy-3'-mesyl-5'-trityl- β -D-lyxofuranosyl)-2-thiothymidin (0,72 g, 1,2 mmol). Opløsningen i DMF blev ophevet til 85°C , hvorefter blandingen blev udhældt på isvand og produktet frafiltreret. Man rensede ved hjælp af flashchromatografi på silicagel med CHCl_3 :MeOH (98:2 v/v). Udbyttet var 78%. Et IR bånd ved 2100 cm^{-1} var et tegn på tilstedeværelse af alkylazid. UV-undersøgelse bekræftede tilstedeværelsen af

2-thiothymidin.

Slutproduktet blev fremstillet, idet man fjernede beskyttelsen på 5'-hydroxylgruppen i 3'-azido-3'-desoxy-2-thio-5'-tritylthymidin (0,1 g) ved hjælp af 80% eddikesyre (5 ml) på dampbad i 45 minutter. Man tilvebragte 3'-azido-3'-desoxy-2-thiothymidin (0,021 g) ved chromatografi på silicagel med CHCl_3 :MeOH (96:4 v/v) som elueringsmiddel med 37%'s udbytte.

10

Eksempel 12

3'-Azido-3'-desoxy-2-ethoxythymidin

Man fremstillede 3'-azido-3'-desoxy-2-ethoxythymidin (2,6 g, 7,5 mmol) i vandfri ethanol under tilbagesvaling af 3'-azido-3'-desoxy-5'-mesylthymidin med 2 ækvivalenter kaliumcarbonat (1,08 g, 7,5 mmol) i fem timer. Man neutraliserede opløsningen og opnåede under vakuum en olie. Olien blev rensed ved flashchromatografi på silicagel ved eluering med ethylacetat:methanol. Man isolerede det ønskede produkt i 39%'s udbytte; smp = 20 98-100°C.

Eksempel 13

3'-Azido-3'-desoxy-2-methoxythymidin

Man fremstillede 3'-azido-3'-desoxy-2-methoxythymidin ud fra 3'-azido-3'-desoxy-5'-mesylthymidin (1,6 g, 4,6 mmol) ved fremgangsmåden ifølge Eksempel 12. Udbyttet var 42%; smp 47-51°C.

Eksempel 14

3'-Azido-2',3'-didesoxy-5-methylisocytidin

Man opløste 2,5'-O-anhydro-3'-azido-3'-desoxythymidin (0,35 g, 1,4 mmol) i 15 ml MeOH, der i forvejen var mættet med ammoniak og anbragte det i en stålbeholder ved 77°C (oliebad) i 48 timer (Skaric og Matulic-Adamic, Helv. Chim. Acta. 63, 2179 (1980)). Ifølge TLC (6:1 v/v CHCl_3 /MeOH) var reaktionen ikke løbet til ende.

Man fjernede opløsningsmidlet under vakuum og anbragte den resulterende olie på en silicagelsøjle, hvorefter man eluerede med $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (6:1 v/v). De relevante fraktioner blev kombineret til opnåelse af 0,14 g (0,53 mmol, 38%) af titelforbindelsen; smp = 107-108°C.

Eksempel 15

3'-Azido-2',3'-didesoxycytidin

Man fremstillede 3'-azido-2',3'-didesoxycytidin ud fra 3'-azido-2',3'-didesoxyuridin (2,2 g, 7,9 mmol) som HCl saltet ved fremgangsmåden ifølge T.A. Krenitsky, et al. (J. Med. Chem., 26, 891, (1983)). Udbyttet var 40%; smp = 174,5-176,5°C.

15

Eksempel 16

3'-Azido-2',3'-didesoxy-5-methylcytidin

Man fremstillede 3'-azido-2',3'-didesoxy-5-methylcytidin ud fra 3'-azido-3'-desoxythymidin (0,8 g, 3,0 mmol) ved fremgangsmåden ifølge Eksempel 15. Udbyttet var 19%.

Eksempel 17

Threo 3'-azido-2',3'-didesoxycytidin

Man udførte syntesen af threo 3'-azido-2',3'-didesoxycytidin ud fra 2'-desoxyuridin i fire trin.

Man tritylerede 5'-hydroxygruppen i 2'-desoxyuridin ved fremgangsmåden beskrevet i Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry, 1, 321, (1968).

Man fremstillede threo 3'-azido-2',3'-didesoxy-5'-trityluridin ved at lade 2'-desoxy-5'-trityluridin (5,0 g, 10,6 mmol) reagere med triphenylphosphin (3,07 g, 11,7 mmol, 1,1 ækv.) og carbontetrabromid (3,88 g, 11,7 mmol, 1,1 ækv.), lithiumazid (5,21 g, 106 mmol, 10 g) i DMF (80 ml). Man tilsatte carbontetrabromid sidst. Man lod reaktionen forløbe ved stuetemperatur natten over, hvorefter man tilsatte methanol (5 ml).

Opløsningen tilvejebragte under vakuum en olie, som blev flashchromatograferet på silicagel med ethylacetat som elueringsmiddel. Man fjernede beskyttelsen på 5'-hydroxygruppen, idet man ophedede med 80% eddikesyre på damp-
 5 bad i 20 minutter. Ved afkøling udskiltes tritylcarbino-
 len, som blev frafiltreret. Man tørrede filtratet og opslemmede det i ethylether. Man benyttede produktet threo 3'-azido-2',3'-didesoxyuridin uden yderligere rensning. Slutproduktet threo 3'-azido-2',3'-didesoxy-
 10 uridin som HCl saltet blev fremstillet ud fra uridinana-
 logen ved nøjagtig den samme fremgangsmåde som benyttes ved fremstilling af erythroisomeren (T.A. Krenitsky, et al., J. Med. Chem., 26, 891, (1983)). Udbyttet var 0,021 g, 7%.

15

Eksempel 18

5'-Acetyl-3'-azido-3-benzoyl-3'-desoxythymidin

Man opløste 5'-Acetyl-3'-azido-3'-desoxythymidin (0,75 g, 2,4 mmol) i pyridin (5 ml) og tilsatte benzoylchlorid (1,4 ml, 12 mmol, 5 ækv.) ved stuetempera-
 20 tur. Reaktionsblandingen blev holdt under omrøring nat-
 ten over og derefter udhældt i isvand (250 ml). Man til-
 passede pH af den vandige opløsning til 1, ekstraherede produktet med chloroform, vaskede den organiske fase med
 25 vand, tørrede den over MgSO₄ og filtrerede den. Man fjernede chloroformen og flashchromatograferede det olieagtige produkt på silicagel med chloroform som elueringsmiddel. Produktet forelå som en olie.

30 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 8,04-7,50 (m, 6H; 3N-benzoyl og 6H), δ 6,12 (dd, 1H, $J_{1',2a'}$ = 5,6 Hz, $J_{1',2b'}$ = 6,7 Hz, 1H), δ 4,55-3,96 (m, 4H; 3'H, 4'H, 5'H), δ 2,62-2,38 (m, 2H, 2'H), δ 2,07 (s, 3H, 5' acetyl CH₃), δ 1,90 (d, 3H, $J_{5,6}$ = 1,0 Hz, 5CH₃)

Analyse for CHN $C_{19}H_{19}N_5O_6$

Beregnet: C: 55,20, H: 4,63, N: 16,94

Fundet : 55,29, 4,64, 16,93

5

Præparation A

1-(3'-Azido-2',3'-didesoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-2-(benzyloxy)-5-methyl-4-(1H)-pyrimidinon (ikke ifølge opfindelsen)

Man lod natrium (0,4 g, 17,4 mmol, 2,6 ækv.) reagere med vandfri benzylalkohol (10 ml) i en time ved stuetemperatur, hvorefter man tilsatte 2,5'-O-anhydro-3'-azido-3'-desoxythymidin (1,65 g, 6,6 mmol). Man lod reaktionen foregå 1 time, hvorefter man udhældte i isvand (250 ml), tilpassede pH til 7 og ekstraherede den vandige fase med ethylacetat. Man ekstraherede den organiske fase med vand (4 gange). Efter tørring over $MgSO_4$ fjernede man ethylacetat under vakuum, hvorefter man chromatograferede den dannede olie på silicagel, idet man først eluerede med ethylacetat og derefter med ethylacetat:methanol (9:1 v/v). Fraktionerne, der indeholdt produkt, blev samlet, og man fjernede opløsningsmidlet under vakuum under dannelse af en olie. Når man tilsatte ethylether udkrystalliserede olien; smp = 125-126,5°C.

25

Eksempel 19

1-(3'-Azido-2',3'-didesoxy- β -D-threo-pentofuranosyl)-2-ethoxy-5-methyl-4-(1H)-pyrimidinon

Man opløste threo 3'-Azido-5'-O-mesylythymidin (1,08 g, 3,13 mmol) [fresmtillet ud fra threo-3'-azidothymidin] i 100 ml EtOH og behandlede med $NaHCO_3$ (0,26 g, 3,13 mmol) under tilbagesvaling i 18 timer. Reaktionsblandingen blev afkølet og filtreret, hvorefter man fjernede opløsningsmidlerne under vakuum og anbragte reanensen på en silicagelsøjle, hvorefter man eluerede med 9:1 (v/v) $CHCl_3/MeOH$. Ved kombineret af de rele-

35

vante fraktioner og fjernelse af opløsningsmidlerne under vakuum tilvejebragte man 0,7 g (2,4 mmol, 75,7%); smp = 120-122°C.

- 5 UV (nm): ved pH 1 $\lambda_{\max} = 260$ ($\epsilon = 9300$), $\lambda_{\min} = 237$ ($\epsilon = 5500$), $\lambda_{\text{skulder}} = 221$ ($\epsilon = 7500$); ved pH 13 $\lambda_{\max} = 256$ ($\epsilon = 10000$), $\lambda_{\min} = 240$ ($\epsilon = 7700$).

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 7,58 (s, 1H, H6), δ 6,0 (dd, 1H, H1', J = 2,9, 4,56 Hz), δ 5,06 (t, 1H, 5'OH, J = 4,91 Hz), δ 4,51-4,47 (m, 1H, H3'), δ 4,34 (q, 2H, -OCH₂-, J = 7,14 10 Hz), δ 4,10-4,05 (m, 1H, H4'), δ 3,73 (t, 2H, H5', J = 5,62 Hz), δ 2,82-2,73 (m, 1H, H2'b), δ 2,21-2,14 (m, 1H, H2'a), δ 1,82 (s, 3H, 5CH₃), δ 1,31 (t, 3H, -CH₂-CH₃, J = 6,65 Hz).

Analyse for C₁₂H₁₇N₅O₄

15 Beregnet: C: 48,81, H: 5,80, N: 23,72
Fundet : 48,59, 5,86, 23,64

Eksempel 20

Threo 3'-Azido-2',3'-didesoxy-4-thiothymidin

- 20 Man opløste 3'-azido-5'-O-trityl-3'-desoxy-4-(1,2,4-triazol)thymidin (1,25 g, 2,2 mmol), fremstillet ved fremgangsmåden ifølge W. Sung, Nucleic Acids Research (1981), 9, 6139), i 100 ml acetone og 30 ml H₂O, og behandlede derefter med 0,22 g NaSH, xH₂O. Blandingen
25 blev holdt under omrøring i 3 timer, hvorefter man reducerede volumenet til halvdelen og ekstraherede med 300 ml CHCl₃. CHCl₃-opløsningen blev vasket med 50 ml H₂O, tørret over Na₂SO₄, og man fjernede opløsningsmidlet under vakuum til opnåelse af en olie. Man fjernede 5'-O-
30 tritylgruppen, idet man opløste denne olie i 100 ml 80% HOAc. Opløsningen blev ophedet på dampbad i 2 timer, afkølet, fortyndet med 100 ml H₂O og filtreret. Man fjernede opløsningsmidlerne under vakuum og anbragte olien på en silicagelsøjle. Eluering med 20:1 (v/v)
35 CHCl₃/MeOH, indsamling af relevante fraktioner og fjernelse af solventer under vakuum gav 0,18 g (0,62 mmol, 28%); smp = 65-67°C.

UV (nm): ved pH1 $\lambda_{\max} = 337$ ($\epsilon = 20700$), $\lambda_{\min} = 280$ ($\epsilon = 1200$), $\lambda_{\text{skulder}} = 238$ ($\epsilon = 3400$);

5 ved pH 13 $\lambda_{\max} = 320$ ($\epsilon = 18400$), $\lambda_{\min} = 257$ ($\epsilon = 1700$);

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 7,63 (s,1H,H1', J = 2,93, 4,89 Hz), δ 5,06 (s,1H,5'OH), δ 4,50-4,46 (m,1H,H3'), δ 4,10-4,04 (m,1H,H4'), δ 3,73 (d,2H,H5', J = 5,61 Hz), δ 2,78-2,68 (m,1H,H2'b), δ 2,20-2,14 (m,1H,H2'a), δ 2,00 (s,3H,5CH₃).

10

Analyse for C₁₀H₁₃N₅O₃S, 0,1 C₂H₆O, 0,25 H₂O

Beregnet: C: 41,90, H: 4,86, N: 23,95, S: 10,97

Fundet : 41,99, 4,73, 23,88, 10,91

15

Eksempel 21

1-(3'-Azido-2',3'-didesoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5-methyl-2-(pentyloxy)-4-(1H)-pyrimidinon

Man fremstillede 1-(3'-Azido-2',3'-didesoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5-methyl-2-(pentyloxy)-4-(1H)-pyrimidinon ved fremgangsmåden til at fremstille 1-(3'-azido-2',3'-didesoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-2-(benzyloxy)-5-methyl-4-(1H)-pyrimidinon (Præparation A). Den endelige rensning foregik ved HPLC på C18 med vand:methanol (3:7) som elueringsmiddel. Man bortfordampede opløsningsmidlerne til opnåelse af produktet som en olie.

UV pH1 $\lambda_{\max}=258 \text{ nm} (\epsilon=9400)$, $\lambda_{\min}=232 \text{ nm} (\epsilon=5900)$
 pH13 $\lambda_{\max}=256 \text{ nm} (\epsilon=10600)$, $\lambda_{\min}=239 \text{ nm} (\epsilon=8200)$
 NMR opløst i DMSO-d₆.

5 NMR: $\delta 7,81$ (s,1H,6H), $\delta 6,04$ (t,1H, $J_{1,2}=6,7 \text{ Hz}$, 1'H) $\delta 5,28$ (t,1H, $J_{5,\text{CH}_2,5'\text{OH}}=5,1 \text{ Hz}$,5'OH)
 $\delta 4,43-4,37$ (m,1H,3'H),
 $\delta 4,27$ (t,2H, $J_{2-0(1\text{CH}_2, 2\text{CH}_2)}=6,6 \text{ Hz}$,2-0(CH₂)₁)
 $\delta 3,88-3,84$ (m,1H,4'H), $\delta 3,70-3,50$ (m,2H,5'CH₂) $\delta 2,50-2,34$ (m,2H,2'H),
 $\delta 1,80$ (s,3H,5CH₃), $\delta 1,72-1,68$ (m,2H,2-0(CH₂)₂), $\delta 1,38-1,30$ (m,4H,2-0(CH₂)₃ = 3 4)
 $\delta 0,92-0,87$ (m,3H,2-0(CH₃)₅)

10

Analyse for CHN i C₁₅H₂₃N₅O₄, 1/4 H₂O

Beregnet: C: 52,70, H: 6,93, N: 20,48

Fundet : 52,63, 6,92, 20,48

15

Eksempel 22

3'-Azido-3-benzoyl-3'-desoxy-5'-mesylthymidin

Man fremstillede 3'-azido-3-benzoyl-3'-desoxy-5'-mesylthymidin ud fra 3'-azido-3'-desoxy-5'-mesylthymidin ved en analog fremgangsmåde til hvad man benyttede i Eksempel 18 til at fremstille 5'-acetyl-3'-azido-3-benzoyl-3'-desoxythymidin ud fra 5'-acetyl-3'-azido-3'-desoxythymidin; smp = 86-88°C.

25 UV pH1 $\lambda_{\max}=259 \text{ nm} (\epsilon=21200)$, $\lambda_{\min}=230 \text{ nm} (\epsilon=6400)$
 pH13 $\lambda_{\max}=265 \text{ nm} (\epsilon=9600)$, $\lambda_{\min}=248 \text{ nm} (\epsilon=8000)$

30 H^1 NMR (DMSO-d₆) $\delta 8,00-7,58$ (m,6H,6H og phenyl), $\delta 6,15$ (t,1H, $J_{1,2}=6,1 \text{ Hz}$,1'H)
 $\delta 4,55-4,47$ (m,3H; 3'H and 5'CH₂), $\delta 4,12-4,10$ (m,1H,4'H)
 $\delta 3,28$ (s,3H,5'-SO₂CH₃), $\delta 2,65-2,4$ (m,2H,2'H),
 $\delta 1,89$ (d,3H, $J_{5,6}=1,3 \text{ Hz}$, 5CH₃)

Analyse for C₁₈H₁₉N₅O₇S

Beregnet: C: 48,10, H: 4,26, N: 15,58, S: 7,13

Fundet : 48,00, 4,23, 15,39, 7,10

Eksempel 231-(3'-Azido-2',3'-didesoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-4-dimethylamino-5-methyl-2-(1H)-pyrimidinon

Man opløste 5'-acetyl-3'-azido-3'-desoxy-4-(1,2,4-triazolyl)thymidin i vandfri acetonitril ved stuetemperatur under nitrogenatmosfære. Man tilsatte på én gang 20 ækvivalenter dimethylamin og holdt reaktionsblandingen under omrøring i 30 minutter, hvorefter man fjernede opløsningsmidlerne, opløste remanensen i methanol, der var mættet med ammoniak og holdt opløsningen under omrøring i 30 minutter. Igen blev opløsningsmidlerne fjernet og man opløste remanensen i EtOAc. Titelforbindelsen udskiltes langsomt fra opløsningen og blev frafiltreret til opnåelse af et hvidt fast stof; smp = 15 157-159°C.

UV(nm): ved pH1 $\lambda_{\max}=299,224$ ($\epsilon=14900,7900$) $\lambda_{\min}=254$ ($\epsilon=2500$);
ved pH 13 $\lambda_{\max}=287$ ($\epsilon=14000$), $\lambda_{\min}=243$ ($\epsilon=6800$).

20 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 7,63 (s,1H,H6), δ 6,06 (t,1H,H1',J=6,53Hz), δ 5,22 (t,1H,5'OH,J=5,2Hz), δ 4,37-4,34 (m,1H,H3'), δ 3,83-3,80 (m,1H,H4'), δ 3,65-3,60 (m,2H,H5'), δ 3,06 (s,6H,N(CH₃)₂), δ 2,29-2,23 (m,2H,H2'), δ 2,11 (s,3H,5-CH₃).

25 Analyse for C₁₂H₁₈N₆O₃

Beregnet: C: 48,97, H: 6,16, N: 28,56

Fundet : 49,06, 6,20, 28,50

Eksempel 2430 1-(3'-Azido-2',3'-didesoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5-methyl-2-(isopentyloxy)-4-(1H)-pyrimidinon

Man fremstillede titelforbindelsen ved en fremgangsmåde, der var analog til den, der blev benyttet til at fremstille 1-(3'-azido-2',3'-didesoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-2-(benzyloxy)-5-methyl-4-(1H)-pyrimidinon (Præparation A).

UV pH1(nm) $\lambda_{\max}=258(\epsilon=9000)$, $\lambda_{\min}=237(\epsilon=6000)$
 pH13 (nm) $\lambda_{\max}=255(\epsilon=11000)$, $\lambda_{\min}=239(\epsilon=8000)$

5 $^1\text{H NMR (DMSO-d}_6\text{): } \delta 7,79 \text{ (s, 1H, 6H), } \delta 6,02 \text{ (t, 1H, } J_{1',2'}=6,3 \text{ Hz, 1'H),}$
 $\delta 5,23 \text{ (t, 1H, } J_{5'\text{OH},5'\text{H}}=5,2 \text{ Hz, 5'OH),}$
 $\delta 4,4\text{-}4,3 \text{ (m, 3'H og 2-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{CH(CH}_3\text{)}_2\text{),}$
 $\delta 3,9\text{-}3,8 \text{ (m, 1H, 4'H), } \delta 3,7\text{-}3,5 \text{ (m, 2H, 5'H), } \delta 2,5\text{-}2,3 \text{ (m, 2'H)}$
 $\delta 1,78 \text{ (s, 3H, 5CH}_3\text{), } \delta 1,7\text{-}1,5 \text{ (m, 3H, 2-OCH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)}_2\text{)}$
 $\delta 0,92 \text{ og } 0,89 \text{ (d, 6H, } J=6,3 \text{ Hz, 2-O(CH}_2\text{)}_2\text{CH(CH}_3\text{)}_2\text{)}$

10

Analyse for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_4$

Beregnet: C: 53,40, H: 6,87, N: 20,76

Fundet : 53,14, H: 6,92, 20,62

15

Eksempel 25

3-Acetyl-3'-azido-5'-O-(3-chlorbenzoyl)-3'-desoxythymidin

Man satte til en blanding af 3'-azido-5'-O-(3-chlorbenzoyl)-3'-desoxythymidin (0,3 g, 0,74 mmol) og
 20 sølvcyanid (0,4 g, 3,0 mmol) i 20 ml benzen, et overskud
 acetylchlorid (2,6 g, 33 mmol) i adskillige portioner.
 Man holdt blandingen under omrøring ved stuetemperatur
 indtil udgangsmaterialet var forsvundet (4 timer) kon-
 trolleret ved hjælp af TLC $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20:1 (v/v). Man
 25 filtrerede og inddampede filtratet under reduceret tryk
 til tørhed. Den dannede olieagtige remanens blev chro-
 matograferet på silicagel med chloroform/hexan 1:1 (v/v)
 som elueringsmiddel og derefter chloroform som elue-
 ringsmiddel til opnåelse af 0,21 g (64%) af det ønskede
 30 produkt som en olie.

UV (nm): ved pH 1 λ_{\max} =273 (ϵ =9000), λ_{\min} =251 (ϵ =6200);
 pH 13 λ_{\max} =266 (ϵ =8800), λ_{\min} =247 (ϵ =7000)
 ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1,68 (s, 3H, 5- CH_3), δ 2,47 (s, 3- COCH_3), δ 2,3-2,5 (m, 2'H), δ 4,1-4,2 og 4,4-4,7 (m, 4H, 3'H, 4'H og 5'H), δ 6,1 (t, 1H, $J_{1',2'}=6,3$ Hz, 1'H), δ 7,5-8,0 (m, 5H, 6H og phenyl)

10 Analyse af $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_6\text{Cl}$, 0,2 CHCl_3
 Beregnet: C: 48,89, H: 3,89, N: 14,85, Cl: 12,03
 Fundet : 49,05, 3,94, 14,69, 12,56

Eksempel 26

15 1-(3'-azido-2',3'-didesoxy- β -D-threo-pentofuranosyl)-5-methyl-2-pentyloxy-4-(1H)-pyrimidinon

Man tilsatte 2,5'-O-anhydro-1-(3'-azido-2',3'-didesoxy- β -D-threo-pentofuranosyl)thymin til en opløsning af kalium-t-butoxid (0,5 ækvivalenter) i pentan-1-
 20 ol. Reaktionsblandingen blev holdt under omrøring i 2 timer ved stuetemperatur under nitrogen. Man fjernede opløsningsmidlerne under vakuum og satte remanensen på en silicagelsøjle. Eluering med 20:1 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (v/v) fulgt af kombineret og inddampning af de relevante
 25 fraktioner tilvejebragte en klar olie som langsomt dannede krystaller af titelforbindelsen ved henstand; $\text{mp} = 110-111^\circ\text{C}$.

UV (nm): ved pH 1 λ_{\max} =255 (ϵ =10200), λ_{\min} =237 (ϵ =6200), λ_{sh} =222 (ϵ =9000);
 30 ved pH 13 λ_{\max} =251,226 (ϵ =11600,9600), λ_{\min} =238 (ϵ =8600)
 ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 7,58 (s, 1H, H6), δ 5,98 (dd, 1H, H1', $J=2,98, 4,88$ Hz), δ 5,07 (t, 1H, 5'OH, $J=5,42$ Hz), δ 4,5-4,47 (m, 1H, H3'), δ 4,31-4,25 (m, 2H, - OCH_2 -), δ 4,1-4,06 (m, 1H, H4'), δ 3,73 (t, 2H, H5', $J=5,62$ Hz), δ 2,82-2,72 (m, 1H, H2'), δ 2,2-2,14 (m, 1H, H2'), δ 1,82 (s, 3H, 5- CH_3), δ 1,75-1,65 (m, 2H, pentyl), δ 1,4-1,3 (m, 4H, pentyl),
 35 δ 0,92-0,87 (m, 3H, pentyl).

Analyse for $C_{15}H_{23}N_4O_4$

Beregnet: C: 53,40, H: 6,87, N: 20,76

Fundet : 53,31, 6,90, 20,74

5 Eksempel 27

1-(3'-Azido-2',3'-didesoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-4-methoxy-5-methyl-2(1H)-pyrimidinon

Man behandlede 5'-acetyl-3'-azido-3'-desoxy-4-(1,2,4-triazolyl)thymidin ved stuetemperatur med 0,5 N natriummethoxid i methanol i 24 timer. Man neutraliserede opløsningen til pH 7 med en sulfonsyreharpiks (DOW[®] 50W, H⁺), frafiltrerede harpiksen og inddampede filtratet under vakuum til opnåelse af et fast stof. Man opløste dette faste stof i en lille mængde $CHCl_3$, påsatte det en silicagelsøjle og eluerede med 2% MeOH i $CHCl_3$. Man samlede de relevante fraktioner og inddampede dem til tørhed til opnåelse af et hvidt fast stof; smp = 119-123°C.

20 UV(nm): ved pH 1 $\lambda_{max}=279$ ($\epsilon=7500$), $\lambda_{min}=239$ ($\epsilon=1700$);

ved pH 13 $\lambda_{max}=279$ ($\epsilon=6400$), $\lambda_{min}=243$ ($\epsilon=1300$).

1H NMR (DMSO- d_6) δ 8,02 (s,1H,H6), δ 6,08 (t,1H,H1', J=5,86Hz), δ 5,29 (t,1H,5'OH,J=5,48Hz), δ 4,41-4,33 (m,1H,H3'), δ 3,9-3,86 (m,1H,H4'), δ 3,86 (s,3H,4-OCH₃), δ 3,75-3,58 (m, 2H,H5'), δ 2,4-2,3 (m,2H,H2'), δ 1,89 (s,3H,5-CH₃).

25

Analyse af $C_{11}H_{15}N_5O_4$

Beregnet: C: 46,97, H: 5,38, N: 24,90

30 Fundet : 47,06, 5,40, 24,86

Præparation B

1-(3'-Azido-2',3'-didesoxy- β -D-threo-pentofuranosyl-5-(trifluormethyl)uracil (ikke ifølge opfindelsen)

35 Man beskyttede 5'-hydroxygruppen i 5-trifluormethyl-2'-desoxyuridin med en triphenylmethylgruppe og me-

sylerede 3'-hydroxygruppen. Man lod produktet (3,0 g, 4,9 mmol) reagere ved 70°C med 0,7 g LiN₃ i 50 ml DMF i ca. 26 timer. Den afkølede reaktionsblanding blev udhældt på is under omrøring. Man isolerede det faste stof, vaskede det med vand og rensede det ved hjælp af flashchromatografi med hexan/ethylacetat (2:1 v/v). Kombineret af de relevante fraktioner og fjernelse af opløsningsmidlet gav 0,83 g trityleret produkt. Man opløste dette i en mættet opløsning af zinkbromid i acetonitril og holdt det under omrøring natten over ved 0°C. Derefter tilsatte man 100 ml ammoniumacetat (1 M), fraskilte det organiske lag og inddampede under vakuum til tørhed. Man rensede remanensen ved flashchromatografi ved hjælp af CHCl₃/CH₃OH (20:1 v/v). Man kombinerede fraktionerne, inddampede dem under vakuum og opnåede et udbytte af titelforbindelsen på 0,25 g, 0,8 mmol, 5,3%; smp 118-120°C.

Eksempel 28

20 1-(3'-Azido-2',3'-didesoxy-β-D-threo-pentofuranosyl)-uracil

Man beskyttede 5'-hydroxygruppen i 2'-desoxyuridin og mesylerede 3'-hydroxygruppen. Man fortrængte 3'-mesylgruppen under omvendning af konfigurationen ved ophedning med lithiumazid (3 ækvivalenter) i dimethylformamid ved 80°C i 24 timer. Man udhældte reaktionsblandingen i isvand, hvorved produktet udskiltes. Efter filtrering fjernedes beskyttelsen på det fugtige produkt. Den endelige rensning foregik ved chromatografi på silicagel med eluering med chloroform/methanol (95:5). De relevante fraktioner blev kombineret og man fjernede opløsningsmidlerne til opnåelse af titelforbindelsen som et fast stof; smp = 142-145°C.

Eksempel 291-(3'-Azido-2',3'-didesoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-uracil

Man tritylerede 5'-hydroxygruppen i 2'-desoxyuri-
5 din (30 g, 0,13 mol) ved fremgangsmåden ifølge Horwitz
et al. (J. Org. Chem., 31, 205, (1966)). 3'-hydroxygrup-
pen (12,6 g, 0,027 mol) blev chloreret. Man fjernede di-
methylacetamid under vakuum og udhældte den tykke olie i
vand (500 ml). Produktet blev 3 x ekstraheret med ether.
10 Man fjernede opløsningsmidlet og chromatograferede den
dannede olie på silicagel, idet man først eluerede med
dichlormethan og derefter med 1% methanol i dichlorme-
than. Man kombinerede produktfraktionerne og fjernede
opløsningsmidlerne under vakuum. Beskyttelsen på 5'-hy-
15 droxygruppen blev fjernet uden yderligere rensning, idet
man ophedede i 80% eddikesyre på dampbad i 20 minutter.
Ved afkøling udskiltes tritylcarbinol som blev bortfil-
treret. Filtratet blev indkoncentreret under vakuum og
chromatograferet på silicagel med ethylacetat som elue-
20 ringsmiddel. Man fjernede 3'-chlorgruppen ved ophedning
i HMPA med lithiumazid (3 ækv.) ved 90°C natten over,
hvorefter man udhældte reaktionsblandingen i vand og
ekstraherede med chloroform. Chloroformen indeholdt pro-
duktet og blev tørret over magnesiumsulfat. Ved fjernel-
25 se af chloroformen opnåede man et fast stof, som blev
omkrystalliseret, først fra ethylacetat/methanol og
derefter fra vand. Det omkrystalliserede faste stof blev
opløst i vand og påsat en søjle af XAO. Efter vask med
vand eluerede man titelforbindelsen med ethanol. Man
30 fjernede ethanolen under vakuum til opnåelse af et fast
stof; smp = 166,5-168,5°C.

Eksempel 301-(3'-Azido-2',3'-didesoxy-erythro- β -D-pentofuranosyl)-5-ethyluracil

Man fremstillede 5-chlormercuri-2'-desoxyuridin
5 ud fra 2'-desoxyuridin (10 g, 0,044 mol) ved fremgangs-
måde ifølge Bergstron og Ruth (J. Carb. Nucl, and Nucl.,
4, 257, (1977)). Man fremstillede 2'-desoxy-5-ethyluri-
din ved fremgangsmåden ifølge Berstrom et al., (J. Am.
Chem. Soc., 100, 8106, (1978)). 5'-hydroxygruppen blev
10 beskyttet ved fremgangsmåden ifølge Præparation B, 3'-
hydroxygruppen blev chloreret og beskyttelsen på 5'-
gruppen blev fjernet ved fremgangsmåden ifølge Eksempel
29. Man fortrængte 3'-chlorgruppen i threo 3'-chlor-
2',3'didesoxyuridin med inversion af konfigurationen,
15 idet man ophedede i HMPA med lithiumazid (5 ækv.) ved
55°C i 1 time. Man rensede titelforbindelsen ved chroma-
tografi på silicagel med acetylacetat som elueringsmid-
del. Fjernelse af opløsningsmiddel fra de relevante
fraktioner gav den ønskede forbindelse; smp = 112,5-
20 115°C.

Eksempel 311-(3'-Azido-2',3'-didesoxy- β -D-threo-pentofuranosyl)-5-methylisocytosin

25 I en trykbeholder anbragte man 1-(3'-Azido-2',3'-
didesoxy- β -D-threo-pentofuranosyl)-2-methoxy-5-methyl-
4(H)-pyrimidinon (0,5 g, 2 mmol) og 15 ml methanol
mættet med ammoniak. Efter 6 dage ved stuetemperatur op-
hedede man trykbeholderen i et oliebad til 35°C i 4
30 dage. Man inddampede reaktionsblandingen til tørhed og
renkede ved omkrystallisering fra CHCl₃/CH₃OH (9:1 v/v).
Det faste stof blev vasket ved CHCl₃ og lufttørret til
opnåelse af 0,16 g, 0,6 mmol (30%) produkt; smp
158-160°C.

41

Analyse af $C_{10}H_{14}N_6O_3$, $1/4 H_2O$

Beregnet: C: 44,36, H: 5,40, N: 31,04

Fundet : 44,42, 5,36, 31,04

5

Eksempel 321-(3'-Azido-2',3'-didesoxy- β -D-threo-pentofuranosyl)-3-methylthymidin

Man holdt 5'-trityl-3'-threo-3'-azido-3'-desoxy-thymidin (1,0 g, 1,95 mmol) og N,N-dimethylformamid di-
 10 methylacetal (Zemlicka, Coll. Czech. Chem. Comm., 35,
 3572 (1972)) (0,93 g, 7,8 mmol) under tilbagesvaling i
 50 ml $CHCl_3$ i 96 timer. Man fjernede opløsningsmidlet
 under dannelse af en olie, som yderligere blev rensat
 ved flashchromatografi med $CHCl_3$. Ved fjernelse af op-
 15 løsningsmidlet opstod 0,54 g skum. Beskyttelsen blev
 fjernet, idet man ophedede skummet i 50 ml 80% eddike-
 syre på dampbad i 2 timer, hvorefter man fjernede tri-
 tylcarbinolen ved filtrering efter fortynding af reak-
 tionsblandingen med H_2O . Filtratet blev under vakuum
 20 inddampet til en olie, som blev rensat ved flashchroma-
 tografi ved hjælp af $CHCl_3$ /EtOAc (2:1 v/v). Man fjernede
 opløsningsmidlet til opnåelse af forbindelsen som en
 olie, 0,20 g.

25 UV max (nm) ved pH 1 $\lambda_{max} = 267$ ($\epsilon=8100$), $\lambda_{sh} = 209$
 ($\epsilon=8500$), ved pH 13 $\lambda_{max} = 267$ ($\epsilon=8000$).

H^1 NMR (DMSO- d_6): δ 7,56 (s,1H,H6); δ 6,07 (dd,1H,H₁);
 δ 3,17 (s,3H,N-CH₃); δ 1,86 (s,3H,5-CH₃).

30

Analyse af $C_{11}H_{15}N_5O_4$, 0,4 HOAc, 0,3 H_2O

Beregnet: C: 45,62, H: 5,58, N: 22,54

Fundet : 45,67, 5,60, 22,57

Eksempel 33Anti HIV aktivitet for 3'-azidonucleosider in vitro

In vitro aktiviteten af 3'-azidonucleosider (medikamenter) blev undersøgt overfor to cellelinier; H9 (OKT4⁺ T-cellelinie, der tillader HIV replikation, men er delvis resistent overfor den cytopatiske virkning af HIV) og TM3 (T-celleklon, specifik overfor tetanus-toksoid og udødeliggjort af dødeligt bestrålet HTLV-I og udvalgt på grund af dens hurtige vækst og følsomhed overfor HIV cytopatisk effekt).

Inhibitionsforsøget blev udført på følgende måde: TM3 celler blev stimulerede med antigen-plus bestrålede (4000 rad, 40 Gy) friske mononucleære autologe perifere blodceller (PBM) og dyrket i fuldstændig medium med indhold af 15% (v/v) interleukin 2 (IL-2, lectin-fjernet; Cellular Products, Buffalo, NY) 6 dage før forsøget. Man benyttede ATH8 celler uden antigenstimulering. Efter en forudgående behandling med 2 µg polybren pr. ml i 30 minutter, blev de relevante T-celler (2×10^5) centrifugeret, udsat for HIV i 45 minutter, igen udsuspenderet i 2 ml frisk medium og inkuberet i kulturglas ved 37°C i fugtig luft, der indeholdt 5% CO₂. Kontrolceller blev behandlet på lignende måde, men blev ikke udsat for virus. Cellerne blev kontinuert udsat for IL-2 og medikament. Når ATH8 celler blev benyttet i dette forsøgssystem, var 5 viruspartikler pr. celle den mindste cytopatiske dosis for virus. I det samtidige cellekultur-eksperiment blev 5×10^4 dødeligt bestrålede (10.000 rad) HIV RF-II-producerende H9 celler eller ikke-inficerede H9 celler sat til 2×10^5 relevante T celler. På forskellige tidspunkter talte man de totale antal levedygtige celler i et ahæmocytometer under mikroskopet ved tryptanblå farveeksklusionsmetoden. Resultaterne vises i tabel 1.

Tabel 1

<u>Forbindelse</u>	<u>ED₅₀(μM)</u>
3'-Azido-2',3'-didesoxycytidin	10

5

Eksempel 34

In vitro antibakteriel aktivitet af 3'-azidonucleosider

I tabel 2 vises in vitro antibakteriel aktivitet af 3'-azidonucleosider udtrykt som mindste inhibitoriske koncentration (MIC) overfor forskellige bakteriearter.

Trimethoprim (TMP) blev benyttet som standard og medium var Welcotest sensitivitetsprøve Agar plus 7% lyseret hesteblood.

Tabel 2

<u>Organisme</u>	<u>MIC (μg/ml)</u>						<u>Standard</u>
	<u>Forbindelse</u>						
	1	2	3	4	6	7	
<u>E.coli</u>	0,1>	>100	10	0,1>	0,1>	10	>100
20 <u>Salmonella typhimurium</u>	0,1>	10	10	0,1>	10	10	0,5
<u>Salmonella typhosa</u>	0,1>	0,1>	10	0,1>	10	10	0,1
<u>Enterococcus faecalis</u>	0,1>	10	>100	>100	10	10	0,5
<u>Citrobacter freundii</u>	10	10	10	0,1>	10	10	0,5

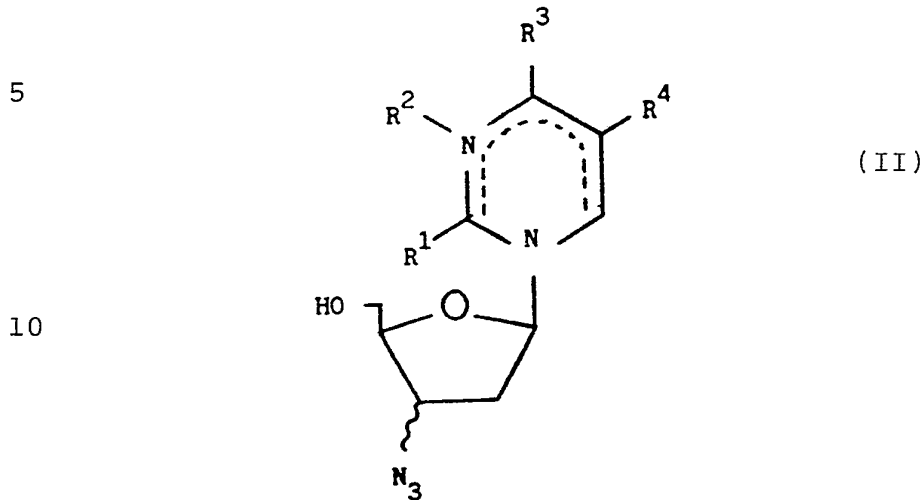
25

Anvendte forbindelser var:

- 1) 3'-Azido-3'-desoxy-4-thiothymidin
- 30 2) 3'-Azido-3'-desoxy-5'-O-acetyl-4-thiothymidin
- 3) 3'-Azido-3'-desoxy-2-desoxy-2-thiothymidin
- 4) 5'-Acetyl-3'-azido-3-benzoyl-3'-desoxythymidin
- 5) 1-(3'-Azido-2',3'-dideoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-2-(benzyloxy)-5-methyl-4-(1H)-pyrimidinon
- 35 6) 3'-Azido-3'-desoxy-2-methoxythymidin

P A T E N T K R A V

1. 3'-Azidopyrimidinnucleosider med den almene formel II:



15 hvori

den punkterede linie betegner en eller flere eventuelle yderligere bindinger i C_2-N_3 , N_3-C_4 , C_4-C_5 og/eller C_5-C_6 stillinger;

20 R^1 betegner hydroxy, oxo, mercapto, thio, amino eller alkoxy;

R^2 betegner hydrogen, methyl, C_{1-2} alkanoyl eller benzoyl, eller mangler, hvis R^1 og R^3 begge er monovalente substituentter;

25 R^3 betegner hydroxy, oxo, mercapto, thio, amino, alkyl-amino eller dialkylamino; og

R^4 betegner alkyl, hydroxy, alkenyl, alkynyl eller hydrogen;

idet dog R^4 ikke kan være methyl, når R^1 og R^3 begge er oxo, og R^2 er hydrogen;

30 eller et farmaceutisk acceptabelt salt eller en farmaceutisk acceptabel ester deraf, til anvendelse ved behandling af eller profylakse for en human retroviral infektion.

2. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g -

n e t ved, at forbindelsen er 1-(3'-azido-2',3'-didesoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)uracil.

3. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at den nævnte infektion er en HTLV-infek-
5 tion.

4. Forbindelse ifølge krav 3, k e n d e t e g -
n e t ved, at HTLV-infektionen er en HTLV-I eller HTLV-
II infektion.

5. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g -
10 n e t ved, at den nævnte infektion er en HIV-infektion.