

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

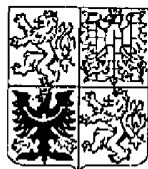
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2114-96

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30. 01. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **28.01.94**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/189070**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16. 09. 98**
(Věstník č. 9/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US95/01253**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 95/20595**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 H 19/00
C 07 H 19/06
C 07 H 19/16
A 61 K 31/70

(71) Přihlášovatel:

UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH
FOUNDATION INC., Athens, GA, US;
YALE UNIVERSITY, New Haven, CT, US;

(72) Původce:

Chu Chung K., Athens, GA, US;
Cheng Yung-Chi, Woodbridge, CT, US;
Pai Balakrishna S., New Haven, CT, US;
Yao Gang-Qing, Guilford, CT, US;

(74) Zástupce:

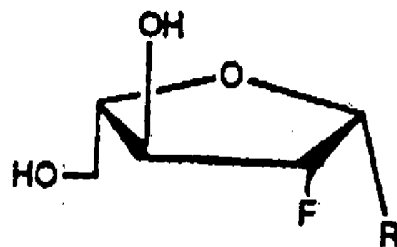
Koreček Ivan JUDr.; Na baště sv. Jiří 9,
Praha 6, 16000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**L-nukleosidy pro léčení hepatitidy viru B
a Epstein-Bar viru**

(57) Anotace:

Sloučenina L-nukleosidu vzorce /I/, kde R je purinová nebo pyrimidinová báze. Použití sloučeniny /I/ a jejích farmaceuticky významných solí pro výrobu léčiva k léčení EBV nebo HBV infekce. V preferovaném provedení je účinnou sloučeninou 2-fluor-5-methyl-b-L-arabinofuranosyluridin /také označený L-FMAU/, který je protivirovým činidlem proti HBV a EBV a vykazuje nízkou cytotoxicitu. Další příklady účinných sloučenin zahrnují N₁-2-deoxy-2-fluor-b-L-arabinofuranosyl/-5-ethyluracil, N₁-2-deoxy-2-fluor-b-L-arabinofuranosyl/-5-jodcytosin a N₁-2-deoxy-2-fluor-b-L-arabinofuranosyl/-5-joduracil.



(I)

CZ 2114-96 A3

L-nukleosidy pro léčení hepatitidy viru B a Epstein-Bar viru

U R A D P R Ů M Y S L O V É H O V L A S T N I C T V I P Ř Í L.	14. 11. 97	DOŠLO	0 1 2 2 7 1	č.j.
--	------------	-------	-------------	------

Oblast techniky:

Tento vynález spadá do oblasti způsobů léčení hepatitidy viru B (také označovaný jako "HBV") a Epstein-Bar viru (označovaný jako "EBV"), které zahrnují podávání účinného množství jedné nebo více zde popsaných aktivních sloučenin nebo farmaceuticky přijatelného derivátu nebo proléčiva jedné z těchto sloučenin.

Dosavadní stav techniky:

Hepatitida viru B dosáhla ve světě úrovně epidemie. Po období dvou až šesti měsíční inkubace, kdy hostitel neví o infekci, může vést HBV infekce k akutní hepatitidě a poškození jater, což vyvolává bolesti břicha, žloutenku a zvýšení hladiny některých enzymů v krvi. HBV způsobuje prudkou hepatitidu, prudce progresivní, často smrtelnou formu nemoci, při které jsou velké části jater zničeny.

Obvykle se pacienti z akutní virové hepatitidy uzdraví. U některých pacientů však vysoké hladiny virového antigenu přetrvávají v krvi po delší nebo neomezenou dobu a vyvolávají chronickou infekci. Chronické infekce mohou vést ke chronické přetrvávající hepatitidě. Pacienti infikovaní chronickou trvalou HBV jsou nejvíce soustředěni v rozvojových zemích. Uprostřed roku 1991 bylo pouze v Asii přibližně 225 milionů chronických nosičů HBV, a ve světě kolem 300 milionů nosičů. Chronické trvalé hepatitidy mohou způsobovat únavu, cirhózu jater, hepatocelulární karcinom a primárně rakovinu jater.

V západních průmyslových zemích vysoce rizikové skupiny pro HBV infekci zahrnují ty, kteří jsou v kontaktu s HBV nosiči

nebo s jejich vzorky krve. Epidemiologie HBV je ve skutečnosti velmi podobná získání syndromu ztráty imunity, což vysvětluje, proč je HBV infekce běžná mezi pacienty s AIDS nebo HIV- spojenými infekcemi. HBV je však více nakažlivý než HIV.

HBV je po tabáku druhou příčinou rakoviny lidí. Mechanismus, kterým HBV indukuje rakovinu, není známý, avšak předpokládá se, že je přímým podnětem rozvoje tumoru, nebo může rozvíjet tumor nepřímo přes chronický zánět, cirhózu a regeneraci buněk spojenou s infekcí.

Epstein-Barr virus (EBV) je členem rodu *Lymphocryptovirus*, který spadá do podčeledě *gammaherpesvirinae*. Je zvláště lymfotropní. EPV má klasickou strukturu herpesvirů, totiž jeho dvójitý DNA genom je obsažen v ikosapentaedrickém nukleocapsidu, který je, v řadě, obklopen lipidovým obalem hustě pokrytým virovými glykoproteiny.

Amorfní obalový protein zabírá prostor mezi obalem a nukleocapsidem.

Všechny lidské oparové viry infikují a replikují se do určité míry v lymfocytech, ale EBV je výkonnější. Významnější je, že patogeneze a hostitelské reakce na infekci EBV závisí více na lymfocytní infekci, než je to patrné u jiných lidských oparových virů.

EBV je nyní určen jako příčina B-buněčných lymfoproliferačních chorob a je řazen k varietě ostatních těžkých a chronických onemocnění, včetně vzácného progresivního mononukleóze podobného syndromu a orání vlasové leukoplakie u pacientů AIDS.

Předpoklad, že EBV je hlavní příčinou chronické únavy, není podrobně prozkoumán.

EBV se primárně přenáší slinami, avšak některé infekce jsou přenosné krevní transfuzí. Více než 85 % pacientů v akutní fázi infekční mononukleózy vylučuje EBV.

EBV je spojována s rakovinou.

Nejméně dvě skupiny pacientů jsou v nebezpečí rozvoje EBV-spojených lymfomů: ti, kteří přijali transplantáty ledvin, srdce, kostní dřeně, jater nebo brzlíku pod ochranou imunosupresivní léčby, a pacienti s AIDS.

EBV-spojené karcinomy zahrnují Burkittův lymfom a nosohltanový karcinom.

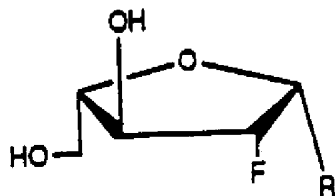
Ve světle faktu, že hepatitida viru B a Epstein-Barr viru má těžký a často tragický vliv na infikovaného pacienta, trvá silná potřeba zajistit účinný farmaceutický prostředek pro léčení lidí infikovaných viry s velkou toxicitou pro hostitele.

Předmětem tohoto vynálezu je tedy poskytnout sloučeninu, kompozici, a způsob léčení hepatitidy viru B.

Dalším předmětem vynálezu je poskytnout sloučeninu, kompozici a způsob léčení Epstein Barr viru.

Předmět vynálezu:

Způsob léčení hostitele, zejména člověka, infikovaného HBV nebo EBV se zajistí tak, že zahrnuje podání HBV- nebo EBV-léčivého množství L-nukleosidu vzorce



kde R je purinová nebo pyrimidinová báze.

Ve výhodném provedení je nukleosid stanoven jako indikovaný enantiomer a v podstatě za nepřítomnosti jeho korespondujícího enantiomeru (např. enantiomerně obohacený, včetně enantiomerně čisté formy).

V jednom výhodném provedení je účinnou sloučeninou 2'-fluor-5-methyl- β -L-arabinofuranosyluridin (také označovaný jako L-FMAU). Tato sloučenina je potenciálním antivirovým činidlem proti HBV a EBV a vykazuje nízkou cytotoxicitu.

Další specifické příklady aktivní sloučeniny zahrnují N₁-(2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl)-5-ethyluracil,

N₁-(2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl)-5-iodocytosin,

a

N₁-(2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl)-5-iodouracil.

V alternativním provedení je L-nukleosid stanovený pro použití při léčení HBV nebo EBV tak, že obsahuje 2'-arabinohydroxylovou skupinu, např. L-arathymidin, L-fludarabin, L-araguanosin, a L-arainosin, jak je zobrazeno na obr.1.

Zde popsané L-nukleosidy a jejich farmaceuticky přijatelné formulace obsahující tyto sloučeniny jsou vhodné při prevenci a léčení HBV infekcí a jiných podobných stavů jako anti-HBV protilátka pozitivní a HBV-pozitivní, chronické poškození jater vyvolané HBV, cirhóza, akutní hepatitida, prudká hepatitida, chronická trvalá hepatitida, a únava.

Sloučeniny mohou být podobně použity při léčení EBV-přidružených nemocí.

Tyto sloučeniny nebo formulace mohou také být použity profylakticky k prevenci, nebo zpoždění progresu klinických onemocnění u jednotlivců, které jsou anti-HBV nebo anti-EBV protilátka nebo HBV- nebo EBV-antigen pozitivní, nebo byli vystaveni HBV nebo EBV.

V dalším provedení mohou být účinná sloučenina nebo její deriváty nebo soli podávány v kombinaci nebo alternaci s jinou anti-HBV látkou nebo anti-EBV látkou, včetně těch uvedených výše, nebo anti-HIV látkou.

Obecně během alternativní léčby je účinné dávkování každé látky podáváno v serii, zatímco při kombinační terapii je účinné dávkování dvou nebo více látek podáváných společně. Dávkování bude záviset na absorpční, inaktivační rychlosti a rychlosti vylučování léků, stejně jako na dalších faktorech známých odborníkovi v oboru. Je potřeba poznamenat, že hodnoty dávkování se také budou měnit s těžkostí stavu, který se má zmírnit. Dále je zřejmé, že pro některé zvláštní subjekty by měla být uzpůsobena specifická dávkovací schemata a časové plány po dobu podle individuální potřeby a odborného posudku osoby podávající nebo dohlízející na podávání kompozice.

Neomezující příklady antivirových látek, které mohou být použity v kombinaci se zde popsanými sloučeninami zahrnují (-)-enantiomer 2-hydroxymethyl-5-(5-fluorcytosin-1-yl)-1,3-oxathiolanu (FTC); (-)-enantiomer 2-hydroxymethyl-5-(cytosin-1-yl)-1,3-oxathiolanu (3TC); karbovir, acyklovir, interferon, AZT, DDI (2',3'-dideoxyinosin), DDC (2',3'-dideoxycytidin), L-DDC, L-5-F-DDC a D4T.

Popis obrázků:

Obr.1 zobrazuje vybrané L-nukleosidy, které spadají do

předloženého vynálezu:

L-FMAU (2'-fluor-5-methyl- β -L-arabinofuranosyluridin),
 L-FIAU (2'-fluor-5-jod- β -L-arabinofuranosyluridin),
 L-FC (2'-fluor- β -L-arabinofuranosylcytosin),
 L-FIAC (2'-fluor-5-jod- β -L-arabinofuranosylcytosin),
 L-2-Cl-2'-F-2'-deoxyadenin,
 L-FEAU (2'-fluor-5-ethyl- β -L-arabinofuranosyluridin),
 L-arathymidin, L-fludarabin, L-araguanosin, a L-ara-inosin.

Obr.2 je graf v procentech životaschopných buněk proti koncentraci léčiva L-FMAU v H1 buňkách.

Obr. 3 je schematickým zobrazením přípravy 1-0-acetyl-2,3,5-tri-0-benzoyl- β -L-ribofuranosy (sloučenina 10).

Obr.4 je schematickým zobrazením alternativní přípravy 1-0-acetyl-2,3,5-tri-0-benzoyl- β -L-ribofuranosy (sloučenina 10).

Obr.5 je schematickým zobrazením způsobu přípravy 1,3,5-tri-0-benzoyl-2-deoxy-2-fluor- β -L-arabinofuranosy (sloučenina 13).

Obr.6 je schematickým zobrazením způsobu přípravy N₉-[3',5'-di-0-benzoyl-2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl]-2,6-di-chlorpurinu (sloučenina 15) a N₉-[2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl]-2,6-di-chlorpurinu (sloučenina 16).

Obr.7 je zobrazením způsobu přípravy více 2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl]-pyrimidinů (sloučeniny 17 - 24).

Obr.8 je zobrazením způsobu přípravy N₁-(2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl)-5-jodocytosinu (sloučenina 22).

Obr. 9 je zobrazením způsobu přípravy 9- β -L-arabinofuranosyladeninu.

Obr. 10 je zobrazením alternativního způsobu přípravy 1-0-acetyl-2,3,5-tri-0-benzoyl- β -L-ribofuranosy (sloučenina 10) z 1,2-di-0-isopropyliden- α -L-xylofuranosy (sloučenina 3).

Obr. 11 je graf koncentrace plazmy L-(-)-FMAU myší po orálním podání v nastavený čas (křížek, 10 mg/kg podaná dávka (dvakrát denně) po 29 dní před farmakokinetickou studií a potom se studie provede třicátý den při podání ve stejné koncentraci; tmavý kroužek, 50 mg/kg podávaná dávka po 29 dní před studií a potom se provede rozbor třicátý den v podání ve stejné koncentraci; prázdný kroužek, 50 mg/kg podáno poprvé první den studie).

Obr. 12 je graf koncentrace L-(-)-FMAU v játrech myší po orálním podání v nastavený čas (křížek, 10 mg/kg podaná dávka (dvakrát denně) po 30 dní před farmakokinetickou studií a potom se studie provede třicátý první den při podání ve stejné koncentraci; tmavý kroužek, 50 mg/kg podávaná dávka po 30 dní před studií a potom se provede rozbor třicátý první den v podání ve stejné koncentraci; prázdný kroužek, 50 mg/kg podáno poprvé první den studie).

Obr. 13a zobrazuje změnu hmotnosti těla po třiceti dnech kontroly BDF1 samičky myší.

Obr. 13b a 13c zobrazují změnu hmotnosti těla po třiceti dnech BDF1 samičky myší dávkování 10 mg/kg dávky (13b) a 50 mg/kg (13c) L-(-)-FMAU. Uvedená hmotnost těla znamená průměrnou a standardní odchylku pěti až sedmi myší.

Obr. 14-20 předkládají klinickou chemii myší plazmy po podávání L-(-)-FMAU při 10 mg/kg (tři myši) nebo 50 mg/kg (tři myši) podáváno po třicet dní:

Obr. 14 je šrafovaný diagram koncentrace celkového bilirubinu v plazmě myší v mg/dL.

Obr. 15 je šrafovaný diagram koncentrace alkalické fosfatasy v plazmě myší v U/L.

Obr. 16 je šrafovaný diagram koncentrace kreatininu v plazmě myší v mg/dL.

Obr.17 je šrafovaný diagram koncentrace AST (SGOT, serum glutamové štavelové transaminázy) v plazmě myší v U/L.

Obr 18. je šrafovaný diagram koncentrace ALT (SPGT, serum glutamové pyrovik transminázy) v myší plazmě v U/L.

Obr.19 je šrafovaný graf koncentrace kyseliny mléčné v plazmě myší v mmol/l.

Obr. 20 je šrafovaný graf koncentrace mléčné dehydrogenasy v plazmě myší v U/L.

Podstata vynálezu

Jak bylo řečeno, termín "enantiomerně obohacený" označuje nukleosidovou kompozici, která zahrnuje nejméně přibližně 95 %, a výhodně přibližně 97 %, 98 %, 99 % nebo 100 % jediného enantiomeru tohoto nukleosidu.

Zde používaný termín alkyl zejména zahrnuje, ale neomezuje se na ně, C₁ až C₁₀ alkylové skupiny, včetně methyl, ethyl, propyl, butyl, pentyl, hexyl, isopropyl, isobutyl, sek.-butyl, t-butyl, isopentyl, amyl, t-pentyl, cyklopentyl a cyklohexyl.

Zde používaný termín acyl zejména zahrnuje, ale neomezuje se na ně, acetyl, propionyl, butyryl, pentanoyl, 3-methylbutyryl,

hydrogen sukcinat, 3-chlorbenzoat, benzoyl, acetyl, pivaloyl, methansulfonát, propionyl, valeryl, kyseliny kapronové, kyseliny kaprylové, kyseliny kaprinové, kyseliny laurové, kyseliny myristové, kyseliny palmitové, kyseliny stearové a kyseliny olejové.

Zde používaný termín aryl, pokud není definován jinak, značí fenyl.

Termín "chráněný", zde používaný, pokud není definovaný jinak, označuje skupinu, která se přidá k dusíkovému nebo kyslíkovému atomu k zabránění jeho další reakce v průběhu derivatizace dalších podílů molekuly, ve které je kyslík nebo dusík umístěn.

Pro odborníka v oboru organických syntéz je známá široká řada kyslík a dusík chránících skupin.

Termín purinová nebo pyrimidinová báze zahrnuje, ale neomezuje se na ně, adenin, N⁶-alkylpuriny, N⁶-acylpuriny (kde je C(O) (alkyl, aryl, alkaryl, nebo aralkyl), N⁶-benzylpurin, N⁶-halopurin, N⁶-vinylpurin, N⁶-acetylenpurin, N⁶-acylpurin, N⁶-hydroxylalkylpurin, N⁶-thioalkylpurin, thymín, cytosin, 6-azapyrimidin, 2-merkaptopyrimidin, uracil, N⁵-alkylpyrimidiny, N⁵-benzylpyrimidiny, N⁵-halopyrimidiny, N⁵-vinylpyrimidin, N⁵-acetylenpyrimidin, N⁵-acylpyrimidin, N⁵-hydroxyalkylpurin, N⁶-thioalkylpurin, 5-azacytidinyl, 5-azauracilyl, triazolopyridinyl, imidazolopyridinyl, pyrrolopyrimidinyl, pyrazolopyrimidinyl, .

Funkční skupiny na bázi kyslíku a dusíku jsou chráněny jak je nezbytné nebo žádoucí. Vhodné chránící skupiny jsou odborníkovi v oblasti techniky dobře známé, a zahrnují trimethylsilyl, dimethylhexylsilyl, t-butyldimethylsilyl, a t-butyldifenylsilyl, tritylmethyl, alkylskupiny, acylskupiny jako je acetyl, propionyl, butyl, methylsulfonyl, a p-toluylsulfonyl.

Specificky zahrnuje 5-methyluracil (thymin), 5-jodouracil, cytosin, a 5-ethyluracil.

Vynálezem, jak je zde popsán, je způsob a kompozice pro léčení HBV infekce, EBV infekce, a jiných virů replikujících podobným způsobem, u lidského nebo zvířecího hostitele, jako je HIV, který zahrnuje podání účinného množství jedné nebo více výše identifikovaných L-nukleosidů, nebo jejich fyziologicky přijatelných solí, výhodně na farmaceuticky přijatelném nosiči. Sloučeniny podle tohoto vynálezu mají buď anti-HBV aktivitu, anti-EBV aktivitu, nebo jsou metabolizovány na sloučeninu nebo sloučeniny, které vykazují anti-HBV nebo anti-EBV aktivitu. Sloučeniny zde popsané mohou být také použity k léčení HBV a EBV sdružených nemocí.

Účinná sloučenina může být podána jako jakýkoliv derivát, který je při podání příjemci schopný poskytnout přímo nebo nepřímo výchozí látku, nebo který vykazuje aktivitu sám o sobě.

Neomezujícími příklady jsou farmaceuticky přijatelné soli (alternativně označované jako "fyziologicky přijatelné soli"), a 5' a purinem nebo pyrimidinem acylované nebo alkylované deriváty aktivní sloučeniny (alternativně označované jako "fyziologicky aktivní deriváty").

V jednom provedení je acylovou skupinou ester kyseliny (např. $-C(O)R'$), ve kterém je nekarbonylová část (R') esterskupiny vybraná z přímého, větveného nebo cyklického C_1 až C_{10} alkylu, alkoxyalkylu včetně methoxymethylu, aralkylu včetně benzylu, aryloxyalkylu jako je fenoxymethyl, arylu včetně fenylu výhodně substituovaného halogenem, C_1 až C_4 alkylem nebo C_1 až C_4 alkoxyskupinou, estersulfonatu jako je alkyl nebo aralkylsulfonyl včetně methansulfonylu, mono, di nebo trifosforečnan ester, trityl nebo monometoxytrityl, substituovaný benzyl, trialkylsilyl (např. dimethyl-t-butylsilyl) nebo difenylmethylsilyl.

Arylskupiny v esterech výhodně obsahují fenyl nebo benzylskupinu. Alkylskupinou může být přímá, větvená nebo cyklická, výhodně C₁ až C₁₀ skupina.

I. Syntéza L-Nukleosidů

L-nukleosidy zde popsané mohou být připraveny dále podrobně popsanými způsoby, nebo způsoby známými z oblasti techniky.

Ve schemech syntéz popsaných dále lze použít namísto zde uvedených jiná standardní činidla, včetně ekvivalentních kyselin, bází a rozpouštědel, jak jsou známé odborníkovi v oblasti techniky. Lze použít širokou oblast chránicích skupin kyslíku a dusíku, které jsou popsány, např., v Green a kol., "Protective Groups in Organic Synthesis," John Wiley and Sons, druhé vydání, 1991.

Vhodné chránicí skupiny kyslíku a dusíku zahrnují, například, trisubstituovanou silylskupinu jako je trimethylsilyl, dimethylhexylsilyl t-butyldimethyldsilyl, t-butyldifenylsilyl, trityl, alkylskupina, acylskupiny jako je acetyl, propionyl, benzoyl, p-NO₂, benzoyl, benzyl nebo toluy, methylsulfonyl, nebo p-toluylsulfonyl.

Funkční skupiny kyslíku a dusíku na bázi heterocyklu mohou být chráněny před kondenzací s cukrem.

Vhodná redukční činidla zahrnují NaBH_4 , diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H), tetrahydroboritan lithný (LiBH_4), a bis(metoxymetoxi)aluminiumhydrid sodný (Red-Al).

Vhodná oxidační činidla zahrnují vodnou kyselou kyselinu chromovou (HCrO_3), dichroman sodný (Na_2CrO_7), pyridinium chlorochroman (PCC), pyridinium dichroman (PDC), manganistan draselný (KMnO_4), tetraacetát olova/pyridin, kyslík na katalyzátoru pletina/uhlík, RuO_4 , $\text{RuO}_4/\text{NaIO}_4$.

dimethylsulfoxid/dicýklohexylcarbodiimid (DMSO/DCC) a donor protonu, uhličitán stříbrný, karbonattrifenylovizmut, Oppenaurova oxidace (alkoxid hliníku v acetonu) a oxid manganičitý (pro selektivní oxidaci allylových nebo benzylových alkoholů za přítomnosti jiných alkoholů).

Friedel-Craftsovy katalyzátory (Lewisovy kyseliny), které mohou být použity při kondenzačních reakcích, zahrnují SnCl_4 , ZnCl_4 , TiCl_4 , AlCl_3 , FeCl_3 , BF_3 -diethyleter a BCl_3 . Tyto katalyzátory vyžadují bezvodé podmínky, neboť přítomnost vody snižuje jejich aktivitu. Katalyzátory jsou také inaktivovány za přítomnosti organických rozpouštědel s aktivním vodíkem, jako jsou alkoholy a organické kyseliny. Katalyzátory jsou typicky používány v rozpouštědlech jako je sulfid uhličitý, methylenchlorid, nitromethan, 1,2-dichlorethan, nitrobenzen, tetrachlorethan, chlorbenzen, benzen, toluen, dimethylformamid, tetrahydrofuran, dioxan nebo acetonitril. Bezvodý chlorid hlinitý není rozpustný v sulfidu uhličitém. Niedballa a kol., J. Org. Chem. 39, 25 (1974). Preferovaným katalyzátorem je SnCl_4 . Výhodným rozpouštědlem je 1,2-dichlorethan. Trimethylsilyltriflat může být použit za stejných podmínek popsaných výše pro Friedel-Craftsovy katalyzátory.

Reakce probíhá při teplotě v rozmezí od -10°C do 200°C . Desilylace se může provádět s různými reagenty, včetně kyseliny octové, kyseliny trifluoroctové, hydrogenfluoridu, n-tetrabutylamoniumfluoridu, fluoridu draselného a pyridinium HCl .

S odkazem na obr. 3, vycházejícím z L-xylosy (1a), klíčový meziprodukt 1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -L-ribofuranosa (10) byl syntetizován v celkovém výtěžku 20 %

(L.Vargha, *Chem.Ber.*, 1954, 87, 1351; Holy, A., a kol., *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry*, V1, 163-67).

Jak je uvedeno na obr.4, sloučenina 10 může být také syntetizována z dražšího výchozího materiálu L-ribosy (Holy, A., a kol., *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry*, V1, 163-67).

Obr.3 ilustruje alternativní syntézu sloučeniny 10 (výtěžek 53 %), který je následně fluorován v C2 (*J.Org.Chem.*, 1985, 50, 3644-47) a získá se 1,3,5-tri-O-benzoyl-2-deoxy-2-fluoro-L-arabinofuranosa (13), která byla kondenzována s různými bázemi přes broncukr k poskytnutí 2'-deoxy-2'-fluorarabinofuranosylnukleosidy v různých výtěžcích.

1,2-Di-O-isopropyliden- α -L-xylofuranosa (3)

Do 650 ml bezvodého acetonu byly přidány 4 ml koncentrované kyseliny sírové, 5 g molekulárního síta (4A), 80 g bezvodého síranu měďnatého a 50 g L-glykosy a směs byla míchána při teplotě místnosti 36 hodin. Reakční směs byla zfiltrována a důkladně promyta acetonem, spojené filtráty byly neutralizovány hydroxidem amonným a odpařeny dosucha. Byl přidán ethylacetát (200 ml), potom zfiltrován a odpařen. Vytěžený olej, který byl rozpuštěn ve 250 ml roztoku 2% HCl, byl míchán při teplotě místnosti 2,5 hod. pH bylo udržováno na 8 nasyceným NaHCO₃, potom byl odpařen dosucha, zbytek byl extrahován ethylacetátem. Odstranění rozpouštědla poskytne žlutý olej sloučeniny 3 (41,7 g, 82,3 %).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 5.979 (d, J=3.78 Hz, 1H, H-1); 4.519 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-2); 4.308 (bd, 1H, H-3); 4.080 (m, 3H, H-4 a H-5); 1.321 (s, 3H, CH₃); 1.253 (s, 3H, CH₃).

1,2-Di-O-isopropyliden-3,5-di-O-o-tolylsulfonyl- α -L-xylofuranosa (4)

Sloučenina 3 (40 g, 210 mmol) byla míchána v 500 ml bezvodého pyridinu při 0 °C, zatímco TsCl (75 g, 393 mmol) byl rozpuštěn ve 100 ml CHCl₃ a byl přidán po kapkách. Po 3 hodinách byl přidán stejně jako předtím další podíl TsCl (50 g, 262 mmol) v 50 ml CHCl₃. Směs byla míchána při teplotě místnosti po 24 hod, potom ochlazena na 0 °C, byla přidána voda (10 ml), a mícháno při teplotě místnosti po 30 minut. Reakční směs byla vložena do 500 ml ledové vody, extrahována s CHCl₃ (150 ml x 4), promyta 1,5M H₂SO₄ (150 ml x 4), nasyceným NaHCO₃ (200 ml x 2), sušena (MgSO₄). Odstraněním rozpouštědla vznikne hnědý sirup, který během krystalizace z EtOH dává (4) jako bílou pevnou látku (103,8 g, 99%).

¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.282, 7.836 (m, 8H, OTs); 5.849 (d, J=3.51 Hz, 1H, H-1); 4.661, 4.779 (m, 2H, H-3 a H-4); 4.193 (dd, 1H, H-2); 4.011 (d, 2H, H-5); 2.448, 2.478 (2s, 6H, -OTs); 1.261, 1.320 (2s, 6H, CH₃).

1,2-Di-O-acetyl-3,5-di-O-p-tolylsulfonyl- α,β -xylofuranosa (5)

Sloučenina 4 (70 g, 140,5 mmol) byla rozpuštěna v 700 ml ledové AcOH a 100 ml Ac₂O, zatímco 50 ml konc. kyseliny sírové bylo přidáno po kapkách při 0 °C. Výsledný roztok byl míchán přes noc při teplotě místnosti a potom nalit do 1 l ledové vody, extrahován CHCl₃ (200 ml x 4), promyt nasyc. NaHCO₃, sušen (MgSO₄). Po odstranění rozpouštědla ve vakuu byl získán (5) jako sirup (82,4 g, výtěžek suroviny 110 %).

Methyl-3,5-di-O-p-tolylsulfonyl- α , β -xylofuranosa (6)

Surovina (5) (80 g) byla míchána v 500 ml 1% HCl/CH₃OH při teplotě místnosti po 30 hod. Rozpouštědlo bylo odstraněno za sníženého tlaku, zbytek rozpuštěn ve 300 ml CHCl₃, promyt nasyc. NaHCO₃, sušen (MgSO₄).

Odstranění rozpouštědla poskytlo (6) jako sirup (60 g, 90% ze (4)).

Methyl-2-O-benzoyl-3,5-di-O-p-tolylsulfonyl- α , β -xylofuranosid (7)

Sirup (6) (60 g, 127 mmol) byl rozpuštěn ve 200 ml pyridinu a míchán při 0 °C, zatímco benzoylchlorid (40 ml, 345 mmol) byl přidán po kapkách, výsledný roztok byl míchán při teplotě místnosti 17 hod. Byl zkoncentrován na asi 50 ml, potom vložen do 300 ml ledové vody, extrahován CHCl₃, promyt 3N H₂SO₄ a nasyc. NaHCO₃, sušen (MgSO₄). Po odpaření rozpouštědla byl získán (7) jako sirup (71 g, 97%).

Methyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- α - β -L-ribofuranosid (9)

Sirup (7) (70 g) a benzoat sodný (100 g, 694 mmol) byl suspendován v 1200 ml DMF a mechanicky míchán pod refluxem po 26 hod. Byl ochlazen na teplotu místnosti a potom vložen do 1 l ledové vody, extrahován etherem, sušen (MgSO₄).

Odpařením rozpouštědla byl získán sirup (50 g, 8a a 8b), který byl rozpuštěn ve 180 ml pyridinu a benzoylován (BzCl, 20 ml, 172 mmol) po 17 hod při teplotě místnosti. Po skončení byl získán (9) jako hnědý sirup (48 g, 83% ze (7)).

1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -L-ribofuranosa (10)

Sloučenina (9) (26 g, 54,6 mmol) byla zpracována s 275 ml ledové kyseliny octové, 55 ml acetanhydridu a 16 ml konc. kyseliny sírové při 0 °C při teplotě místnosti po 17 hod. Potom byla nalita do 1 l ledové vody, extrahována chloroformem (200 ml x 4). Spojené extrakty byly promyty nasyc. NaHCO₃ a sušeny (MgSO₄). Po odstranění rozpouštědla byl získán hnědý sirup, který byl zpracován s ethanolem za vzniku (10) jako bílé pevné látky (8,8 g, 32%). b.t. 124,7 °C, lit. 129-130 °C; D forma: 130-131 °C [α]_D = -45,613 (c 1,0, CHCl₃), D forma: [α]_D = +44,2.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 7.317, 8.134 (m, 15H, OBz); 6.437 (s, 1H, H-1); 5.835 (m, 2H, H-2 a H-3); 4.649 (m, 3H, H-4 a H-5); 2.003 (s, 3H, CH₃COO-).

1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -L-ribofuranosa (z L-ribosy)

L-Ribosa (5 g, 33,3 mmol) byla suspendována ve 120 ml 1% HCl/MeOH a míchána při teplotě místnosti po 3 hod, až se získá jasný roztok. Reakce byla zchlazena přidáním 30 ml bezvodého pyridinu, potom byla látka odpařena za sníženého tlaku.

Výsledný sirup byl odpařen spolu s pyridinem (30 ml x 2), potom rozpuštěn v 80 ml bezvodého pyridinu a míchán při 0 °C, zatímco benzoylchlorid (20 ml, 172 mmol) byl přidán po kapkách. Po míchání při pokojové teplotě po 17 hod byla reakce ukončena. Voda (10 ml) byla přidána a směs byla míchána při teplotě místnosti 0,5 hod, potom zkoncentrována na asi 50 ml, vlita do 150 ml ledové vody, extrahována chloroformem (50 ml x 4), promyta postupně 3N H₂SO₄ (30 ml x 2), nasyc NaHCO₃ (30 ml x 3), a sušena (MgSO₄).

Odstraněním rozpouštědla byl získán (9) jako 13 g sirupu.

Surový (9) byl rozpuštěn v 80 ml HBr/AcOH (45%, hmotn./obj.)

a míchán při teplotě místnosti po 1.5 hod. Do této směsi byla přidána ledová kyselina octová (50 ml) a výsledný roztok byl míchán při 0 °C, přičemž 34 ml vody bylo pomalu přidáváno při udržování teploty pod 7 °C. Potom byl míchán při teplotě místnosti po 1 hod, vnesen do 200 ml ledové vody, extrahován chloroformem (50 ml x 5). Spojené extrakty byly promyty nasyc. NaHCO_3 , sušeny (MgSO_4).

Po odstranění rozpouštědla se získal sirup (13 g), který byl rozpuštěn ve 40 ml bezvodého pyridinu, míchán při 0 °C. Po kapkách byl přidán acetanhydrid (14 ml, 148.4 mmol). Po ukončení reakce byl produkt vnesen do 150 ml ledové vody, extrahován chloroformem (50 ml x 4), promyt postupně 3N H_2SO_4 (30 ml x 2), nasyc. NaHCO_3 (50 ml x 2), a usušen (MgSO_4).

Po odstranění rozpouštědla a zpracování s methanolem byl získán (10) jako bílá pevná látka (9,2 g, 53,7% z L-ribosy).

1,3,5-Tri-O-benzoyl- α -L-ribofuranosa (11)

Sloučenina 10 (9 g, 17.84 mmol) byla míchána v 10 ml CH_2Cl_2 při 0°C, zatímco 70 ml CH_2Cl_2 obsahujícího HBr (3,2 g, 30,5 mmol) bylo přidáno v jedné dávce. Směs byla míchána při 0 °C po 3,5 hod, byla přidána voda (55 ml) a směs byla míchána při teplotě místnosti 18 hod. Organická vrstva byla odebrána, promyta nasyc. NaHCO_3 , sušena (MgSO_4). Po odpaření rozpouštědla byla získána pěna, která po rekrystalizaci z CH_2Cl_2 a n-hexanu poskytla (11) jako bílou pevnou látku. (6,2 g, 75,5%). b.t. 137-138°C, lit. 140-141 °C, $[\alpha]_D = -81,960$ (c 0,55, CHCl_3 ; D forma: $[\alpha]_D = +83,71$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7.312, 8.187 (m, 15H, OBz) ; 6.691 (d, $J=4.59$ Hz, H-1); 5.593 (dd, $J_{4-3}=6.66$; $J_{2-3}=1.8$ Hz, 1H, H-3); 4.637, 4.796 (m, 4H, H-2, H-4 a H-5); 2.3 (b, OH).

**1,3,5-Tri-O-benzoyl-2- O - imidazosulfuryl - β - L -
ribofuranosa (12)**

Sloučenina (11) (5,94 g, 12,84 mmol) byla míchána v 50 ml bezvodého CH_2Cl_2 při -15°C (suchý led- CCl_4). Bezvodý DMF (15 ml) a sulfurylchlorid (3,2 ml, 3,98 mmol) byly přidány postupně. Roztok byl míchán při -15°C po 30 min a potom ponechán při teplotě místnosti po 4 hod. Ve třech částech byl přidán imidazol (8,7 g, 12,78 mmol), přičemž reakční směs byla chlazena v ledové lázni. Potom byla míchána při teplotě místnosti po 17 hod. Směs byla vnesena do 150 ml ledové vody a vodní fáze byla extrahována CH_2Cl_2 (50 ml x 3). Spojené organické vrstvy byly promyty vodou a sušeny (MgSO_4). Purifikace na koloně (hexan:EtOAc/5:1 - 1:1) poskytla (12) jako pevnou bílou látkou (3,7 g, 49%). m.p. $124,5-125,5^\circ\text{C}$. lit: 129°C ; $[\alpha] = -68,976$; D forma: $+66,154$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 6.9, 8.2 (m, 18H, Ar-H) ; 6.67 (d, $J=4.4$ Hz, 1H, H-1) ; 5.59 (dd, 1H, H-3), 5.21 (dd, 1H, H-2) ; 4.5, 4.8 (m, 3H, H-4 a H-5).

**1,3,5-Tri-O-benzoyl-2-deoxy-2-fluor- β - L-
arabinofuranosa (13)**

Suspenze (12) (3,33 g, 5,62 mmol), KHF_2 (1,76 g, 22,56 mmol) v 30 ml 2,3-butandiolu byla míchána pod argónem. Byla zahřívána na 150°C zatímco byl přidáván 1 ml $\text{HF}/\text{H}_2\text{O}$ (48%, 27,6 mmol) a směs byla míchána při 160°C po 1,5 hod. Byla přidána ledová solanka ke zmrazení reakce, a potom byl roztok extrahován methylenchloridem (50 ml x 4). Spojené extrakty byly promyty solankou, vodou, nasyc. NaHCO_3 , sušeny nad bezvodým síranem hořečnatým a aktivním uhlím (Darco-60). Potom byl nalit na podložku ze silikagelu (5 cm x 5 cm), promyt

methylenchloridem a potom EtOAc za vzniku sirupu, přičemž z 95% EtOH byl krystalizován (13) (1,3 g, 49,8%).

b.t. 77-78 °C; lit.: 82 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7.314, 8.146 (m, 15H, OBz); 6.757 (d, $J=9.1$ Hz, 1H, H-1); 5.38 (d, $J=48.5$ Hz, 1H, H-2) ; 5.630 (dd, $J=22.5$ Hz, 1H, H-3); 4.768 (m, 3H, H-4 a H-5).

N_9 -[3',5'-Di-O-benzoyl-2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl]-2,6-di-chlorpurin (15)

Sloučenina 13 (464 mg, 1 mmol) byla rozpuštěna v 10 ml methylenchloridu, zatímco bylo přidáno 1,4 ml HBr/AcOH (45% hmotn./obj.). Roztok byl míchán při teplotě místnosti po 24 hod, a potom odpařen dosucha. Zbytek byl rozpuštěn ve 20 ml methylenchloridu a promyt vodou, nasyc. NaHCO_3 , sušen (MgSO_4). Filtrací a odpařením vznikl bromcukr (14) (100%, na základě TLC).

Ve stejnou dobu byl 2,6-dichlorpurin (378 mg, 2 mmol) suspendován v 15 ml HMDS a 2 mg síranu amonného, a potom vařen pod zpětným chladičem 2 hod. HMDS byl odpařen ve vysokém vakuu pod dusíkem N_2 za vzniku bílé silylované báze.

Bromcukr 14 byl rozpuštěn ve 25 ml bezvodého 1,2-dichlorethanu. Výsledný roztok byl přidán do silylované báze pod N_2 . Směs byla míchána pod refluxem po 2 dny. Byl přidán chloroform, a potom postupně promýván vodou (20 ml x 2), nasyc. NaHCO_3 (20 ml x 2), nasyc. NaCl roztok (20 ml x 2), a sušen (MgSO_4). Z CHCl_3 krystalizovala sloučenina 15 (105 mg, 19,7%). b.t. 158 °C; D forma: 158 °C.

UV (methanol): λ_{max} : 238.50 nm, 273.0 nm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) : δ 8.82 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, H-8); 7.49, 8.33 (m, 10H, OBz) ; 6.767 (dd, $J_{\text{H-H}}=4$ Hz, $K_{\text{F-H}}=13.8$ Hz, 1H, H-1'); 5.854 (dq, $J=67.4$ Hz, 1H, H-2'); 5.910 (m, 1H, H-3') ; 4.751 (m, 3H, H-4' a H-5')

**N_9 -[2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl]-2,6-di-chlorpurin
(16)**

Sloučenina (15) (70 mg, 0,13 mmol) byla rozpuštěna ve 25 ml nasyc. $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ v utěsněné ocelové bombě a zahřívána na 90 °C po 6 hod. Po odstranění rozpouštědla za sníženého tlaku byla získána žlutá polotuhá látka, která byla čištěna preparativní TLC (9:1/ $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$).

Lyofilizací z vody a 1,4-dioxanu byl získán bílý prášek (16) (30 mg, 75 %). UV (H_2O) pH2, λ_{max} 212.00 nm, 263.50 nm (ϵ 6711); pH7, λ_{max} 213.50 nm, 263.00 nm (ϵ 7590); pH 11, λ_{max} 213.5 nm, 263,00 nm (ϵ 5468).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) : δ 8.279 (d, $J=1.5$ Hz, 1H, H-8); 7.908 (bs, 2H, NH_2); 6.321 (dd, $J_{\text{H-H}}=4.4$ Hz, $J_{\text{F-H}}=13.8$ Hz, 1H, H-1'); 5.986 (t, 1H, 5'-OH); 5.230 (dt, $J_{\text{F-H}}=52.6$ Hz, 1H, H-2'); 5.115 (d, 1H, 3'-OH); 4.425 (dq, $J_{\text{F-H}}=19$ Hz, 1H, H=3'); 3.841 (m, 1H, H-4'); 3.636 (d, 2H, H-5').

N_1 -(2'-Deoxy-2'-fluor-3',5'-di-O-benzyl- β -L-arabinofuranosyl)-thymin (17)

Do roztoku (13) (400 mg, 0,86 mmol) v bezvodém CH_2Cl_2 (10 ml) byl přidán bromovodík v kyselině octové (45% hmotn./obj., 1,5 ml), a získaný roztok byl míchán při teplotě místnosti po 17 hod. Po odpaření rozpouštědla a společném odpaření s toluenem byla získána sloučenina (14).

Ve stejnou dobu byl thymin (215 mg, 1.72 mmol) vařen pod zpětným chladičem v HMDS (25 ml) pod dusíkem 17 hod a byl získán homogenní roztok. Po odpaření rozpouštědla byl získán silylovaný thymin.

Roztok (14) v dichlormethanu (50 ml) byl přidán do silylovaného thyminu a výsledný roztok byl vařen pod zpětným chladičem pod dusíkem 3 dny. Byla přidána voda a potom byl produkt extrahován CHCl_3 . Organická vrstva byla promyta vodou, solankou a sušena (MgSO_4). Po odpaření rozpouštědla se získal syrový produkt, který byl čištěn preparativní TLC při použití 2% $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ za vzniku (17) (235 mg, 58%). m.p. 99 - 101 °C. UV (Methanol): 230, 264 nm $[\alpha]_D = +22.397$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7.343 - 8.389 (m, 12H, Ar-H, NH); 6.34 (dd, $J_{\text{H-H}} = 2.97$ Hz, $J_{\text{F-H}} = 28.32$ Hz, 1H, H-1'); 5.383 (dd, $J_{\text{H-H}} = 2.7$ Hz, $J_{\text{F-H}} = 63.27$ Hz, 1H, H-2'); 5.565 (dd, 1H, H-3'); 4.812 (d, 2H, H-5'); 4.466 (m, 1H, H-4'); 1.775 (s, 3H, CH_3). Anal. ($\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_7\text{F}$), C: 61.01; H: 4.57; N: 5.73; F: 3.92.

N_1 -(2'-Deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl)-thymin (18)

Sloučenina (17) (145 mg, 0.309 mmol) byla zpracována s $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ při teplotě místnosti po 18 hod. Po odpaření rozpouštědla a purifikaci preparativní TLC (15% $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$) byl získán (18) (70 mg, 87.5%). b.t. 174-175 °C. UV: 264 nm, $[\alpha]_D = -104.36$.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 11.401 (s, 1H, NH); 7.575 (s, 1H, H-6); 6.093 (dd, $J_{\text{H-H}} = 4.41$ Hz, $J_{\text{F-H}} = 15.6$ Hz, H-1'); 5.844 (d, 1H, 3'-OH); 5.019 (dt, $J_{\text{F-H}} = 53.3$ Hz, 1H, H-2'); 5.087 (t, 1H, 5'-OH); 4.194 (dq, 1H, H-3'); 3.647 (m, 3H, H-4' a H-5'); 1.781 (s, 3H, CH_3). Anal. ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{FO}_5$), C: 44.80; H: 4.97; N: 10.04; F: 7.03.

N₁-(2'-Deoxy-2'-fluor-3',5'-di-O-benzoyl-β-L-arabinofuranosyl)-5-ethyluracil (19)

Do roztoku (13) v bezvodém dichlormethanu (10 ml) byl přidán bromovodík v kyselině octové (45% hmotn./obj., 0,97 ml, 5,385 mmol). Roztok byl míchán při teplotě místnosti po 18 hod, a po odpaření rozpouštědla a společném odpaření s toluenem byl získán (14).

Ve stejnou dobu byl 5-ethyluracil (0,75 g, 5,39 mmol) suspendován v HMDS (10 ml) síranem amonným (5 mg) a vařen pod zpětným chladičem 5 hod pod dusíkem za vzniku homogenního roztoku.

Roztok silylované báze byl odpařen dosucha se zabráněním přístupu vlhkosti. Do vzniklého sirupu byl přidán roztok (14) v bezvodém 1,2-dichlorethanu (10 ml). Reakční směs byla míchána při 95 °C pod dusíkem 20 hod, potom odpařena pod vakuem dosucha za vzniku žluté pevné látky, která byla smísena s 5 ml CH₃OH/CHCl₃ (1:1) a zfiltrována. Filtrát byl odpařen a zbytek byl chromatografován na koloně silikagelu (CH₃OH/CHCl₃, 0-1%) za vzniku bílé pevné látky (19) (0,557 g, 100%).

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 11,55 (s, 1H, NH); 7,51, 8,08 (m, 10 H, Ar-H); 7,32 (s, 1H, H-6); 6,29, 6,37 (dd, J_{H-H} = 3,7 Hz, J_{F-H} = 20 Hz, 1H, H-1'); 5,68 - 5,75 (dd, J_{F-H} = 20 Hz, 1H, H-3'), 5,47 - 5,65 (dd, J_{F-H} = 54 Hz, 1H, H-2'); 4,62 - 4,83 (m, 3H, H-4' a H-5'); 2,01, 2,09 (q, 2H, CH₂CH₃); 0,85 (t, 3H, CH₃).

N₁-(2'-Deoxy-2'-fluor-β-L-arabinofuranosyl)-5-ethyluracil (20)

Sloučenina (19) (500 mg) byla rozpuštěna v methanolickém

amoniu (50 ml) a míchána při teplotě místnosti 44 hod.

Roztok byl odpařen dosucha za vzniku bílé pevné látky (0,4 g), která byla chromatografována na koloně silikagelu. ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$, 0-5%) za vzniku bílé pevné látky (20) (240 mg, 84%). b.t. 158-161 °C.

UV (MeOH) : λ_{max} 260 nm

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 11.42 (s, 1H, NH); 7.57 (s, 1H, H-6'); 6.10, 6-17 (dd, $J_{\text{H-H}} = 5.0$ Hz, $J_{\text{F-H}} = 14$ Hz, 1H, H-1'); 5.88 (bs, 1H, 3'-OH); 5.14, 5.19 (m, 2H, H-2' a 5'-OH); 4.98 (t, 1H, H-3'); 4.22, 4.28 (m, 1H, H-4'); 3.55, 3.78 (m, 2H, H-5')
 Anal. ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_5\text{F}$): C: 47.93; H: 5.56; N: 10.06; F: 6.68.

N¹-(2'-Deoxy-2'-fluor-3',5'-di-O-benzoyl- β -L-arabinofuranosyl)-N⁴-benzoyl-5-jodcytosin (21)

Do roztoku (13) (150 mg, 0,323 mmol) v bezvodém methylenchloridu (5 ml) byl přidán bromovodík v kyselině octové (45% hmotn./obj., 0,29 ml, 1,615 mmol). Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti 9,5 hod. Po odpaření rozpouštědla a odpaření spolu s toluenem byl získán (15) jako žlutý sirup.

Současně byl N⁴-benzoyl-5-jodcytosin (550 mg, 1,615 mmol) suspendován v HMDS (8 ml) se síranem amonným (3 mg) a vařen pod zpětným chladičem 5 hod pod dusíkem za vzniku homogenního roztoku.

Roztok silylované báze byl odpařen dosucha při současném zabránění přístupu vlhkosti. Do získaného sirupu byl přidán roztok (14) v bezvodém 1,2-dichlorethanu (10 ml). Reakční směs byla vařena pod zpětným chladičem pod dusíkem 23 hod, potom byla odpařena dosucha za vzniku hnědého sirupu, který byl rozetřen s chloroformem (30 ml). Získaná sraženina byla odfiltrována a promyta chloroformem. Filtráty a výplachy byly

spojeny a odpařeny za vzniku hnědého sirupu. Směs produktu byla oddělena chromatografií na koloně silikagelu ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$, 0-1%) za vzniku bílé pevné látky (21) (100 mg, 45%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 11.40 (bs, 1H, NH); 7.26, 8.20 (m, 17H, Ar-H, H-6 a NH); 6.36, 6.44 (dd, $J_{\text{HH}} = 2.8$ Hz, $J_{\text{F-H}} = 21$ Hz, 1H, H-1'); 5.62, 5.68 (dd, 1H, H-3'); 5.39, 5.56 (dd, 1H, H-2'); 4.58, 4.85 (m, 3H, H-4' a H-5').

N_1 - (2'-Deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl)-5-jodcytosin (22)

Sloučenina (21) (100 mg, 0,27 mmol) byla zpracována s nasyc. NH_3/MeOH (60 ml) při pokojové teplotě po 24 hod. Silikagelová kolonová chromatografie (0-10% $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$) poskytla sloučeninu (22) (35 mg, 71%) jako bílou pevnou látku. $[\alpha]_{\text{D}} = -65,4$ (c 0,34, CH_3OH); UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 293$ nm.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 8.04 (s, 1H, H-6); 6.74, 7.94 (s, 1H, NH); 6.01, 6.08 (dd, $J_{\text{H-H}} = 3.9$ Hz, $J_{\text{F-H}} = 16.6$ Hz, 1H, H-1'); 5.85 (d, 1H, 3'-OH); 5.17 (t, 1H, 5'-OH); 5.08 (t, 1H, H-2'); 4.89 (t, 1H, H-3'); 4.15 - 4.23 (m, 1H, H-4'); 3.63 - 3.79 (m, 2H, H-5').

N_1 - (2'-Deoxy-2'-fluor-3',5'-di-O-benzoyl- β -L-arabinofuranosyl)-5-joduracil (23)

Do roztoku (13) (260 mg, 0,56 mmol) v 10 ml bezvodého CH_2Cl_2 byl přidán HBr/AcOH (45%, hmotn./obj., 0,5 ml, 2,8 mmol). Reakční směs byla míchána při pokojové teplotě 36 hod a potom odpařena dosucha. Zbytek byl rozpuštěn ve 20 ml CH_2Cl_2 , promyt vodou (10 ml), nasyc. NaHCO_3 (10 ml) a sušen (MgSO_4). Filtrací a odpařením byl získán bromcukr (14) jako sirup.

Současně byl 5-joduracil (270 mg, 1,12 mmol) suspendován v 10 ml HMDS a vařen pod zpětným chladičem 36 hod za vzniku homogenního roztoku. Ten byl odpařen ve vakuu dosucha. K němu byl přidán roztok (14) v bezvodém 1,2-dichlorethanu, a výsledný roztok byl vařen pod zpětným chladičem pod N_2 1,5 dne. Byl přidán $CHCl_3$ (20 ml) a roztok byl promyt postupně vodou (10 ml), solankou (10 ml) a nasyc. $NaHCO_3$ (10 ml) a potom sušen ($MgSO_4$). Odstraněním rozpouštědla se získal sirup, který byl rekrystalován v CH_2Cl_2 za vzniku (23) jako žluté pevné látky (237 mg, 73%). Její část (70 mg) byla rekrystalována z 2-isopropanolu za vzniku bílé pevné látky (67 mg). UV(Methanol): λ_{max} 230,0 nm, 276,0 nm.

1H -NMR ($CDCl_3$): δ 8.4, 7.3 (m, 12H, Ar-H) ; 6.29 (dd, $J_{H-H}=2.43$ Hz, $J_{F-H}=21.6$ Hz 1H, H-1'); 5.377 (dd, $J_{H-H}=2.8$ Hz, $J_{F-H}=61.3$ Hz, 1H, H-2'); 5.55 (dd, 1H, H-3'); 4.865, 4.793 (c, 2H, H-5'); 4.588, 4.502 (m, 1H, H-4').

N₁ - (2'-Deoxy - 2'-fluor- β - L - arabinofuranosyl) - 5 - joduracil (24)

Sloučenina (23) (40 mg, 0,069 mmol) byla rozpuštěna ve 25 ml nasyc. $NH_3/MeOH$ a míchána při teplotě místnosti po 24 hod a potom odpařena dosucha. Výsledný sirup byl purifikován na preparativní TLC (5:1/ $CHCl_3:MeOH$) za vzniku (24) jako pevné látky (19 mg, 74%).

UV(MeOH): λ_{max} 280,5 nm.

1H -NMR ($DMSO-d_6$): δ 11.82 (bs, CONH) ; 8.24 (s, 1H, H-6); 6.082 (dd, $J_{H-H}=4.45$ Hz, $J_{F-H}=13.7$ Hz, 1H, H-1'); 5.947 (d, 1H, 3'-OH); 5.296 (t, 1H, 5'-OH); 5.07 (dt, $J_{F-H}=53$ Hz, 1H, H-2'); 4.24 (bd, $J_{F-H}=21$ Hz, 1H, H-3'); 3.81, 3.55 (m, 3H, H-4', H-5').

2.3.5-Tri-0-benzyl-L-arabinsa

Jak je znázorněno na obr.9, třicet gramů (0,2 mol) práškové L-arabinosy (5) a potom 0,4 ml koncentrované kyseliny sírové bylo přidáno do 600 ml (14,8 molů) bezvodého methanolu. Suspenze byla míchána a potom zahřívána opatrně pod zpětným chladičem za vzniku čistého roztoku po 2 hod. Reakční směs byla neutralizována 1,5 g hydrogenuhličitanu sodného, sušena (Na_2SO_4), a potom byla odpařena ve vakuu za vzniku těžkého sirupu (6), který byl zředěn 50 ml právě vyčištěného tetrahydrofuranu a rekoncentrován (lázeň 35-40 °)

k odstranění zbytků methanolu. Byl přidán čerstvě vyčištěný tetrahydrofuran (400 ml) a směs byla zpracována s 30 g Drierite, 156 g (2,78 molu) hydroxidu draselného, a 200 ml (1,74 molu) benzylchloridu. Směs byla zahřívána pod mírným refluxem přes noc, ochlazená, zfiltrována přes tenkou vrstvu celitu, a koncentrována ve vakuu, a potom ve vysokém vakuu a 100 °C (lázeň). Syrový sirup methyl 2,3,5-tri-0-benzyl-L-arabinosid (7) byl rozpuštěn ve 400 ml ledové kyseliny octové. Hydrolyzovaná směs byla zahřívána na 65-70 °C po 2 hod, koncentrována ve vakuu na jednu třetinu svého objemu, a vnesena do 2,5 l směsi ledové vody.

Po naočkování (zárodečné krystaly byly původně získány chromatografií a byly vymývány dichlormetanem), směs byla držena při 5°C přes noc. Vodná vrstva byla dekantována z částečně krystalické hmoty a poslední byla rozpuštěna ve 200 ml dichlormethanu. Roztok byl promyt studeným, vodným hydrogenuhličitanem sodným, sušen (Na_2SO_4), zfiltrován přes tenké lože odbarvovacího uhlí, a koncentrován ve vakuu na řídký sirup, který byl rozpuštěn ve 200 ml cyklohexanu.

Po naočkování byl udržován roztok při teplotě místnosti po 1 hod a při 5°C přes noc za vzniku 27,7 g (33,2%) 2,3,5-tri-0-benzyl-L-arabinosy (8). b.t. 68-73 °C.

$[\alpha]^{25}_D = -1,69$ [C 2,01, 9:1 (obj./obj. p-dioxan-voda)]

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 220; 300 - MHz $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 3.48 - 3.62 (m, 2H, H-5), 3.94 - 4.18 (m, 3H, H-2,3,4), 5.33 (d, 1H, $J=4.07$, H-1), 5.29 (s, H-1), 7.25-7.33 (m, 15, H-aromat).

2,3,5-Tri-O-benzyl-1-O-(p-nitrobenzoyl)-L-arabinoza (9)

Sloučenina 8 (obr.9) (2 g, 4.76 mmol) byla rozpuštěna v 7,5 ml dichlormethanu, a do tohoto roztoku byl přidán roztok 0,95 g (5,1 mmol) p-nitrobenzoylchloridu ve směsi s 5 ml dichlormethanu a 1,5 ml pyridinu. Reakční směs byla udržována při teplotě místnosti přes noc, potom byla promývána postupně 1N kyselinou chlorovodíkovou (2 x 10 ml), vodným hydrogenuhlíčanem sodným (2 x 10 ml), a vodou (3 x 30 ml). Vlhkost byla odstraněna pomocí Na_2SO_4 , roztok byl koncentrován ve vakuu za vzniku 2,67 g (98,4%) směsi anomerů sloučeniny 9. b.t. 68-82 °C.

Dalším čistěním silikagelovou kolonovou chromatografií (hexan:aceton, 8:1) se zvýšil b.t. na 89 - 93 °C; $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = 13,04$ (C 6,8, CH_2Cl_2).

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 215.5 a 258.5, 250 MHz $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 3.54 - 3.69 (m, 2H, H-5), 4.06 (m, 1H, H-4'), 4.22 (m, 1H, H-3'), 4.33 (m, 1H, H-2'), 4.38 - 4.78 (m, 6H, benzyl CH_2), 6.50 (d, 1H, $J=2.35$, H-1), 7.23- 7.36 (m, 15 H, H-aromat. z benzylskupiny), 8.01-8,25 (m, 4H, H-aromat. z nitrobenzoylskupiny).

10 (2,3,5-Tri-O-benzyl- β -L-arabinosyl) thymin (12)

Thymin 0,444 g (3,52 mmol) a síran amonný (2 mg) byly suspendovány v hexamethyldisilazanu 10 ml, který byl vařen pod zpětným chladičem (140 °C) přes noc pod argonem za vzniku jasného roztoku. Nadbytek hexamethyldisilazanu byl odstraněn ve vakuu při současném zabránění přístupu vlhkosti za vzniku sirupu (11).

Sloučenina (9) (1 g, 1,76 mmol) byla přidána do 17 ml dichlormethanu předsyceného bezvodým chlorovodíkem při 0 °C. Po 2 hod při 0 °C byla vysrážená p-nitrobenzoová kyselina (0,25 g) odstraněna filtrací a filtrát byl koncentrován ve vakuu na slabý sirup a potom udržován pumpou v hlubokém vakuu při teplotě místnosti po 2 hod za vzniku 2,3,5-tri-O-benzyl- α -L-arabinosylchloridu (10).

Sloučenina (10) takto připravená byla rozpuštěna v 15 ml bezvodého dichlormethanu, a roztok byl přidán do směsi silylovaného thyminu (11) a 3 g 4A molekulárního síta. Reakční směs pak byla míchána při teplotě místnosti pod argonem po 18 hod. Reakční směs byla zředěna 50 ml dichlormethanu a nalita do 2 ml nasyceného vodného NaHCO₃ za intenzivního míchání. Vznikla bílá sraženina (hydroxid cínu), která byla odfiltrována na loži z celitu. Organická vrstva byla z vody oddělena a promyta vodou (3 x 30 ml). Vodná vrstva byla extrahována dichlormethanem, a spojená dichlormethanová vrstva byla sušena nad Na₂SO₄, a potom odpařena ve vakuu za vzniku sirupu, který byl čistěn silikagelovou kolonovou chromatografií (chloroform:methanol, 100:1) za vzniku (12) jako sirupu 0,68 g (73%).
 $[\alpha]_D^{25} = -56,71$ (C 0,6, CH₂Cl₂).

UV(MeOH) $\lambda_{\max}$ 218 a 265; 300 MHz ¹HNMR (CDCl₃): δ 1.67 (d, 3H, J=1.11, CH₃), 3.66 - 3.70 (m, 2H, H-5'), 4.06 (m, 1H, H-4'), 4.13 (t, 1H, J = 4.7, H-3'), 4.24 (t, 1H, J = 4.7, H-2'), 4.41, 4.54, 4.56 (m, 6H, benzyl CH₂), 6.28 (d, 1H, J = 5.24, H-1'), 7.15 - 7.33 (m, 15H, H-aromat), 7.43 (d, 1H, J= 1.31, H-6).

1- β -L-arabinofuranosylthymín (13)

Chlorid palladnatý (680 mg, 3,835 mmol) byl suspendován ve 100 ml methanolu a redukován mícháním s vodíkem při teplotě místnosti. Roztok 450 mg látky (12) ve 25 ml methanolu byl potom přidán do kyselé suspenze palladiovou černí. Reakční směs potom byla míchána s vodíkem při teplotě místnosti po 38 hod.

Po odstranění katalyzátoru byl roztok neutralizován Dowexem (HCO_3^-) na pH 7 a koncentrován ve vakuu na bílou pevnou látku, která rekrystalovala s ethanolem za vzniku (13) (105 mg, 47,7%). b.t. 244 - 249 °C. $[\alpha]_D^{25} = -91,48$ (0,25, H_2O); IR(KBr): 1750, 1600 cm^{-1} (CO); UV(MeOH) : λ_{max} 268; 300 MHz ^1H NMR (DMSO-d_6) : δ : 1,76 (s, 3H, CH_3), 3,62 (t, 2H, $J=4,56$, H-5'), 3,69 (m, 1H, H-4'), 3,90 (t, 1H, $J=3,88$, H-3'), 3,99 (t, 1H, $J=4,10$, H-2'), 5,08 (br s, 1H, D'5-OH, vyměnitelný), 5,42 (d, 1H, $J=4,24$, C'2-OH nebo C'3-OH, vyměnitelný), 5,54 (d, 1H, $J=5,23$, C'2-OH nebo C'3-OH, vyměnitelný), 5,97 (d, 1H, $J=4,64$, H-1'), 7,51 (d, 1H, $J=0,97$, H-6), 11,26 (s, 1H, NH, vyměnitelný). Anal.kalc. pro $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6$; C, 46,51; H, 5,46; N, 10,85; nalezeno: C, 46,67; H, 5,63; N, 10,56.

1-(2,3,5-Tri-O-benzyl- β -L-arabinosyl)cytosin (15)

Cytosin 0,61 g (6 mmol) a síran amonný (2 mg) byly suspendovány v hexamethyldisilazanu 15 ml, který byl vařen pod zpětným chladičem (140 °C) pod dusíkem po 2 hod za vzniku jasného roztoku. Směs silylovaného cytosinu byla odpařena dosucha ve vakuu při současném zabránění přístupu vlhkosti za vzniku sirupu (14).

Sloučenina (9) (2,82 g, 5 mmol) byla přidána do 47 ml suchého dichlormethanu předsyceného bezvodým chlorovodíkem při 0 °C. Po 2 hod při 0 °C byla vysrážená p-nitrobenzoová kyselina (0,807 g) odstraněna filtrací, a filtrát byl koncentrován ve vakuu za vzniku sirupu 2,3,5-tri-O-benzyl- β -L-arabinosylchloridu (10).

Takto připravená sloučenina (10) byla rozpuštěná ve 28,5 ml bezvodého dichlormethanu, a roztok byl přidán do směsi silylovaného cytosinu (14) a 8,3 g 4A molekulového síta.

Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti pod dusíkem 5 dní. Potom byla reakční směs zředěna 50 ml dichlormethanu a 20 ml vody a nalita do 2 ml nasyceného vodného NaHCO_3 za intenzivního míchání. Vznikla bílá sraženina (hydroxid cínu), která byla odfiltrována na loži celitu. Organická vrstva byla oddělena od vodné a promyta vodou (3 x 30 ml). Vodná vrstva byla extrahována dichlormethanem a spojená dichlormethanová vrstva byla sušena nad Na_2SO_4 , a potom odpařována ve vakuu za vzniku sirupu, který byl vyčištěn silikagelovou kolonovou chromatografií (chloroform/methanol, 96:4) za vzniku (15) jako bílé pevné látky, která byla rekrystalizována se

2-propanolem za vzniku 1,53 g (60%) b.t. 146 - 148 °C, $[\alpha]_D^{25} = -105,2$ ($\text{Cl}_2, \text{CH}_2\text{Cl}_2$), UV(MeOH): λ_{max} 211.5, λ_{min} 272.5, pH1, pH7; λ_{max} 211.5, λ_{min} 284, pH9. 300 MHz ^1H NMR (CDCl_3) δ : 3.65 (d, 2H, $J=4.85$, H-5'), 4.00 (t, 1H, $J=3.72$, H-3), 4.11 (m, 1H, H-4'), 4.28 (m, 1H, H-2'), 4.38-4.55 (m, 6H, benzyl CH_3), 5.56 (d, 1H, $J=7.5$, H-5), 6.39 (d, 1H, $J=4.59$, H-1'), 7.12 - 7.31 (m, 15H, H-aromat), 7.63 (d, 1H, $J=7.5$, H-6).

1- β -L-Arabinofuranosylcytosinhydrochloridová sůl (16).
katalytickou hydrogenací (15)

Chlorid palladnatý (315 g, 1,78 mmol) byl suspendován ve 160 ml methanolu a redukován nícháním s vodíkem při teplotě místnosti. Do kyselé suspenze palladiové černi potom byl přidán roztok 300 mg (15) v 54 ml methanolu. Reakční směs byla míchána s vodíkem při teplotě místnosti po 3 hod. Po odstranění katalyzátoru byl roztok neutralizován Dovexem (HCO_3), koncentrován ve vakuu a potom čištěn preparativní TLC (MeOH: CHCl_3 , 3:5) za vzniku sirupu, který byl rozpuštěn ve 3 ml methanolu, přidán roztok 1% HCl v MeOH na pH 1, zkoncentrován dosucha a rozetřen s 2-propanolem za vzniku 36 mg (22,1%) (16) b.t. 190 - 194 °C, $[\alpha]_D^{25} = -115,47$ (C 0,07, H_2O); UV(H_2O), λ_{max} 275, pH7;

$\lambda_{\max}$ 209.5, 273, pH 11 ; $\lambda_{\max}$ 280, pH 1 ; 300 MHz $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) : δ 3.61 (c, 2H, H-5'), 3.82 (m, 1H, H-4'), 3.93 (m, 1H, H-2' nebo H-3'), 4.04 (br s, 1H, H-2') nebo H-3'), 5.18 (br s, 1H, C5'-OH, vyměnitelný), 5.61 (br s, 1H, C2'-OH nebo C3'-OH, vyměnitelný), 5.67 (br s, 1H, C2'-OH nebo C3'-OH, vyměnitelný), 6.00 (d, 1H, $J=4.02$, H-1'), 6.01 (d, 1H, $J_{5,6}=7.8$, H-5) 7.92 (d, 1H, $J_{5,6}=7.8$, H-6), 8.49 (br s, 1H, NH, vyměnitelný), 9.38 (br s, 1H, NH, vyměnitelný).

1- β -L-Arabinofuranosylcytosin hydrochloridová sůl (16)
zpracování sloučeniny (15) s chloridem boritým

5 ml 1M chloridu boritého v dichlormethanu bylo ochlazeno na $-72\text{ }^\circ\text{C}$ (suchý led-aceton). Roztok (15) (180 mg, 0,351 mmol) ve 3 ml dichlormethanu byl pomalu přidáván do roztoku chloridu boritého. Po celkové reakční době 2,75 hodin byla chladicí lázeň odstraněna a rozpouštědlo a plyn byly odstraněny ve vakuu. Zbytek byl rozpuštěn v chladném dichlormethanu (10 ml) a roztok byl odpařen dosucha (3 krát, dokud nebyl získán bílý pevný zbytek), byl přidán chladný nasycený roztok hydrogenuhličitanu sodného k dosažení pH 6-7. Směs byla zředěna ethanol, zahřáta k varu, zpracována dřevěným uhlím a zfiltrována. Filtrát byl odpařen na sirup, který byl zředěn 3 ml methanolu, přidán roztok 1% HCl v methanolu na pH 1, zkoncentrován dosucha a rozmělněn s 2-propanolem za vzniku (16) (66 mg, 78,4%).

9-(2,3,5-Tri-O-benzyl- β -L-arabinosyl)adenin (18)

Důkladně vysušená sloučenina 9 (5 g, 8.8 mmol) byla přidána do 82 ml dichlormethanu předsyceného bezvodým chlorovodíkem při $0\text{ }^\circ\text{C}$. Po dvou hodinách reakce při $0\text{ }^\circ\text{C}$ byla vysrážena p-nitrobenzoová kyselina (1,53 g) odstraněna filtrací, a

filtrát byl koncentrován ve vakuu na sirup, který byl potom držen v úplném vakuu při teplotě místnosti 2 hod. 2,3,5-tri-O-benzyl- α -L-arabinosylchlorid (10) takto připravený byl rozpuštěn v 50 ml dichlormethanu a roztok byl přidán do směsi 4,5 g (18,8 mmol) sušeného N-benzoyladeninu⁵ (17) a 14,5 g 4A molekulového síta. Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti 1 týden, zfiltrována přes lože celitu a koncentrována ve vakuu na sirup, který byl chromatografován na silikagelu při použití hexan/acetonu (3:1, R_f = 0,22). Produkt byl oddělen a zkoncentrován ve vakuu na sirup, který byl rozpuštěn a míchán s methanolvým amoniem (20 ml) v bombě z nerez-oceli, a zahříván přes noc na 50 - 55 °C. Roztok byl potom koncentrován při sníženém tlaku za vzniku polopevné látky, která rekrystalizovala z horkého isopropylalkoholu za vzniku (18) 2,4 g (50,7%). b.t. 128 - 129 °C. $[\alpha]^{27}_D = -20,04$ (1.04, CH₂Cl₂); UV (CH₂Cl₂) : λ_{max} 213, 258,5; 250 MHz ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.95 (br s 1H, NH, vyměnitelný), 3.69 (d, 2H, J=4.82, H-5'), 4.18-4.30 (m, 6H, benzyl CH₂), 4.51-4.64 (m, 3H, H-2', 3', 4'), 5.73 (br s, 1H, NH, vyměnitelný), 6.52 (d, 1H, J=4.00, H-1'), 6.89-6.93, 7.17-7.37 (m, 15H, H-aromat z benzylskupiny), 8.17 (s, 1H, H-2 nebo H-8), 8.32 (s, 1H, H-2 nebo H-8).

9- β -L-Arabinofuranosyladenin (19)

Chlorid boritý (5 ml 1M) v dichlormethanu byl chlazen na -72°C (suchý led-aceton). Roztok (18) (150 mg, 0.279 mmol) v 5 ml dichlormethanu byl pomalu přidán do roztoku chloridu boritého. Po úplném proběhnutí reakce po 3,5 hod byla chladicí lázeň odstraněna a rozpouštědlo a plyn byly odstraněny ve vakuu. Zbytek byl rozpuštěn v chladném dichlormethanu (10 ml) a roztok byl odpařen dosucha (6 krát, dokud nebyl získán žlutý pevný zbytek). Chladný nasycený

roztok hydrogenuhlíčitanu sodného byl přidán k dosažení pH 7-8. Směs byla zředěna methanolem, zahřívána k varu, suspenze byla zfiltrována přes celit, filtrát byl zkoncentrován ve vakuu na sirup, který krystalizoval z vody. Bylo získáno 55 mg (74%) (19). b.t. 256 - 258 °C, UV (H₂O): λ_{max} 259; 300 MHz ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ : 3.62 - 3.66 (m, 2H, H-5'), 3.77 (br s, 1H, H-4'), 4.13 (br s, 2H, H-2', 3'), 5.12 (t, 1H, J=5.4, C'5-OH, vyměnitelný), 5.54 (d, 1H, J=3.78, C'2-OH nebo C'3-OH, vyměnitelný), 5.63 (d, 1H, J=4.32, C'2-OH nebo C'3-OH, vyměnitelný), 6.25 (d, 1H, J=4.02, H-1'), 7.25 (br s, 2H, NH₂, vyměnitelný), 8.13 (s, 1H-H-2 nebo H-8), 8.18 (s, 1H, H-2 nebo H-8).

Obrázek 10 ilustruje alternativní cestu přípravy 1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -L-ribofuranosy (sloučenina 10) z 1,2-di-O-isopropyliden- α -L-xylofuranosy (sloučenina 3).

1,2-Di-O-isopropyliden- α -L-xylofuranosa (3)

Do 650 ml bezvodého acetonu byly přidány 4 ml konc. kyseliny sírové, 5 g molekulárního síta (4A), 80 g bezvodého síranu měďnatého a 40 g L-xylosy. Směs byla míchána při teplotě místnosti 36 hod. Potom byla reakční směs zfiltrována a promyta důkladně acetonem, spojené filtráty byly neutralizovány hydroxidem amonným a potom odpařeny dosucha. Byl přidán ethylacetát (200 ml) a potom produkt filtrován a odpařen za vzniku oleje, který byl rozpuštěn ve 250 ml 0,2% HCl a roztok byl míchán při teplotě místnosti 2,5 hod. pH 8 bylo dosaženo nasyceným NaHCO₃, potom byl produkt odpařen dosucha. Zbytek byl extrahován ethylacetátem. Odstranění rozpouštědla poskytlo žlutý olej (3) (41.7 g, 82.3%).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 5.979 (d, J=3.78 Hz, 1H, H-1); 4.519 (d,

$J=3.6$ Hz, 1H, H-2); 4.308 (bd, 1H, H-3); 4.080 (m, 3H, H-4 a H-5); 1.321 (s, 3H, CH₃); 1.253 (s, 3H, CH₃).

5-O-Benzoyl-1,2-di-O-isopropyliden- α -L-xylofuranosa (25)

Sloučenina 3 (41 g, 215.6 mmol) byla míchána v pyridinu (150 ml) a CH₂Cl₂ (150 ml) při 0 °C. BzCl (27.5 ml, 237 mmol) rozpuštěný ve 30 ml pyridinu byl přidán po kapkách. Po 30 min byla přidána voda (5 ml) a směs byla odpařena dosucha, rozpuštěna v EtOAc, promyta nasyc. NaHCO₃, a potom sušena (Na₂SO₄). Po odpaření rozpouštědla zůstal oranžový sirup, který krystalizoval v Et₂O za vzniku sloučeniny (20) (36 g). Matečná tekutina byla odpařena dosucha a zbytek byl čistěn silikagelovou kolonovou chromatografií (1% CH₃OH/CHCl₃) za vzniku další dávky sloučeniny (25) (12 g, celkový výtěžek 76%). b.t. 82 - 83 °C. lit¹D forma: 83.5 - 84.5 °C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 7.43, 8.07 (m, 5H, Ar-H); 5.97 (d, 1H, $J=3.6$ Hz, H-1); 4.80 (q, 1H, H-4); 4.60 (d, 1H, $J=3.6$ Hz, H-2); 4.40, 4.20 (m, 3H, H-5, H-5', H-3); 3.50 (bs, 1H, D₂O výměna, 30H); 1.51, 1.32 (2s, 6H, 2CH₃).

5-O-Benzoyl-1,2-di-O-isopropyliden- α -L-erythro-pentofuranos-3-ulosa (26)

Sloučenina 25 (40 g, 136 mmol) byla míchána ve 450 ml CH₂Cl₂. Byl přidán dvojchroman pyridinia (PDC, 30.7 g, 81.6 mmol) a Ac₂O (42.3 ml, 448.8 mmol). Směs byla vařena pod zpětným chladičem 2.5 hod. Roztok byl zkoncentrován na 1/5 svého původního objemu, potom byl přidán etylacetát (50 ml) a roztok byl zfiltrován. Filtrát byl nalit na silikagelovou podložku (10 cm x 5 cm), eluován EtOAc, spojené eluanty byly koncentrovány a spolu odpařeny s toluenem (50 ml x 2).

Krystalizace z hexanu a EtOAc poskytla (21) jako bílou pevnou látku (38 g, 96%). b.t. 91 - 93 °C, $[\alpha]_D^{20} = -132^\circ$ (c, 1.0, CHCl₃); lit² D forma: b.t. 93 - 94.5 °C, $[\alpha]_D^{20} = +135^\circ$ (c, 1.0, CHCl₃); IR (KBr): 1773 cm⁻¹ (ArCO), 1730 cm⁻¹ (CO). ¹H-NMR (CDCl₃): δ 7.97, 7.42 (m, 5H, Ar-H); 6.14 (d, 1H, J = 4.4 Hz, H-1); 4.74, 4.68 (m, 2H, H-4, H-2); 4.50, 4.44 (m, 2H, H-5, H-5'); 1.52, 1.44 (2s, 6H, 2CH₃). Anal. Kalc. (C₁₅H₁₆O₆): C, 61.64; H, 5.52; Nalezeno: C, 61.42; H, 5.53.

1,2-di-O-isopropyliden- α -L-ribofuranosa (27)

Sloučenina (26) (37 g, 127 mmol) byla rozpuštěna v EtOH/H₂O (400 ml/100ml) při 0 °C, přičemž NaBH₄ (23.3 g, 612 mmol) byl přidán v dávkách. Suspenze byla míchána při teplotě místnosti 4 hod. Potom byla zfiltrována a filtrát byl odpařen dosucha a odpařen spolu s methanolem. Po chromatografii na silikagelové koloně (0-15 % CH₃OH/CH₂Cl₂) a krystalizaci z EtOAc/hexanu, byl získán (27) jako bílá jehla (19 g, 79%). b.t. 86 - 87 °C; $[\alpha]_D^{20} = -31.5^\circ$ (c, 0.62, CHCl₃); lit³, D forma: b.t. 86 - 87 °C, $[\alpha]_D^{20} = +37^\circ$ (c, 0.59, CHCl₃); IR (KBr): 3356 cm⁻¹ (OH). ¹H-NMR (CDCl₃) δ 5.83 (d, 1H, J = 3.98 Hz, H-1); 4.595 (t, 1H, H-2); 4.055, 3.72 (m, 4H, H-3, H-4, H-5, H-5'); 2.38 (d, 1H, D₂O výměna, 3-OH); 1.83 (t, 1H, D₂O výměna, 5-OH); 1.58, 1.38 (2s, 6H, 2CH₃). Anal. Kalc. (C₈H₁₄O₅): c, 50.50; H, 7.42; nalezeno: C, 50.62; H, 7.46.

3,5-Di-O-Benzoyl-1,2-di-O-Isopropyliden- α -L-ribofuranosa (28)

Sloučenina (27) (19 g, 100 mmol) byla míchána ve 300 ml pyridinu při 0 °C, zatímco BzCl (40 ml, 348 mmol) byl přidán po kapkách a potom míchán při teplotě místnosti 3 hod. Rozpouštědlo bylo odpařeno dosucha. Zbytek byl extrahován EtOAc, promyt nasyc. NaHCO₃, sušen (Na₂SO₄).

Odpaření rozpouštědla a krystalizace poskytly (23) jako bílou pevnou látku 39 g (98%) b.t. 83 - 85 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 8.07, 7.36 (m, 10H, Ar-H); 5.94 (d, 1H, $J=3.6$ Hz, H-1); 5.05, 5.00 (m, 1H, H-2); 4.73, 4.63 (m, 3H, H-4, H-5, H-5'); 1.58, 1.35 (2s, 6H, 2CH_3). Anal. Kalc. ($\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_7$): C, 66.50; H, 5.64; nalezeno: C, 66.32; H, 5.57.

1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -L-ribofuranosa (31)

Sloučenina (28) (38 g, 95 mmol) byla míchána v 300 ml 1% $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{OH}$ při teplotě místnosti 30^h hod. Byl přidán pyridin (20 ml) a potom byl roztok odpařen dosucha. Zbytek byl odpařen spolu s pyridinem (30 ml x 2), a potom rozpuštěn ve 100 ml bezvodého pyridinu při 0 °C, načež BzCl (17 ml, 146 mmol) byl přidán po kapkách, potom míchán při teplotě místnosti 3 hod. Rozpouštědlo bylo odpařeno a zbytek byl rozpuštěn v EtOAc , promyt 0,5N HCl a potom nasyc. NaHCO_3 a potom sušen (Na_2SO_4). Odpařením rozpouštědla byl získán surový (30) jako sirup.

Surový (30) byl míchán v ledové kyselině octové (400 ml) a potom Ac_2O (100 ml) při 0 °C, zatímco konc. H_2SO_4 (10 ml) byla přidána po kapkách. Tento roztok byl míchán při teplotě místnosti přes noc. Směs byla nalita do ledové vody, extrahována CHCl_3 , neutralizována nasyc. NaHCO_3 a potom sušena (Na_2SO_4). Po odpaření rozpouštědla byl získán světle žlutý sirup, který krystalizoval v methanolu za vzniku (31) jako bílé pevné látky 23.89 g (49,6%, z (28)-(31)). b.t. 124.7 °C, $[\alpha]_D=45.613$ (c 1.0, CHCl_3); lit⁴, b.t.: 129 - 130 °C, $[\alpha]_D=-43,6$ (c 1.0, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7.317, 8.134 (m, 15H, OBz); 6.437 (s, 1H, H-1); 5.835 (m, 2H, H-2 a H-3); 4.649 (m, 3H, H-4 a H-5); 2.003 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO-}$)

II. Biologická účinnost

Zde popsané sloučeniny mohou být zhodnoceny s ohledem na účinnost proti HBV nebo EBV, jak je dále podrobně popsáno, nebo jinými postupy známými odborníkovi v oblasti techniky.

Příklad 1

Biologická aktivita proti HBV

Buňky lidského hepatomu s HBV (2.2.15-buněk) byly použity při této zkoušce. Tyto buňky byly kultivovány na shluk v minimálním základním mediu s 10% fetálním hovězím sérem. Médium bylo měněno v třídených intervalech. Ve shluku byla lékem iniciována léčba, a potom se pokračovalo 3 dny. Další přírůstek stejné koncentrace léku byl podán v okamžiku po odstranění media z kultur, a kultury se uchovávaly po další období 3 dní. Bylo získáno medium po šestidenním ošetřování a virové částice se vysrážely polyethylenglykolovým postupem. Částice byly postupně tříděny a zpracovány pro Southernovu analýzu. Bloty byly hybridizovány na HBV-specifické sondě a množství virové DNA bylo posuzováno srovnáním s hladinami DNA z kultur, které nebyly ošetřeny lékem. Genomová DNA byla tříděna Hind III a podrobena Southernově analýze. Hladiny episomální DNA byly stanoveny ve vztahu k integrované HBV DNA.

Byla vypočtena koncentrace léku, která způsobí 50% inhibici DNA (ID₅₀) ve srovnání s kontrolami.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce I.

TABULKA I

Inhibice HBV L-Nukleosidy

Sloučenina	Anti-HBV Aktivita ID ₅₀ (μM)	MT2 CD ₅₀ (μM)	CEM CD ₅₀	CD ₅₀ (μM) (CH1 buňky)
L-FMAU	0.11	100	>100	1000
D-FMAU	2.0	8-9	10	50
D-FEAU	5.0	100	90	2000
L-FEAU	>5.0	100	>100	900

Příklad 2

Biologická účinnost proti EBV

H1 buňky byly ponechány v dlouhé růstové fázi po dva dny před iniciováním léčby. Buňky byly odstředěny na centrifuze v 600 g po 10 min při teplotě místnosti, aby se oddělily z média obsahujícího virové částice existující předem.

H1 buňky byly naočkovány ve 24 studnicových plotnách o hustotě 1×10^5 buněk na plotnu ve 2 ml čerstvého média s lékem nebo bez léku a byly inkubovány při 37 °C 5 dní.

Médium obsahující virion bylo uloženo a použito pro zhodnocení inhibičního účinku léků na produkci viru a infekčnosti použitím biozkušky.

Virion byly peletovány z média bez buněk odstředováním při 45 000 otáčkách za minutu po 90 min v SW-50 Ti rotoru (Beckman). Virion byly resuspendovány v 1 ml růstového média a potom použity na infikování 1×10^6 Raji buněk po 48 hod. Dokud je hladina EBV DP aktivity v Raji buňkách po zevní infekci úměrná počtu přidanych virionů, je možno měřit indukovanou EBV specifickou DP aktivitu.

Inhibiční účinek léku byl vypočítán srovnáním EBV DP účinnosti k násobku ředění kontrolních skupin.

Žádná inhibice mitochondriálního obsahu DNA v H1 buňkách nebyla pozorována, když byly buňky ošetřovány 1 mM L-FMAU po 6 dní.

Zkouška "Slot Blot "

Množství mitochondriální DNA bylo měřeno metodou "slot blot" (2). 2×10^5 ošetřených a neošetřených H1 buněk bylo lyzováno ve 200 μ l 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) roztoku postupem mražení/tavení. Buňky lyzátu byly ošetřeny s 10 μ g/ml RNasy A při 37 °C po 30 min, a potom proteinasou K (100 μ g/ml) při

55 °C po 2 hod. Do každého buněčného lyzátu byla přidána stejná množství 20 X SSC pufru. Po vaření 10 min byly vzorky naneseny na nylonové membrány (Hybond-N, Amersham Corp.). Jako sonda pro DNA hybridizaci byl použit lidský mitochondriální DNA fragment značený radioaktivním izotopem. Stejně membrány byly sondovány lidským Alu DNA po odstranění mitochondriální DNA sondy. Množství mitochondriální DNA v ošetřených a neošetřených H1 buňkách byla kvantifikována denzitometrem (LKB Ultroskan XL).

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

TABULKA 2

Léčivo	CD ₅₀ (μM)	ID ₉₀ (μM)	Index léčení (CD ₅₀ /ID ₉₀)
PFA	1200 ± 100	75 ± 5	16
DHPG	75 ± 6	5 ± 1	15
ACV	1000 ± 75	50 ± 8	20
PCV	500 ± 55	20 ± 2	25
L-FMAU	1000 ± 80	5 ± 0.8	200
D-FMAU	50 ± 10	0.1 ± 0.02	50
L-FEAU	900 ± 70	60 ± 11	15
D-FEAU	2000 ± 80	1 ± 0.05	2000
L-FIAC	400 ± 35	< 10	> 40
D-FIAC	125 ± 15	5 ± 0.5	25
L-FIAU	240 ± 20	20 ± 4	12
D-FIAU	20 ± 4	0.5 ± 0.05	40

Inhibiční účinek sloučenin na EBV:

CD₅₀ byla prováděna podrobením H1 buněk různým koncentracím sloučenin v normálním růstovém mediu při 37 °C po 72 hod; buňky byly spočítány a porovnány s kontrolními. H1 buňky byly ošetřovány 5 dní, a potom byla ID₅₀ stanovena biozkouškou.

Příklad 3

Odstranění L-(-)-FMAU z plasmy a jater

Bylo hodnoceno vymizení L-(-)-FMAU z plasmy a jater myši po orálním podávání.

Myši byly injektovány L-(-)-FMAU označeném tritiem (radiospecifičnost 9.3 $\mu\text{mol}/\mu\text{Ci}$).

Obrázek 11 je graf koncentrace plasmy L-(-)-FMAU myši po orálním podání v čase, a obrázek 12 je graf koncentrace L-(-)-FMAU v játrech myši po orálním podání v čase (křížek, 10 mg/kg, podáváno (denně) po 30 dní před farmakokinetickou studií, a potom byla prováděna studie třicátý první den podání stejné koncentrace: tmavý kroužek, 50 mg/kg podáváno denně 30 dní před studií a potom byla prováděna studie třicátý první den při podání stejné koncentrace: otevřený kroužek, 50 mg/kg podáno poprvé v první den studie).

V označeném čase (viz obrázek 10 a 11) byly myši vykrváčeny z retro-orbitálního sinu užitím heparinizovaných kapilár. Plasma byla extrahována kyselinou trichloroctovou a neutralizována freon/trioktylaminem. Supernatanty byly přímo spočítány a vypočítána koncentrace.

Jak je patrné z obrázků 10 a 11, pík koncentrace L-(-)-FMAU plasmy a jater je přibližně v jedné hodině.

Sloučenina byla v podstatě odstraněna z plasmy a jater po 4 hodinách.

Příklad 4

Toxicita L-(-)-FMAU v BDF1 samice myši

Obrázek 13a ilustruje změnu hmotnosti po 30 dnech kontrolní BDF1 samice myši.

Obrázky 13b a 13c ilustrují změnu tělesné hmotnosti BDF₁ samice myši po 30 dnech podávání 10 mg/kg (13b) denně L-(-)-FMAU. Uváděná tělesná hmotnost označuje průměrnou a standardní odchylku u 5 až 7 myši.

Jak vyplývá z obrázků 13b a 13c, L-(-)-FMAU nevykazuje výrazně ovlivnění hmotnosti myši po 30 dnech, dokazující, že sloučenina byla velmi dobře tolerována.

Příklad 5

Klinická chemie myší plasmy po ošetření L-(-)-FMAU

Obrázky 14-20 popisují klinickou chemii plasmy myši po podání L-(-)-FMAU při 10 mg/kg (tři myši) nebo 50 mg/kg (tři myši) denně po 30 dní.

Obrázek 14 je sloupcový graf koncentrace celkového bilirubinu v myší plasmě v mg/dl.

Obrázek 15 je sloupcový graf koncentrace alkalické fosfatasy v myší plasmě v U/l.

Celkový bilirubin a alkalická fosfatasa jsou indikátory funkce jater. Hodnoty bilirubinu u myši leží v normálním lidském rozmezí (méně než 1,2 mg/dl), ale hodnoty alkalické fosfatasy jsou poněkud vyšší než je běžná hladina u lidí (30-114 U/l).

Obrázek 16 je sloupcový graf koncentrace kreatininu v myší plasmě v mg/dl.

Kreatinin je indexem funkce ledvin. S výjimkou myši 50-2 nejsou hladiny kreatininu u ošetřené myši odlišné od těchto u kontrolní myši.

Obrázek 17 sloupcový graf koncentrace AST (SGOT, serum glutamové oxalové transaminasy) v myší plasmě v U/l.

Obrázek 18 je sloupcový graf koncentrace ALT (SGPT, serum glutamové pyrohroznové transaminasy) v myší plasmě U/l.

SGOT a SGPT jsou indikátory funkce jater. S výjimkou myši 50-2 (pro SGOT i SGPT) a myši 10-2 (pouze pro SGOT), nejsou hladiny enzymů u ošetřené myši odlišné od hodnot pro kontrolní myš.

Obrázek 19 je sloupcový graf koncentrace kyseliny mléčné v myší plasmě v mmol/l.

Obrázek 20 je sloupcový graf koncentrace mléčné dehydrogenasy v myší plasmě v U/l. Kyselina mléčná vzniká ve svalech při glykolýze. Mléčná dehydrogenasa (" lactic dehydrogenase" LDH") je přítomná v různých isoenzymech v různých tkáních. Vylučování LDH do plasmy může indikovat poškození tkáně. Hladiny kyseliny mléčné a mléčné dehydrogenasy u ošetřených myší nejsou výrazně odlišné od hodnot u kontrolních myší.

III. Oligonukleotidy

Oligonukleotidy požadovaných sekvencí mohou být modifikovány substitucí jednoho nebo více zde popsaných L-nukleosidů nukleosidem v oligonukleotidu.

Ve výhodném provedení je L- nukleosid umístěn na jednom ze zakončení oligonukleotidu. Modifikovaný oligonukleotid může být například použit v antimediatorové technologii.

Antimediatorová technologie se obecně týká modulace exprese genu postupem, kdy je syntetický oligonukleotid hybridizován na komplementární sekvenci kyseliny nukleové k potlačení transkripce nebo replikace (pokud je cílovou sekvencí DNA),

potlačení translace (pokud je cílovou sekvencí RNA) nebo potlačení úpravy (pokud je cílovou sekvencí pre-RNA).

Použitím této techniky může být modulována široká oblast celulárních aktivit.

Jednoduchým příkladem je inhibice proteinové biosyntézy antimediatorovou oligonukleotidovou vazbou na mRNA.

V jiném provedení je syntetický oligonukleotid hybridizován na specifickou genovou sekvenci ve dvouřetězové DNA, vytvářející trojitý řetězový komplex (triplex), který inhibuje expresi této genové sekvence.

Antimediatorové oligonukleotidy mohou také být použity k aktivaci genové exprese nepřímo supresí biosyntézy přirozeného represoru. AOT může být použit k inhibici exprese patogenních genů, například těch, které usnadňují replikaci virů, včetně lidského imunodeficitního viru (HIV), hepatitidy viru B (HBV) a herpesvirů, a karcinomu, zejména pevných mas tumorů, jako gliomů, rakoviny prsu a melanomů.

Stabilita vybraného oligonukleotidu proti nukleasám je významným faktorem pro aplikace in vivo.

Je známo, že aktivita 3'-exonukleasy je odpovědná za většinu nemodifikovaných antimediatorových oligonukleotidových degradací v séru. Vlassov, V.V., Yakubov, L.A., v "Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancers and AIDS", 1991, 243 - 266, Wiley - Liss, Inc., New York; Nucleic Acids Res., 1993, 21, 145.

V jednom provedení mohou být zde popsané L-nukleosidy použity k minimalizování degradace 3'-exonukleasy antimediatorových oligonukleotidů.

Oligonukleotidy podle předloženého vynálezu, které jsou vhodné pro vázání na polyribonukleovou kyselinu nebo polydeoxyribonukleovou kyselinu, jsou vhodné jako antimediatorová činidla ve stejných postupech, jako běžná

antimediátorová činidla.

Viz obecně Antisense Molecular Biology and S-oligos, *Synthesis* 1 (Říjen 1988) (zveřejněno Synthecell Corp., Rockville, Md.); 2 Discoveries in Antisense Nucleic Acid (C. Brakel a R. Fraley vyd. 1989); Uhlmann, a kol., "Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Technique," *Chem. Rev.* 90(4), 1990; a Milligan, J.F., Matteucci, M.D., Martin, J.C., *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 1923 - 1937.

Antimediátorová činidla podle předloženého vynálezu mohou být použita vytvořením antimediátorového činidla, které je schopné selektivního vázání na předem stanovenou polydeoxyribonukleovou kyselinovou sekvenci nebo polyribonukleovou kyselinovou sekvenci na buňku obsahující takovou sekvenci (např. přidáním antimediátorového činidla do media kultury obsahující buňku) tak, že antimediátorové činidlo je vzato do buňky, váže se do předem stanovené sekvence, a blokuje transkripci, translaci nebo jejich replikaci.

Požadavky pro selektivní vázání antimediátorového činidla jsou známy (např. délka 17 bází pro selektivní vázání s lidským genomem).

IV. Příprava farmaceutické kompozice

Zde popsané sloučeniny a jejich farmaceuticky přijatelné soli, proléčiva a deriváty jsou vhodné pro prevenci a léčení HBV a EBV infekcí a dalších příbuzných stavů, jako je anti-HBV nebo anti-EBV protilátka pozitivní a HBV- nebo EBV- pozitivní stavy, chronické poškození jater vyvolané HBV, cirhoza, akutní hepatitida, prudká hepatitida, chronická perzistentní hepatitida a únava.

Tyto sloučeniny nebo formulace mohou být rovněž použity profylakticky k prevenci nebo potlačení postupu klinických onemocnění u jednotlivců, kteří jsou anti-HBV anti-EBV protilátkou nebo HBV- nebo EBV- antigen pozitivní, nebo kteří byli vystaveni HBV nebo EBV.

Lidské utrpení způsobené některými z těchto stavů může být léčeno podáváním pacientovi účinného HBV- nebo EBV- léčivého množství jedné nebo směsi účinných látek zde popsaných nebo farmaceuticky přijatelného derivátu nebo její soli, volitelně na farmaceuticky přijatelném nosiči nebo ředidle.

Účinné materiály mohou být podávány jakoukoliv příslušnou cestou, například orálně, parenterálně, intravenózně, intradermálně, podkožně, nebo topicky, v kapalně nebo pevně formě.

Účinné látky jsou obsaženy ve farmaceuticky přijatelném nosiči nebo ředidle v množství vhodném pro podání pacientovi terapeuticky účinného množství bez vyvolání vážných toxických účinků u léčeného pacienta.

Preferovanou dávkou účinné látky pro všechny výše zmíněné stavy je rozmezí od asi 1 do asi 60 mg/kg, výhodně 1 až 20 mg/kg tělesné hmotnosti za den, obvykleji 0.1 až asi 100 mg na kg tělesné motnosti příjemce za den. Rozmezí účinného dávkování farmaceuticky přijatelných derivátů se vypočítá na základě hmotnosti základního nukleosidu, ze kterého se vychází. Pokud vykazují deriváty aktivitu samy o sobě, může být účinné dávkování odhadnuto jako výše při použití hmotnosti derivátu, nebo jinými způsoby známými odborníkům ze stavu techniky.

V jednom provedení je účinná látka podávána jak je popsáno ve vložce produktu nebo v "Physician's Desk Reference" pro 3'-azido-3'-deoxythimidinu (AZT), 2',3'-dideoxyinosinu (DDI),

2',3'-dideoxycytidinu (DDC) nebo
2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidinu (D4T) pro HIV
indikaci.

Sloučenina se běžně podává v jednotce jakékoliv vhodné dávkové
formy, zahrnující, ale neomezující se na ně, na 7 až 3000 mg,
výhodně 70 až 1400 mg účinné látky na jednotu dávkové formy.
Orální dávkování 50 - 1000 mg je obvykle vhodné.

Ideálně by měla být účinná přísada podána k dosažení vrcholu
plasmových koncentrací účinné sloučeniny od asi 0,2 do 70 μM ,
výhodně asi 1,0 až 10 μM . Toho lze dosáhnout například
intravenózní injekcí 0,1 až 5% roztoku účinné přísady,
volitelně ve fyziologickém roztoku, nebo podáním jako bolus
účinné přísady.

Účinná sloučenina může být předkládána ve formě farmaceuticky
přijatelných solí.

Zde používaný termín farmaceuticky přijatelné soli nebo
komplexy značí soli nebo komplexy nukleosidů, které mají
požadovanou biologickou aktivitu rodičovské sloučeniny
a vykazují minimální, pokud vůbec nějaké, nežádoucí
toxikologické účinky.

Neomezujícími příklady těchto solí jsou:

(a) kyselinový přídavek anorganických kyselin, se kterými
jsou tvořeny soli (např. kyselina chlorovodíková,
bromovodíková, kyselina sírová, kyselina fosforečná, kyselina
dusičná a pod.), a soli vytvořené s organickými kyselinami
jako je kyselina octová, kyselina šťavelová, kyselina vinná,
kyselina jantarová, kyselina jablečná, kyselina askorbová,
kyselina benzoová, tanin, kyselina pamoová, kyselina
alginová, kyselina polyglutamová, kyseliny naftalensulfonové
a kyselina polygalakturonová;

(b) přidavek zásady solí tvořených s kationty jako je sodík, draslík, zinek, vápník, vizmut, barium, hořčík, hliník, měď, kobalt, nikl, kadmium,, sodík, draslík a podobně, nebo s organickými kationty vytvořenými z N,N-dibenzylethylendiaminu, amonia nebo ethylendiaminu; nebo

(c) kombinací (a) a (b); např. sůl tanát zinečnatý nebo podobné.

Modifikací účinné sloučeniny, specificky na N⁶ nebo N⁴ a 5'-0 pozicích, lze ovlivnit biologickou dostupnost a rychlost metabolismu účinných druhů, za předpokladu kontroly dodání účinných druhů.

Koncentrace aktivní sloučeniny v léčivé kompozici bude záviset na absorpční, inaktivační a vylučovací rychlosti léčiva, stejně jako jiných faktorech známých odborníkovi ze stavu techniky.

Je potřeba poznamenat, že hodnoty dávkování se také budou měnit s těžkostí stavu, který se má zmírnit. Dále je zřejmé, že pro některé zvláštní subjekty by měla být uzpůsobena specifická dávkovací schemata a časové plány po dobu podle individuální potřeby a odborného posudku osoby podávající nebo dohlízející na podávání kompozice, a že koncentrační rozmezí zde jsou pouze příkladná a nejsou míněna jako omezující rozsah nebo praktické použití nárokové kompozice.

Aktivní přísada může být podána najednou, nebo může být rozdělena do více menších dávek, které se podávají v různých časových intervalech.

Preferovaným typem podávání účinné látky je podání orální. Orální kompozice obvykle zahrnují inertní ředidlo nebo jedlý nosič. Mohou být uzavřeny v želatinových kapslích nebo lisovány do tablet. Pro účely orálního terapeutického podání může být účinná sloučenina spojena s excipientem a použita ve

formě tablet, pastilek nebo kapslí.

Farmaceuticky přijatelná pojiva a/nebo pomocné materiály mohou být zahrnuty jako část složení.

Tablety, pilulky, kapsle, pastilky a podobné mohou obsahovat některé z následujících přísad, nebo sloučenin podobné povahy:

pojivo, jako je mikrokryсталická celulóza, tragantová guma nebo želatina;

excipient, jako je škrob nebo laktóza;

desintegrační činidlo jako je kyselina alginová, Primogel, kukuřičný škrob;

lubrikant jako je stearát hořečnatý nebo Sterotes;

klouzadlo jako je koloidní oxid křemičitý;

sladidlo jako je sacharóza nebo sacharin;

ochucující přísada jako je máta peprná, methylsalicylát, nebo pomeračová příchut.

Pokud je dávkovou jednotkou kapsle, pak může obsahovat, přídatně k výše uvedeným typům, kapalný nosič jako je mastný olej.

Dále mohou jednotkové dávkové formy obsahovat různé další materiály, které modifikují fyzikální formu dávkové jednotky, například povlaky z cukru, šelaku nebo jiná enterická činidla.

Aktivní sloučenina nebo farmaceuticky přijatelná sůl nebo její deriváty mohou být podávány jako složka elixíru, suspenze, sirupu, vody, žvýkačky nebo podobně. Sirup může obsahovat přídatně k účinným látkám sacharózu jako sladící činidlo a některé ochranné látky, barviva a barevné přísady a ochucovadla.

Účinná sloučenina nebo farmaceuticky přijatelný derivát nebo jejich sůl může také být smíšena s jinými aktivními materiály, které nenarušují požadovaný účinek, nebo s látkami, které nahrazují požadovaný účinek, jako jsou antibiotika, antifungální látky, protizánětlivé látky nebo jiné protivirové látky, včetně anti-HBV, anti-EBV, anticytomegalovirů, nebo anti-HIV nebo anti-EBV činidel.

Roztoky nebo suspenze použité pro parenterální, intradermální, subkutánní nebo topické aplikace mohou zahrnovat následující složky:

sterilní vodu pro injekce, fyziologický roztok, pevné oleje, polyethylenglykoly, glycerin, propylenglykol nebo jiná syntetická rozpouštědla;

antibakteriální činidla jako je benzylalkohol nebo methýlparabens;

antioxidanty jako je kyselina askorbová nebo bisulfit sodný;

chelatační činidla jako je kyselina ethylendiamintetraoctová;

pufry jako jsou acetáty, citráty nebo fosfáty a činidla pro nastavení tonicity jako je chlorid sodný nebo dextrosa.

Parenterální přípravky mohou být uzavřeny v ampulích, použitelné injekční stříkačky nebo lékovky pro větší počet dávek jsou ze skla nebo plastu.

Při podávání intravenózně jsou preferovanými nosiči fyziologický roztok nebo fyziologický roztok tlumený fosfátem (PBS).

V preferovaných podáních jsou aktivní sloučeniny připraveny s nosiči, které chrání sloučeninu proti rychlému vylučování z těla, jako je formulace s kontrolovaným uvolňováním, včetně implantátů a mikro-opouzdrěných dávkových systémů. Mohou být použity biodegradovatelné, biokompatibilní polymery, jako je ethylenvinylacetát, polyanhydridy, polyglykolová kyselina, kolagen, polyortoestery a polymléčná kyselina. Způsoby

přípravy těchto formulací jsou známy odborníkovi ze stavu techniky. Materiály lze také běžně získat z Alza Corporation a Nova Pharmaceuticals, Inc.

Liposomální suspenze (včetně liposomů cílených na infikované buňky s monoklonálními protilátkami na virové antigeny) jsou také preferovány jako farmaceuticky přijatelné nosiče. Tyto mohou být připraveny způsoby známými odborníkovi ze stavu techniky, jak je například popsán v patentu US 4 522 811 (který je zde začleněn jako reference jako celek).

Například liposomové formulace mohou být připraveny rozpuštěním vhodného lipidu (ů) (jako je stearoyl fosfatidyl ethanolamin, stearoyl fosfatidyl cholin, a cholesterol) v anorganickém rozpouštědle, které se potom odpaří a zanechá tenký film suchého lipidu na povrchu kontejneru. Do kontejneru se potom zavědne vodný roztok účinné sloučeniny nebo jeho monofosfátového, difosfátového a/nebo trifosfátového derivátu. Kontejner se potom ručně otáčí, aby se odstranil lipidový materiál ze stěn kontejneru, a aby se rozptýlily lipidové agregáty, čímž se vytvoří liposomální suspenze.

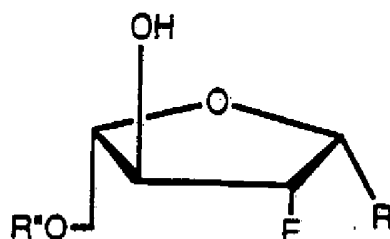
Tento vynález byl popsán s odkazy na jeho výhodná provedení.

Variace a modifikace vynálezu jsou pro odborníka v oboru zřejmé z předchozího podrobného popisu vynálezu.

Je zřejmé, že všechny z těchto variací a modifikací jsou zahrnuty do rozsahu vynálezu podle přiložených patentových nároků.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sloučenina L-nukleosidu vzorce:



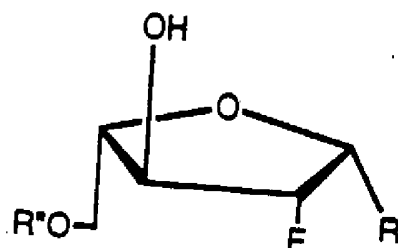
kde R je purinová nebo pyrimidinová báze a R' je vodík, acyl, alkyl, monofosforečnan, difosforečnan nebo trifosforečnan.

2. Použití sloučeniny podle nároku 1 a její farmaceuticky přijatelných solí pro výrobu léčiva pro léčení EBV nebo HBV infekce.

3. L-nukleosid podle nároku 1 a jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu léčiva pro léčení EBV nebo HBV infekce.

4. Způsob léčení lidí infikovaných HBV nebo EBV se provádí tak, že zahrnuje podávání HBV nebo EBV- léčivého množství L-nukleosidu vzorce

PŘÍL.
VLASTNÍ
PRŮMYSLU
VRAD
17. 11. 97
00510
0 1 2 2 1 0
2.1.



kde R je purinová nebo pyrimidinová báze a R' je vodík, acyl, alkyl, monofosforečnan, difosforečnan, nebo trifosforečnan.

5. Způsob podle nároku 4, kde L-nukleosid je 2'-fluor-5-methyl-β-L-arabinofuranosyluridin.

6. L-nukleosid podle nároku 1, kterým je 2'-fluor-5-methyl-β-L-arabinofuranosyluridin.

7. L-nukleosid podle nároku 1 až 3 vybraný ze skupiny sestávající z

N₁-(2'-deoxy-2'-fluor-β-L-arabinofuranosyl)-5-ethyluracilu,
N₁-(2'-deoxy-2'-fluor-β-L-arabinofuranosyl)-5-jodcytosinu, a
N₁-(2'-deoxy-2'-fluor-β-L-arabinofuranosyl)-5-joduracilu.

8. L-nukleosid podle nároku 1 až 3, kde je báze vybrána ze skupiny sestávající z 5-methyluracilu (thymin), 5-joduracilu, cytosinu a 5-ethyluracilu.

9. Použití podle nároku 2, kde L-nukleosid je 2'-fluor-5-methyl-β-L-arabinofuranosyluridin.

10. Použití podle nároku 2, kde L-nukleosid je vybrán ze skupiny sestávající z

N_1 -(2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl)-5-ethyluracilu,
 N_1 -(2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl)-5-jodcytosinu, a
 N_1 -(2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl)-5-joduracilu.

11. Použití podle nároku 2, kde je báze vybrána ze skupiny sestávající z 5-methyluracilu (thymin), 5-joduracilu, cytosinu a 5-ethyluracilu.

12. Způsob podle nároku 4, kde je L-nukleosid vybrán ze skupiny sestávající z

N_1 -(2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl)-5-ethyluracilu,
 N_1 -(2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl)-5-jodcytosinu, a
 N_1 -(2'-deoxy-2'-fluor- β -L-arabinofuranosyl)-5-joduracilu.

13. Způsob podle nároku 4, kde je báze vybrána ze skupiny sestávající z 5-methyluracilu (thymin), 5-joduracilu, cytosinu a 5-ethyluracilu.

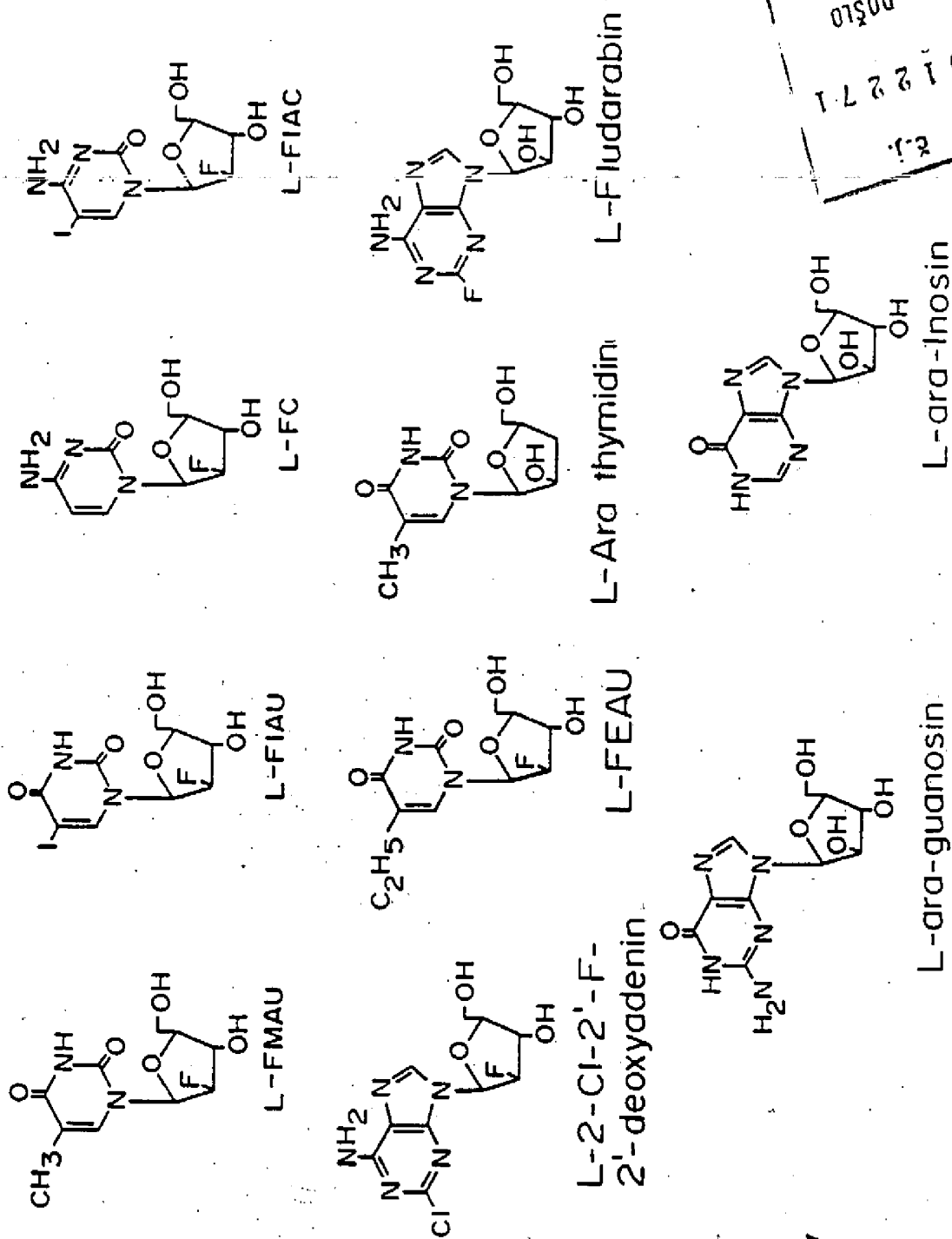
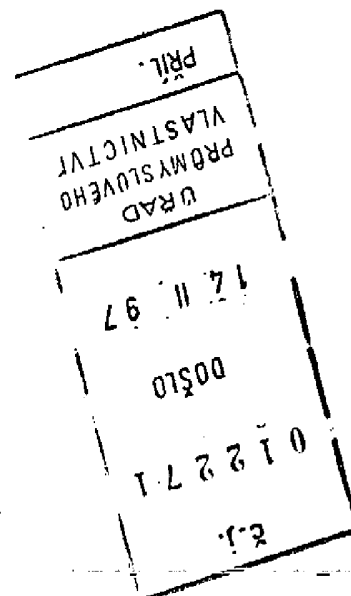


FIG. 1



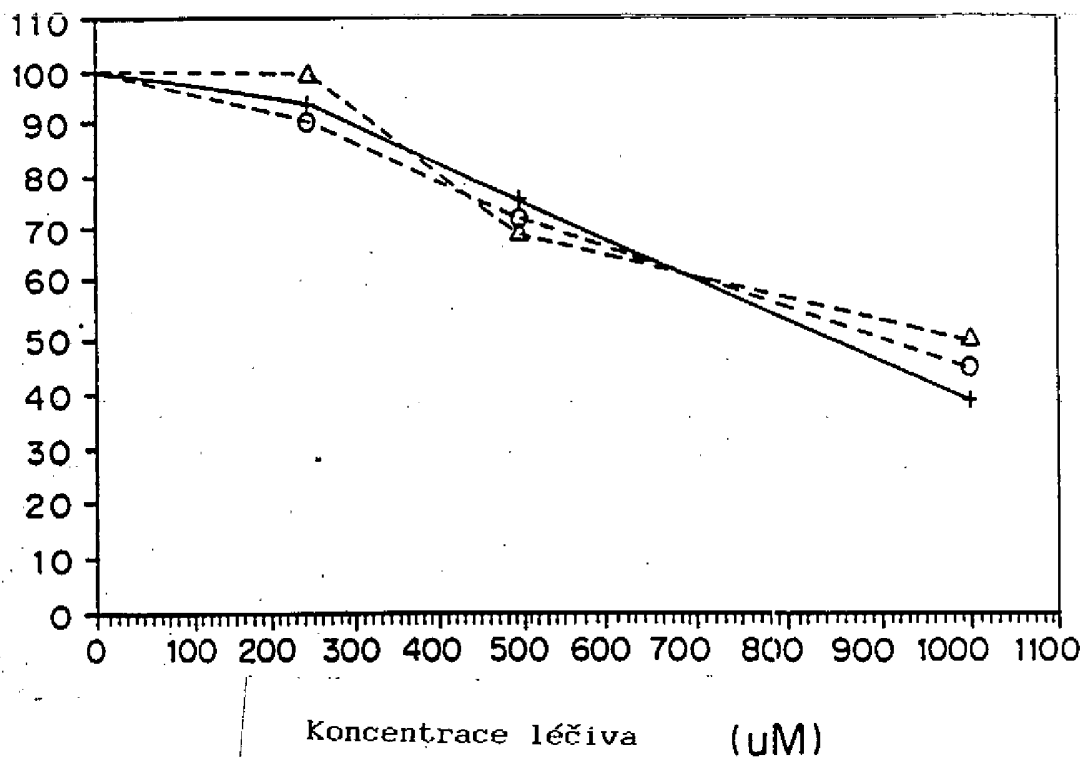


FIG. 2

PRIL.
VLASTNOSTI
PRŮMYŠLOVÉHO
U RAD
12. 11. 97
00510
012271
2.1.

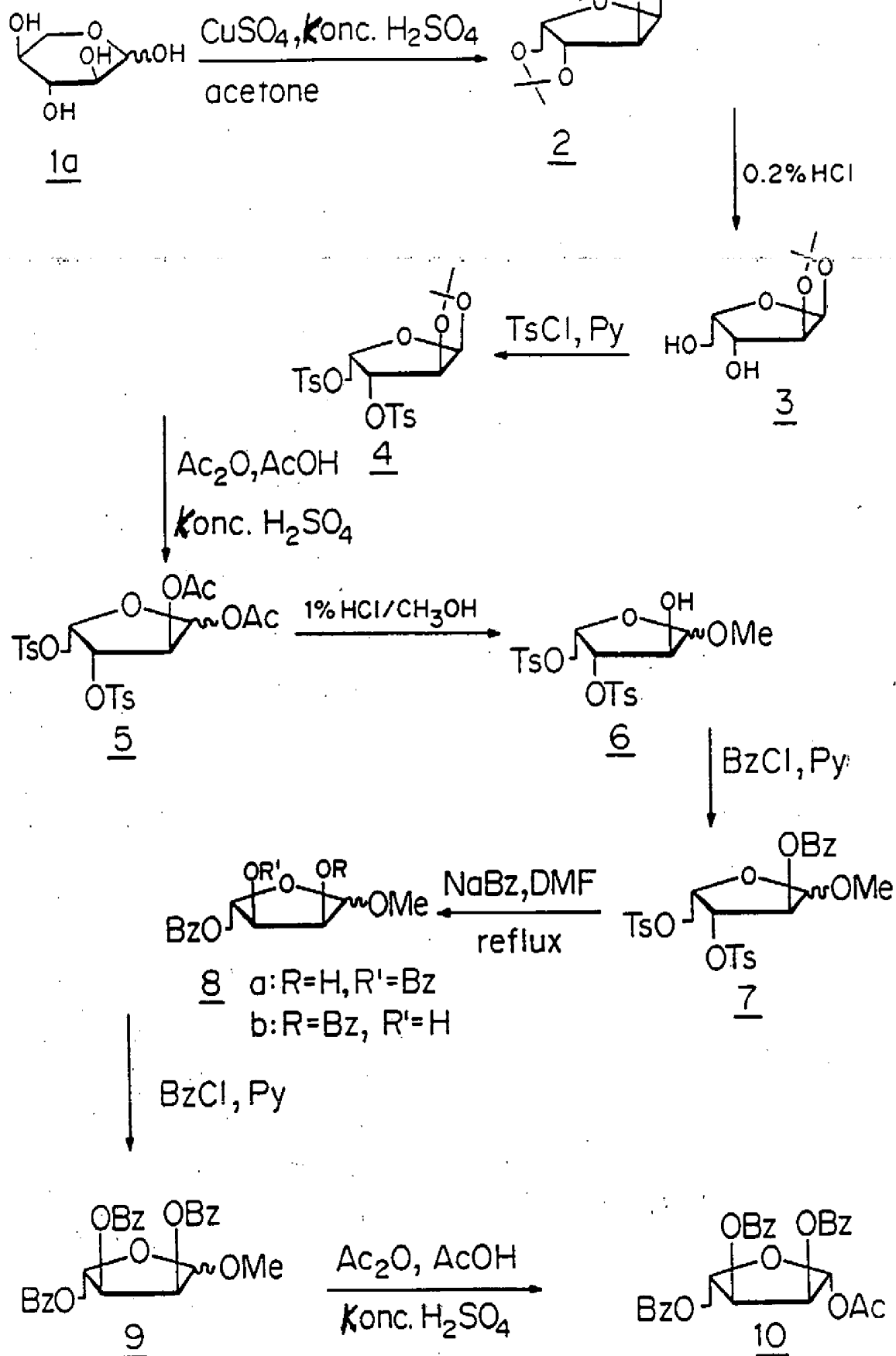


FIG. 4

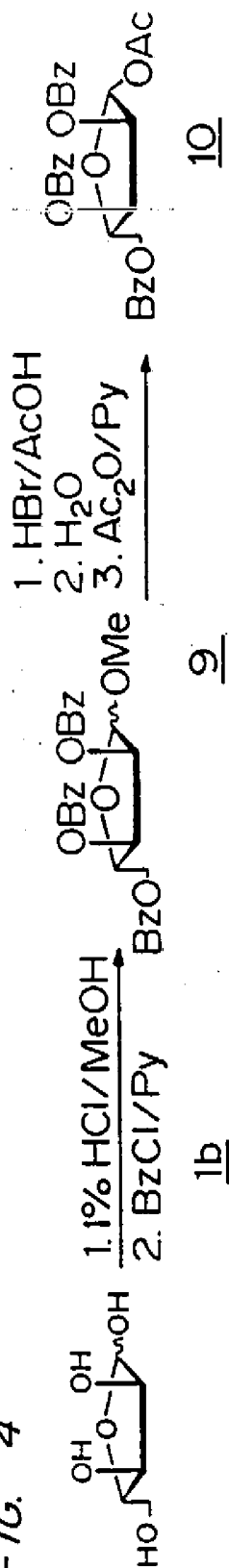
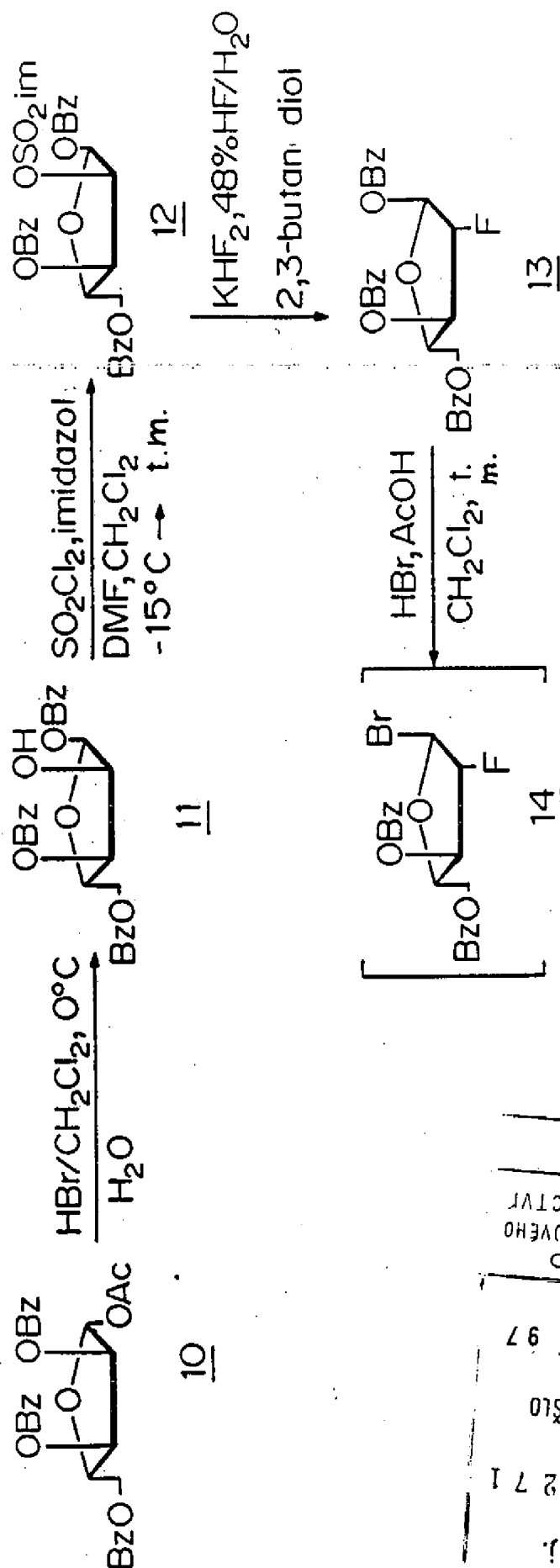
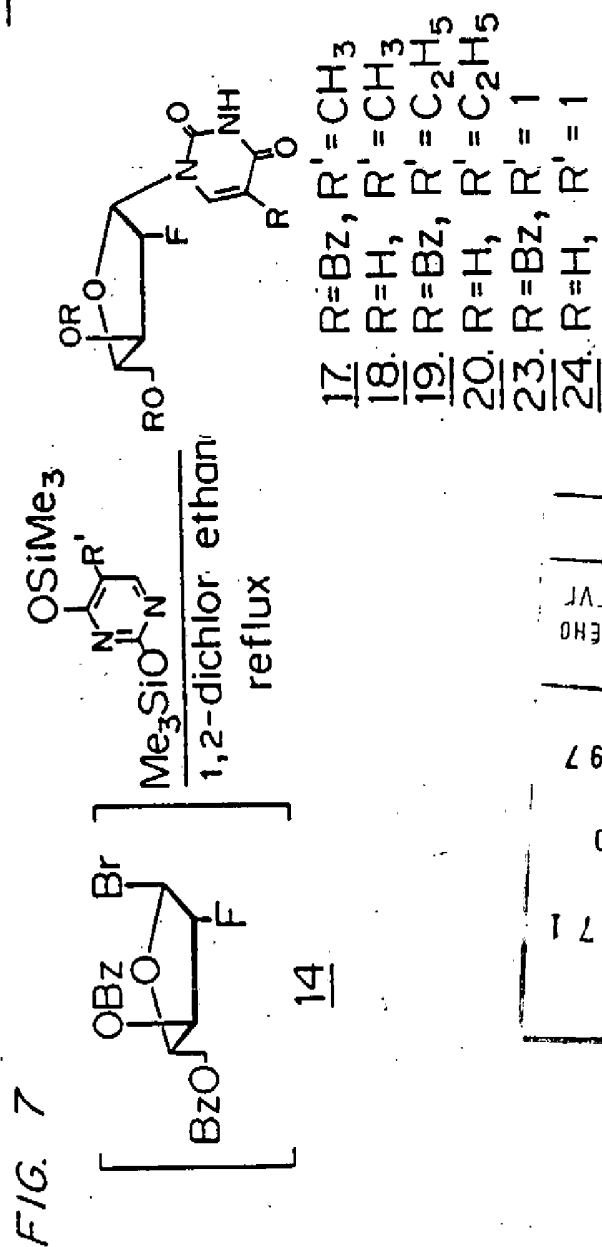
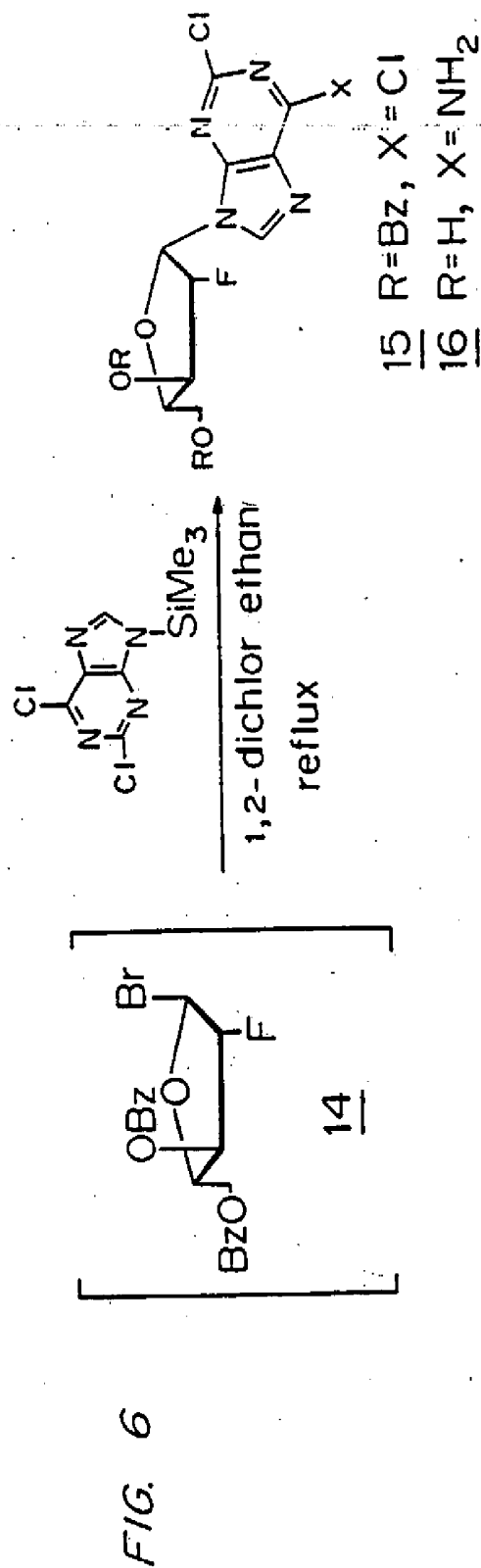


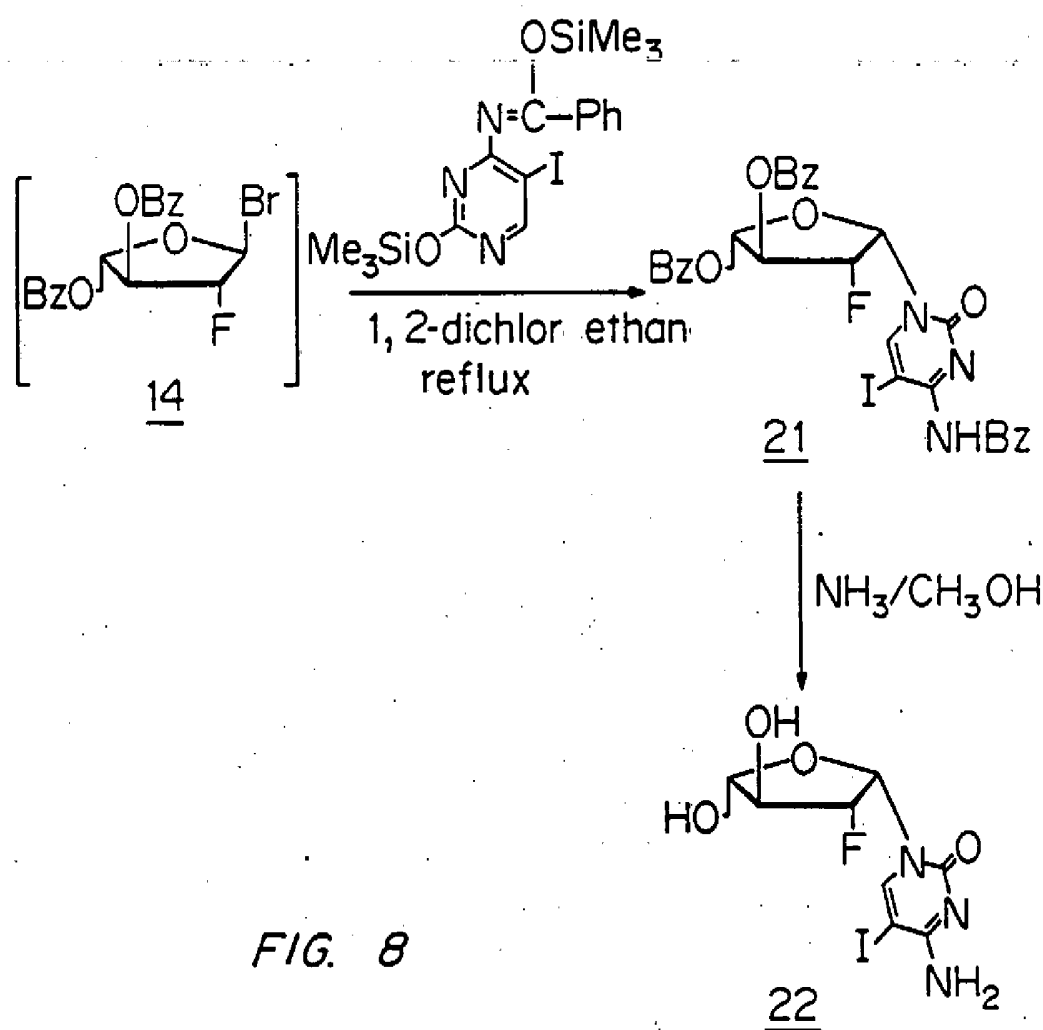
FIG. 5



012271
D. J.
DOŠLO
17. II. 97
GRAD
PRŮMYŠLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
PRIL.



č.j.	0 1 2 2 7 1	DOŠLO	14. II 97	GRAD PRŮMYŠLOVÉHO VLASTNICTVÍ	PŘIL.
------	-------------	-------	-----------	-------------------------------------	-------



PRIL				
VLASTNOSTI				
PRŮMYSLOVÉHO				
URAD				
1	2	11	9	7
DOŠLO				
0	1	2	2	7
E.J.				

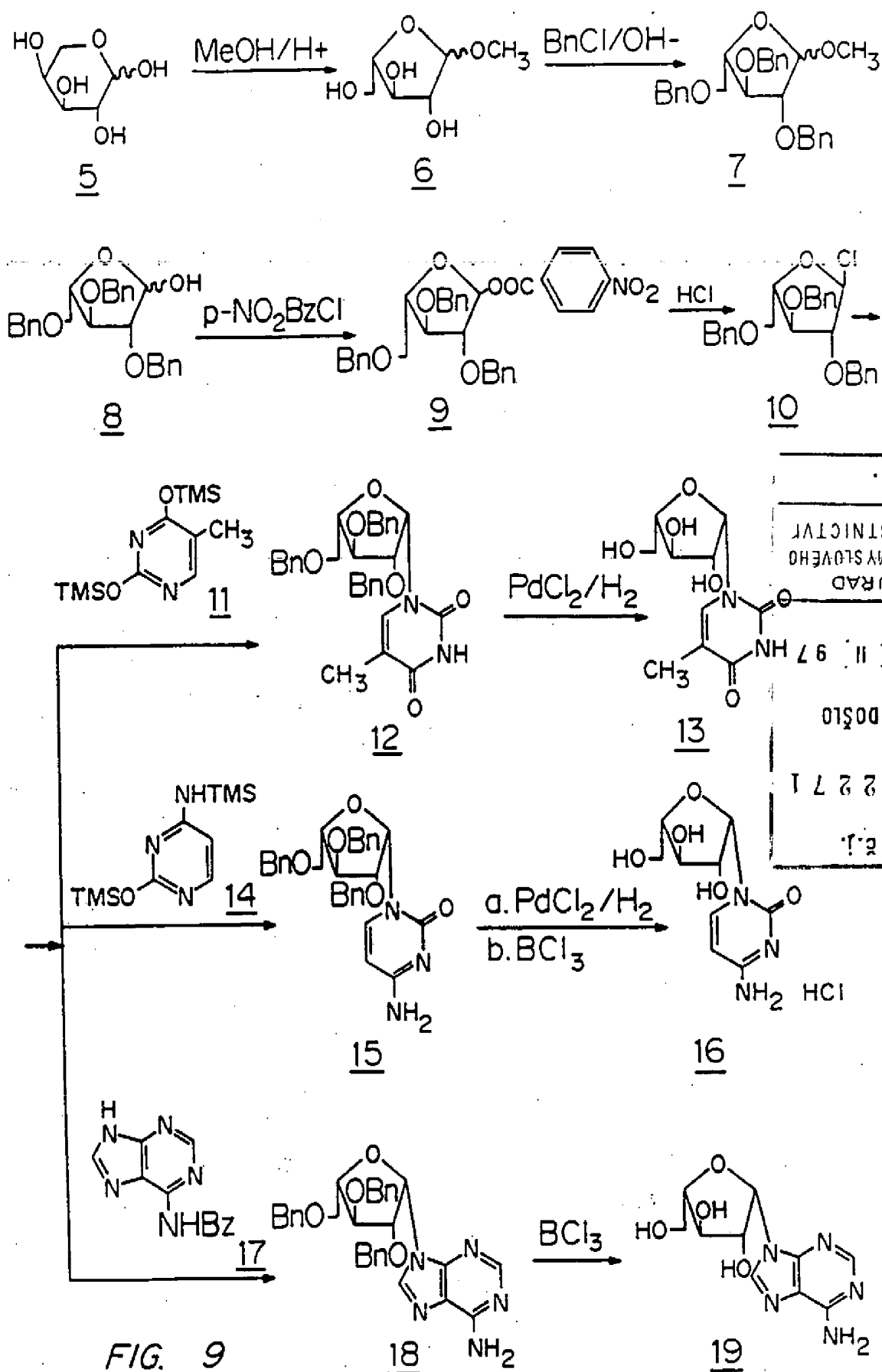


FIG. 9

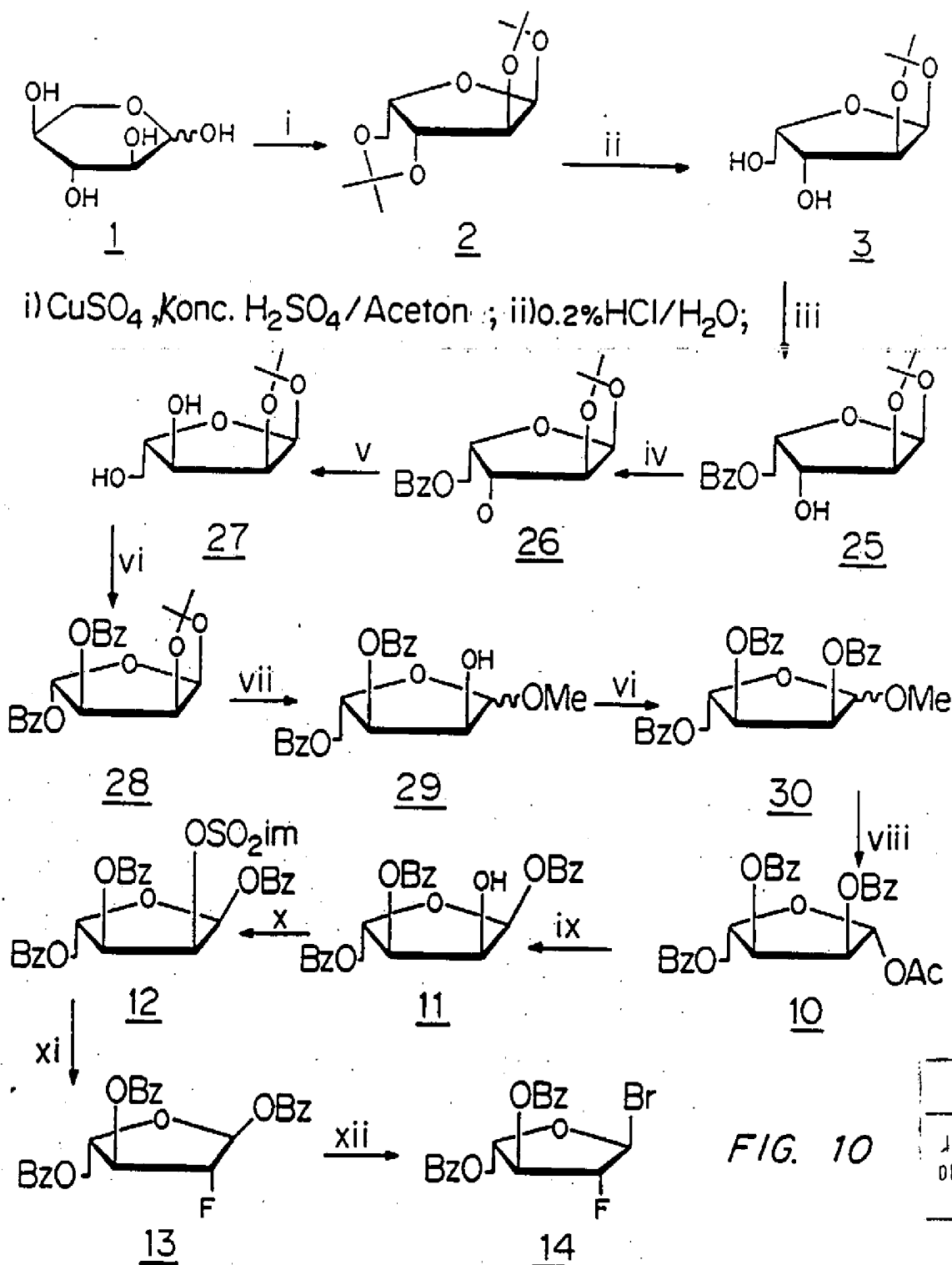


FIG. 10

- iii) BzCl/Py/CH₂Cl₂, 0°C, 0.5 h.; iv) PDC/Ac₂O/CH₂Cl₂, reflux;
 v) NaBH₄/95% EtOH; vi) BzCl/Py; vii) 1% HCl/CH₃OH
 viii) Ac₂O/AcOH/H₂SO₄; ix) HCl(g)/AcCl/CH₂Cl₂, 0°C, H₂O;
 x) SO₂Cl₂, imidazol./DMF/CH₂Cl₂, -15°C na tepl. místn.;
 xi) KHF₂, 48% HF/H₂O/2, 3-butanediol, N₂, reflux;
 xii) HBr/AcOH/CH₂Cl₂, t. místn.

PRIL.
VLADIMIR
PRŮMYSL
Č. 1
0 1 2 2 7 1
00500
1 2 11 9 7

č.j.	0 1 2 2 7 1
DOŠLO	1 4. 11. 97
ÚRAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
Příl.	

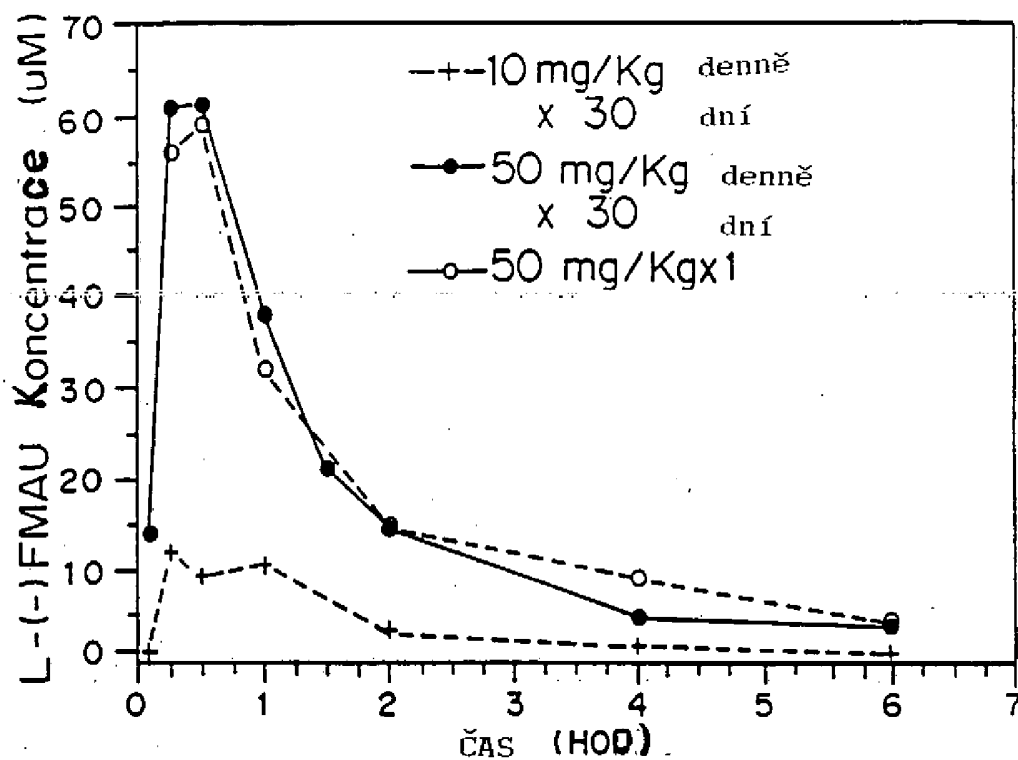


FIG. 11

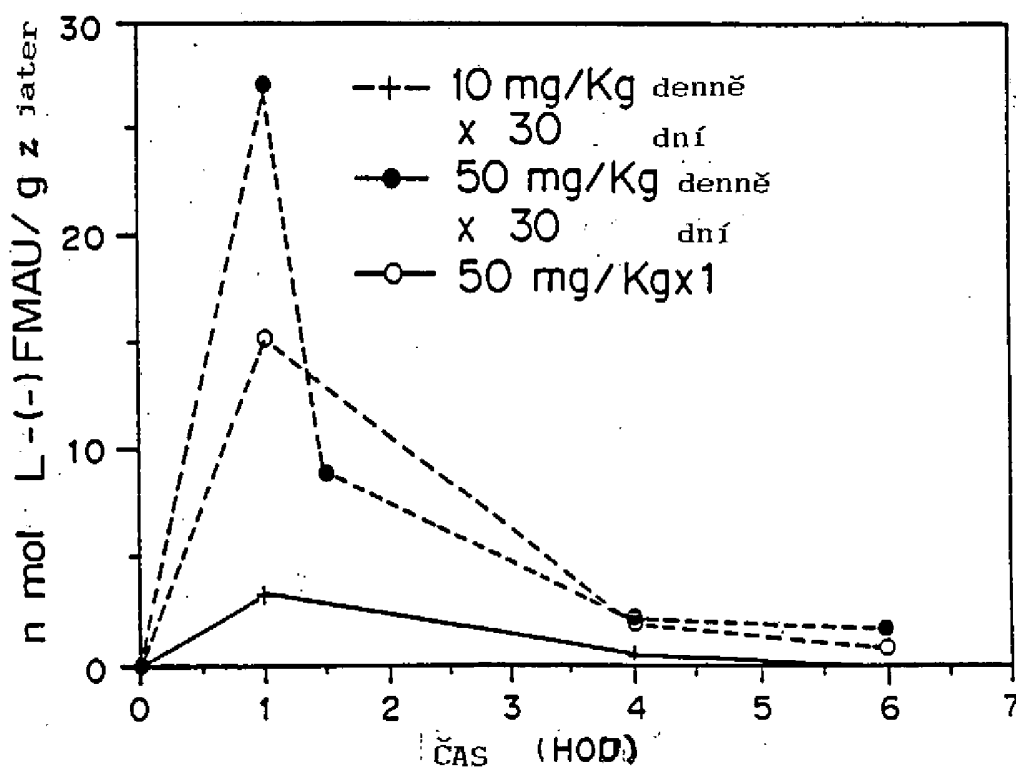
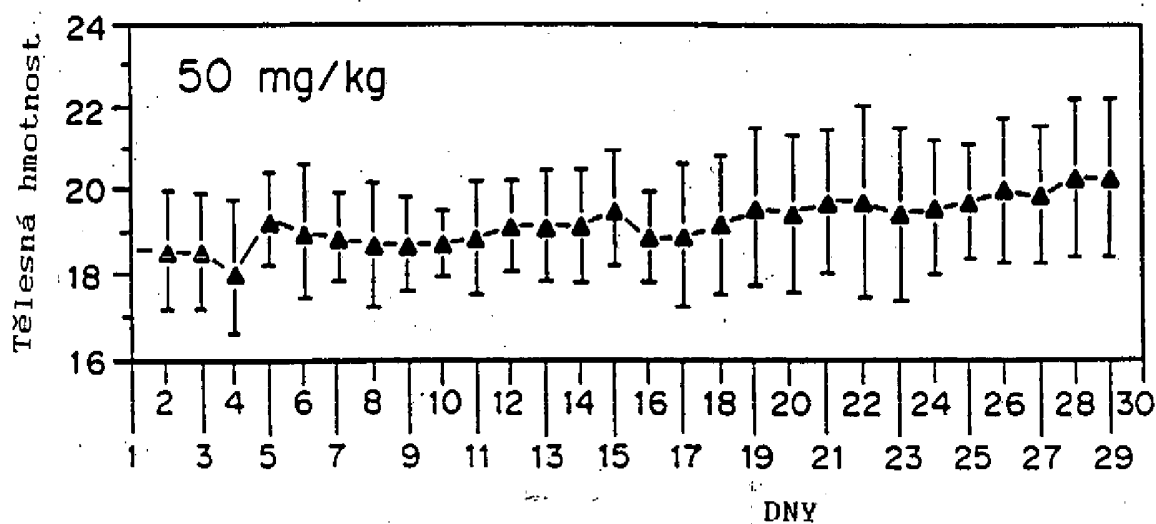
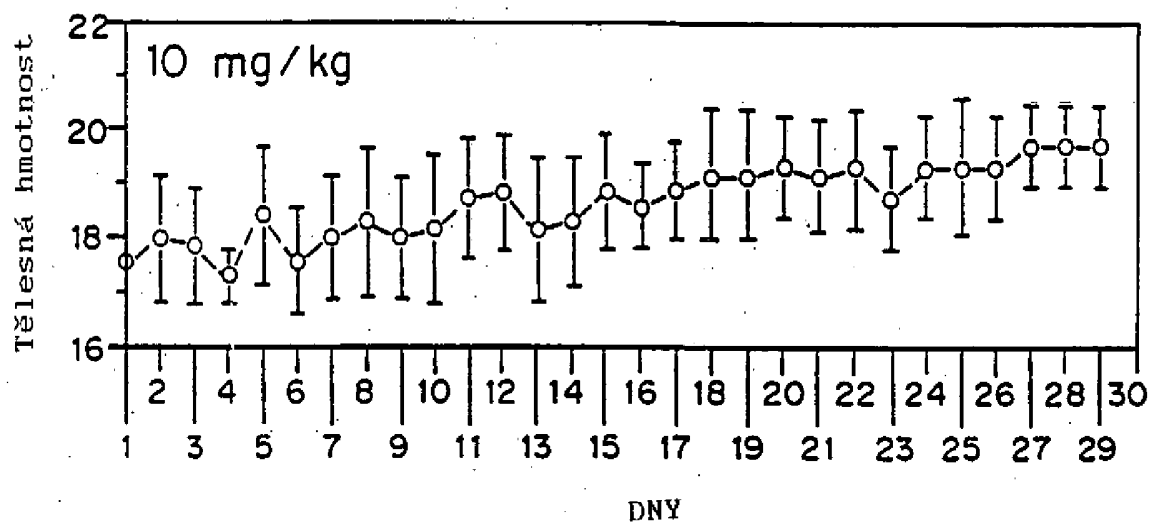
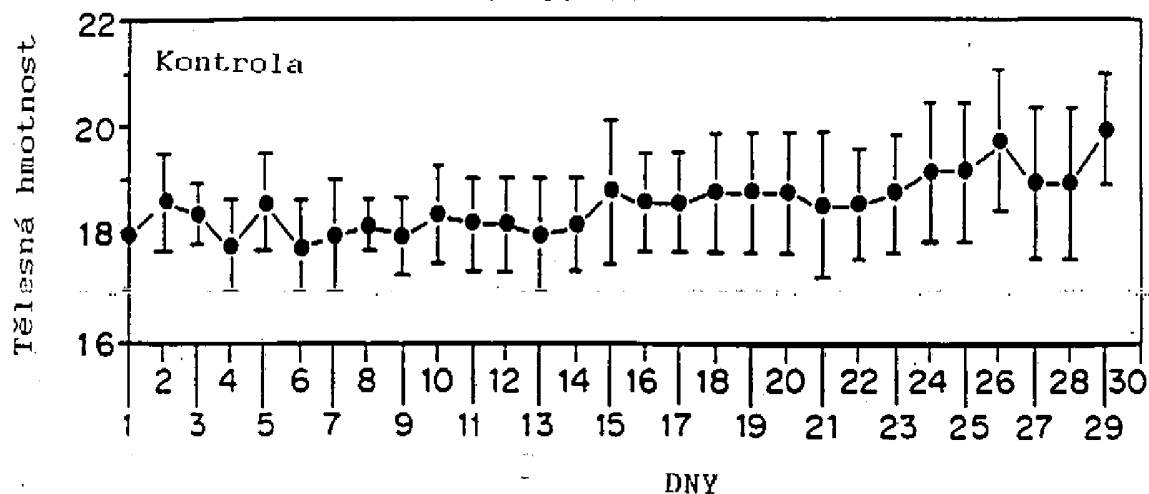


FIG. 12

Přil.	URAD PRŮMYSLUJENHO VLASTNICTVÍ	č.j.	0 1 2 2 7 1
		Došlo	14. II. 97

FIG. 13



012271	00510	14. 11. 97	UŘAD PRŮMYŠLOVÉHO VLASTNICTVÍ	PŘÍL.
--------	-------	------------	-------------------------------------	-------

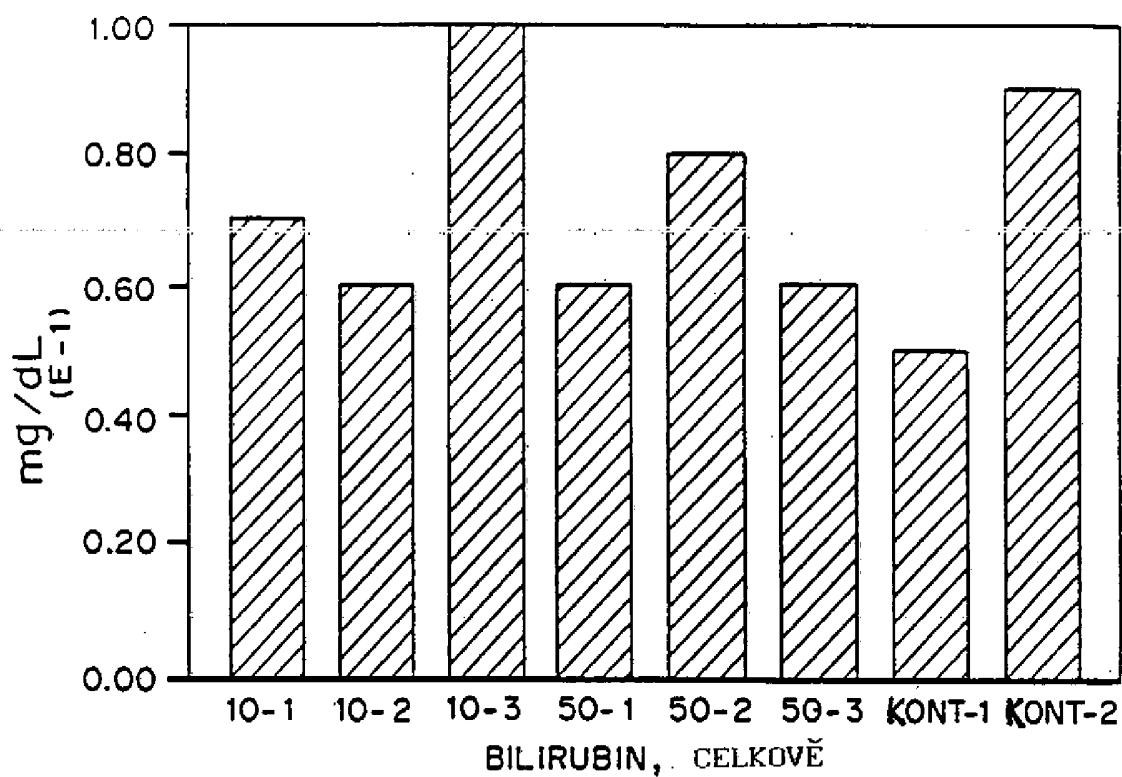


FIG. 14

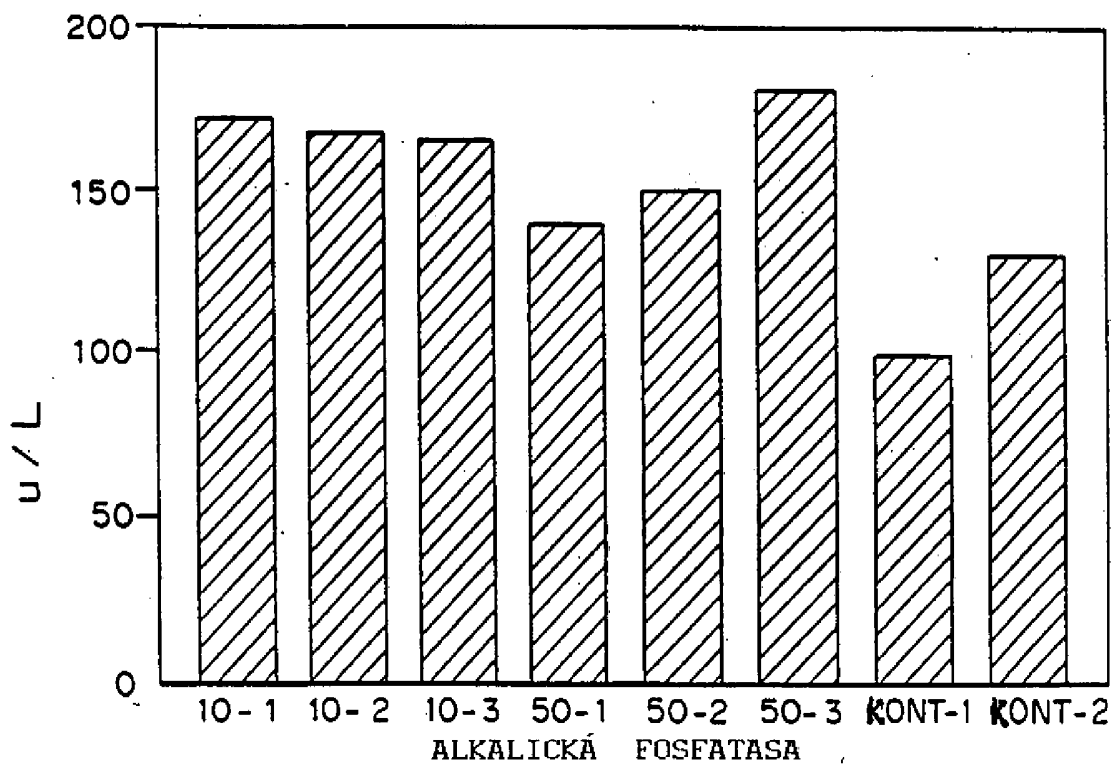


FIG. 15

č.j.	0 1 2 2 7 1
DOŠLO	
14. 11. 97	
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	

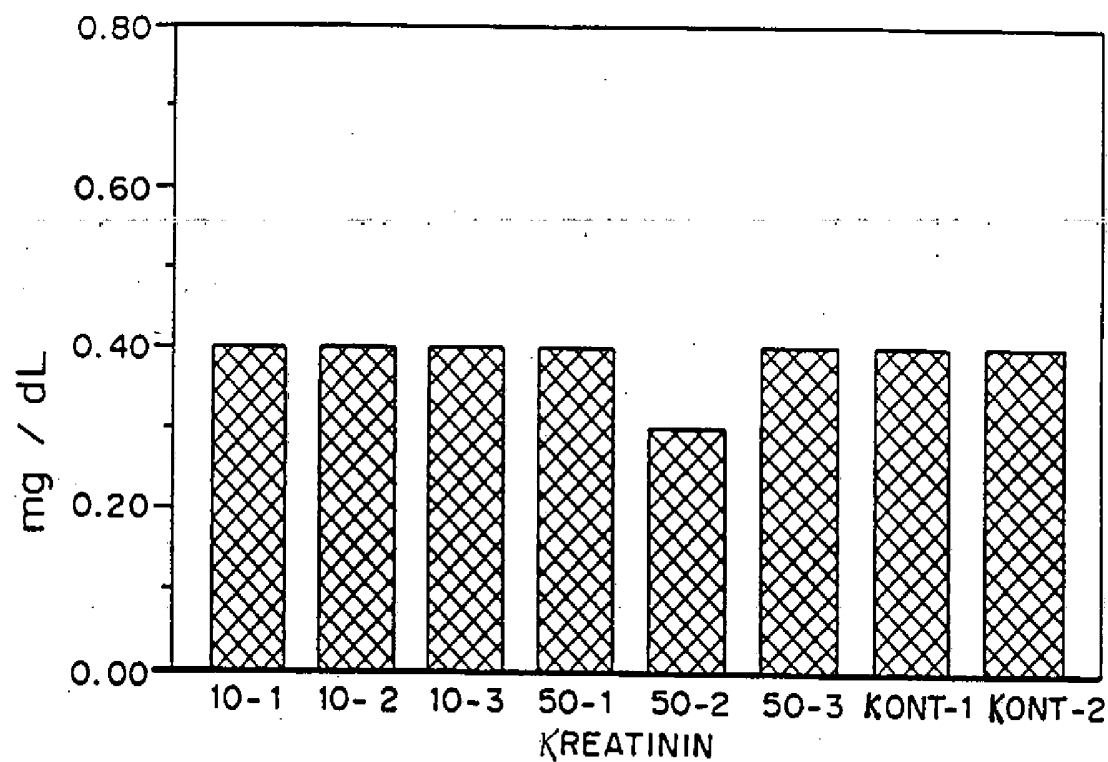


FIG. 16

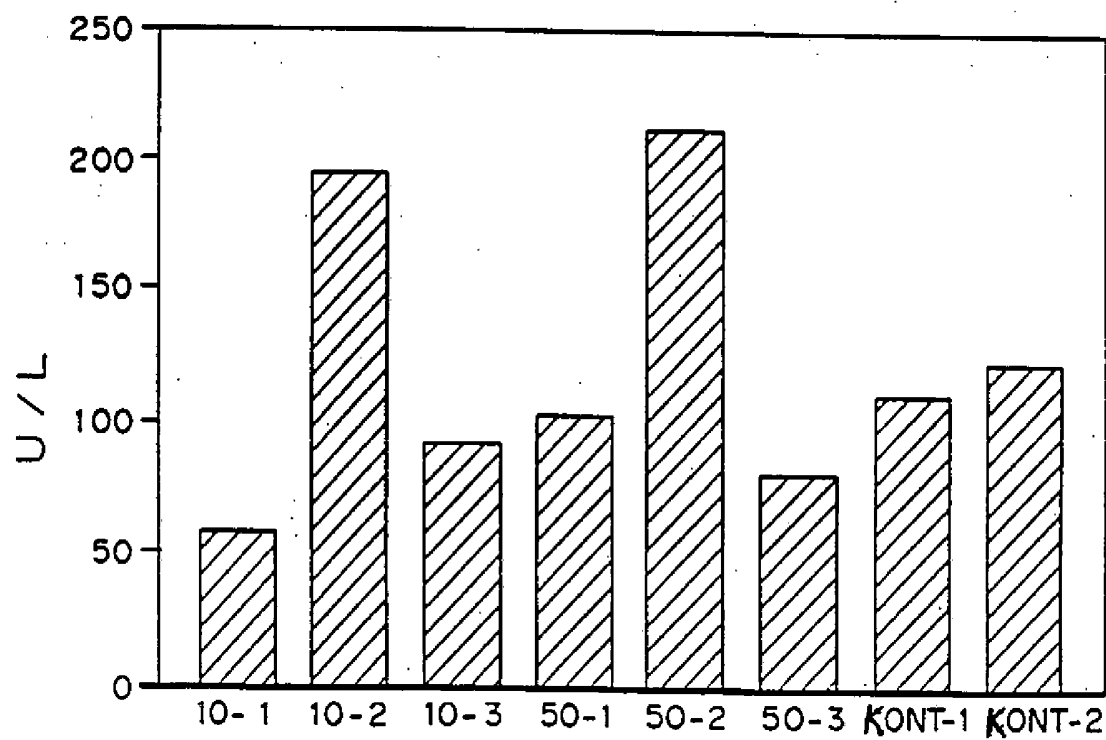


FIG. 17

č.j.	0 1 2 2 7 1
DOŠLO	1 4. 11. 97
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	

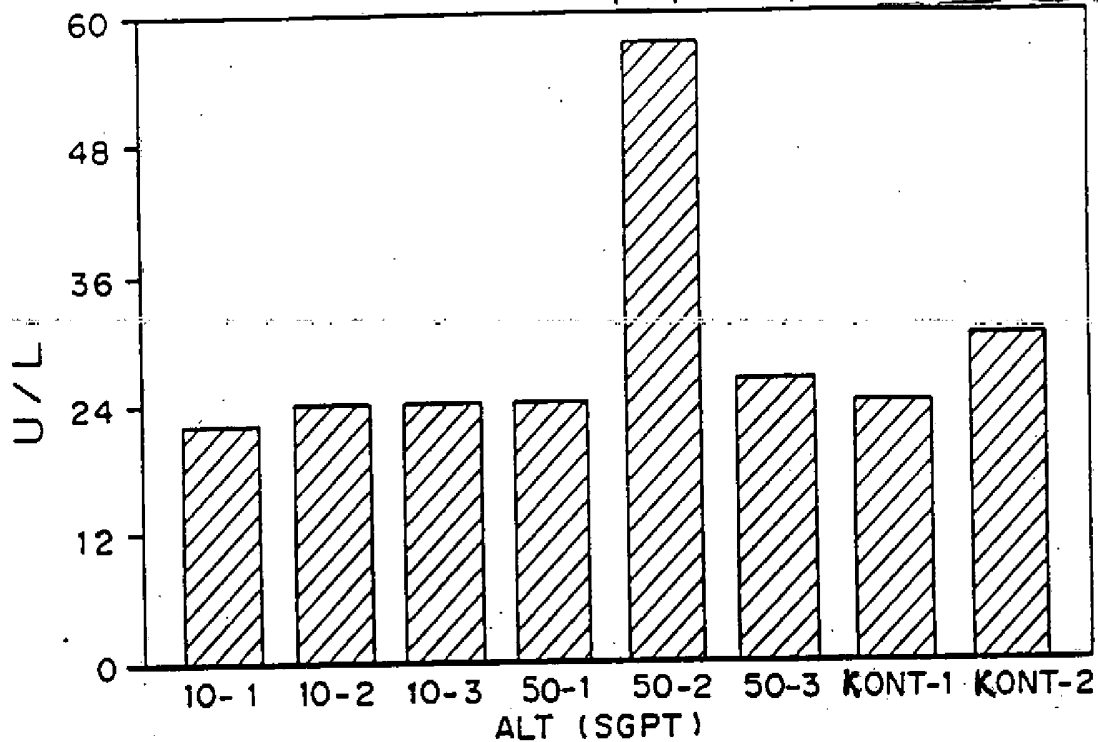


FIG. 18

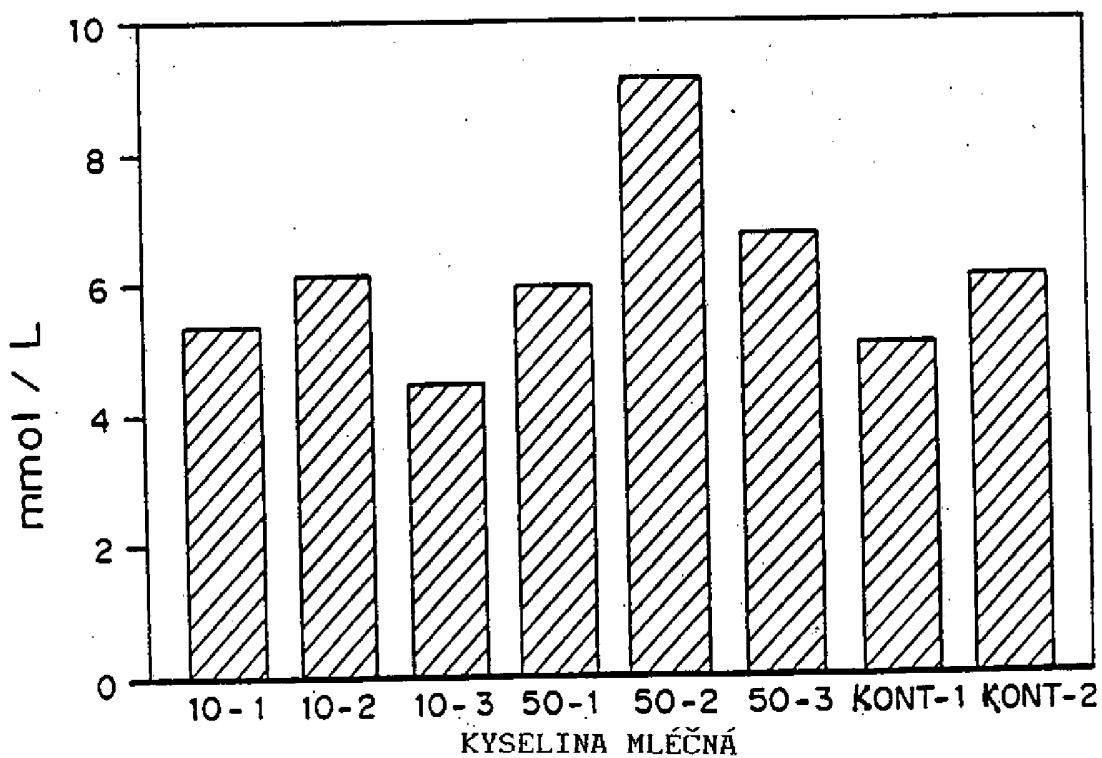


FIG. 19

č.j.	0 1 2 2 7 1
DOŠLO	
1 4. 11. 97	
URAD PRŮMYSLového VLASTNICTVÍ	
Příl.	

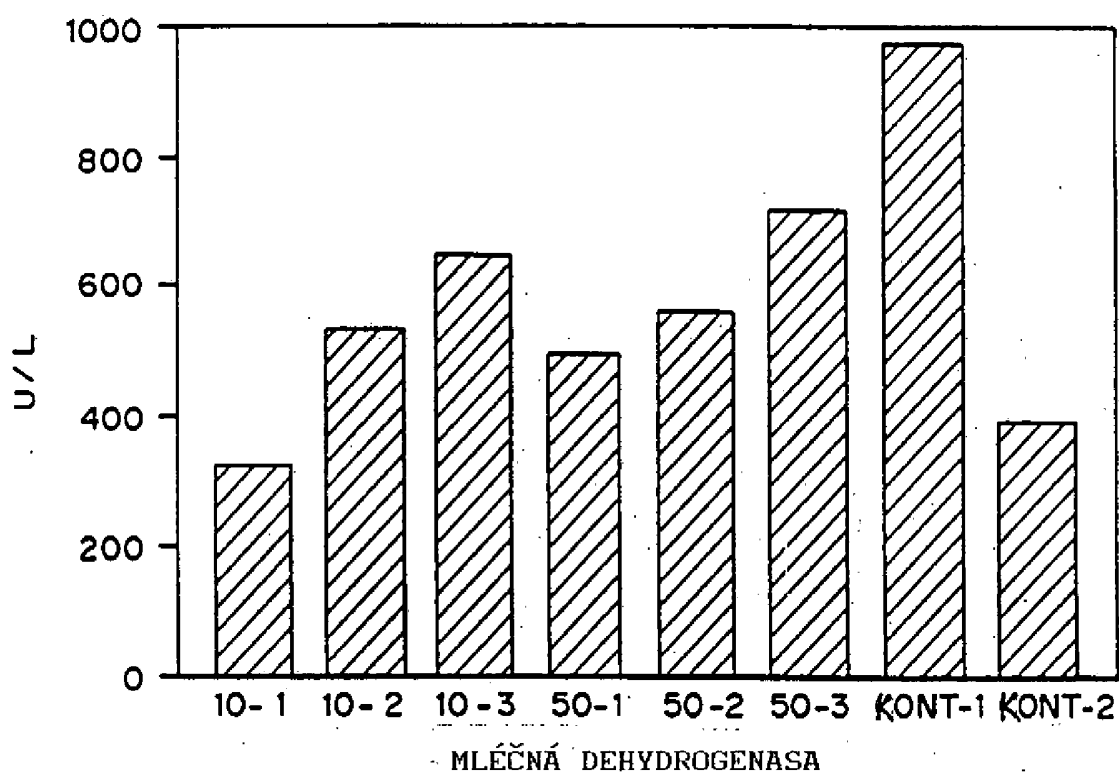


FIG. 20