



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 4754/88

(51) Int.Cl.5 C 07 H 19/16

(22) Indleveringsdag: 25 aug 1988

(41) Alm. tilgængelig: 27 feb 1989

(44) Fremlagt: 13 apr 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 26 aug 1987 US 089693

(71) Ansøger: *Merrell Dow Pharmaceuticals Inc.; 2110 East Galbraith Road; Cincinnati; Ohio 45215, US

(72) Opfinder: Esa T. *Jarvi; US, James R. *McCarthy; US, Nellikunja J. *Prakash; US

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

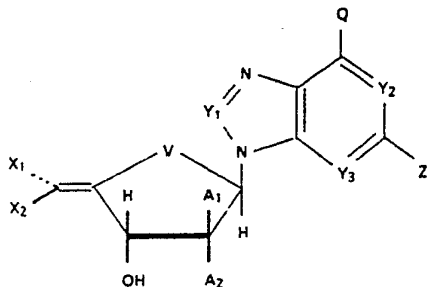
(54) Adenosin-derivater samt farmaceutiske præparater indeholdende sådanne derivater

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

4754-88

Et aristeromycin/adenosinderivat med formlen



hvor

V betyder oxy eller methylen,

X₁ og X₂ uafhængigt af hinanden betyder hydrogen eller halogen, med det forbehold, at mindst én af X₁ og X₂ altid betyder et halogenatom,

A₁ og A₂ uafhængigt af hinanden betyder hydrogen, halogen eller hydroxy, med de forbehold, at når A₁ betyder hydroxy betyder A₂ hydrogen, og når A₂ betyder hydroxy betyder A₁ hydrogen,

fortsættes

4754-88

Y_1 betyder nitrogen, en CH-gruppe, en CCl-gruppe, en CBr-gruppe eller en CNH_2 -gruppe,

Y_2 og Y_3 uafhængigt af hinanden betyder nitrogen eller en CH-gruppe,

Q betyder NH_2 , $NHOH$, $NHCH_3$ eller hydrogen, og

Z betyder hydrogen, halogen eller NH_2 ;

eller et farmaceutisk acceptabelt salt heraf, har fremragende farmaceutiske egenskaber.

S-Adenosyl-L-methionin (AdoMet)-afhængige transmethyleringsreaktioner er implicerede i flere forskellige biologiske processer, der har relation til viral vækst og replikation, viral transformation af celler, vækst af ondartede celler og processer såsom kemotaxis og sekretion [jvf. P. M. Ueland, Pharm. Reviews, 34, 223 (1982)]. I almindelighed katalyseres disse transmethyleringsreaktioner ved hjælp af flere forskellige transmethylaser, der udnytter AdoMet som et methyl donor-substrat ved methylering af et antal methyl-acceptor-substrater, såsom catecholer; norepinephrin; histamin; serotonin; tryptamin; membran-phospholipider; lysyl, arginyl, histidyl, aspartyl, glutamyl, og visse proteiners carboxylgrupper; tRNA og mRNA; og DNA. Disse forskellige transmethylaser tilvejebringer S-adenosin-L-homocystein (AdoHcy) som et biprodukt ved overførsel af en methylgruppe fra AdoMet til det egnede methylacceptor-substrat.

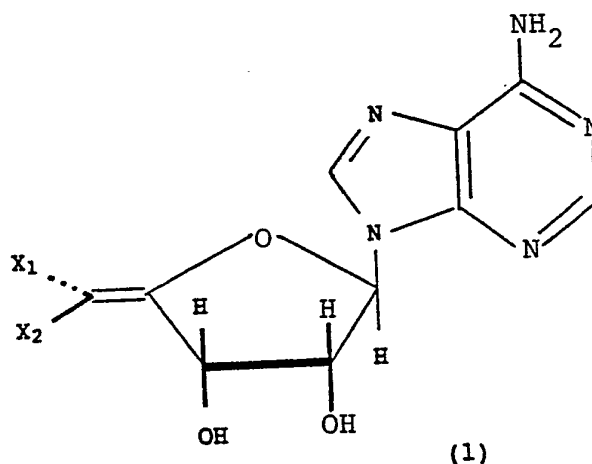
AdoHcy har vist sig at være en kraftigt virkende feed-back-inhibitor af de AdoMet-afhængige transmethyleringsreaktioner. Denne feed-back-inhibering af transmethylaser reguleres ved bionedbrydning af AdoHcy ved hjælp af S-adenosyl-L-homocystein-hydrolase, der tilvejebringer en homeostatisk kontrol af vævsniveauerne for AdoHcy. Aktiviteten af S-adenosyl-L-homocystein-hydrolase menes af fagfolk i almindelighed at spille en vigtig rolle ved regulering af vævsniveauerne for AdoHcy og derved at styre aktiviteten af de AdoMet-afhængige transmethyleringsreaktioner.

Forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse er inhibitorer af S-adenosyl-L-homocystein-hydrolase. Disse forbindelser inhiberer derfor den naturligt forekommende bionedbrydning af AdoHcy, og de resulterer i forhøjede vævsniveauer af AdoHcy. Forhøjede niveauer af AdoHcy tilvejebringer igen en endogen feed-back-inhibering af forskellige AdoMet-afhængige transmethyleringsreaktioner, der er tilknyttet biologiske processer, der har forbindelse med viral vækst og replikation, viral transformation af celler, vækst af ondartede celler og processer såsom kemotaxis og sekretion.

Forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse er derfor anvendelige som inhibitorer af disse biologiske processer, og de er anvendelige ved slutanvendelse som terapeutiske midler ved behandling af patienter, der lider af forskellige patologiske tilstande, i hvilke disse processer er implicerede, såsom virale infektioner og neoplastiske sygdomstilstande.

Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte adenosin-derivater, der er anvendelige som inhibitorer af S-adenosyl-L-homocystein-hydrolase, og som er anvendelige som anti-virale og anti-neoplastiske midler.

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer hidtil ukendte adenosin-derivater med formlen I



hvor

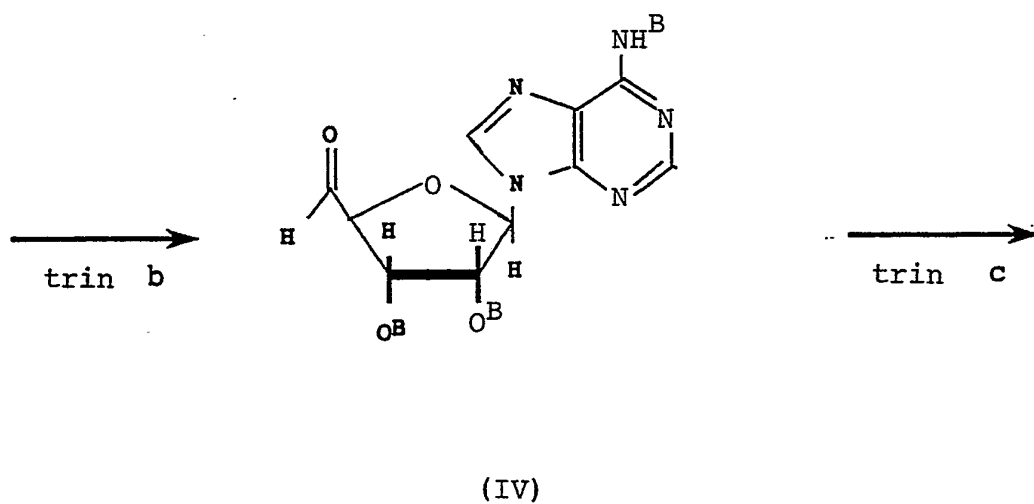
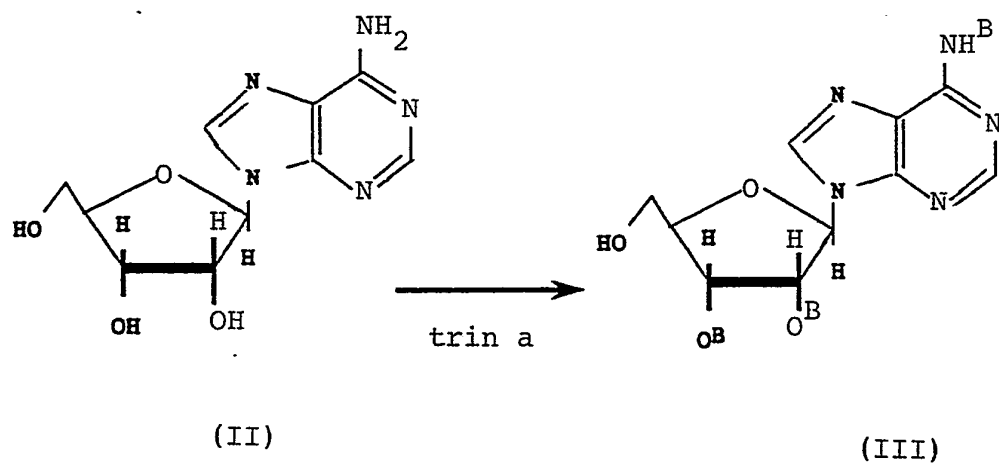
X_1 og X_2 uafhængigt af hinanden betyder hydrogen eller halogen, med det forbehold, at mindst én af X_1 og X_2 altid betyder et halogenatom,

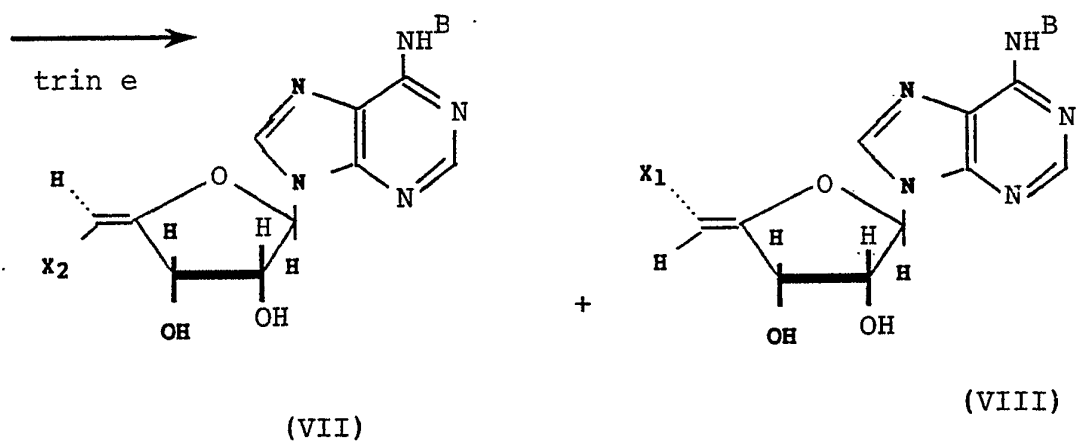
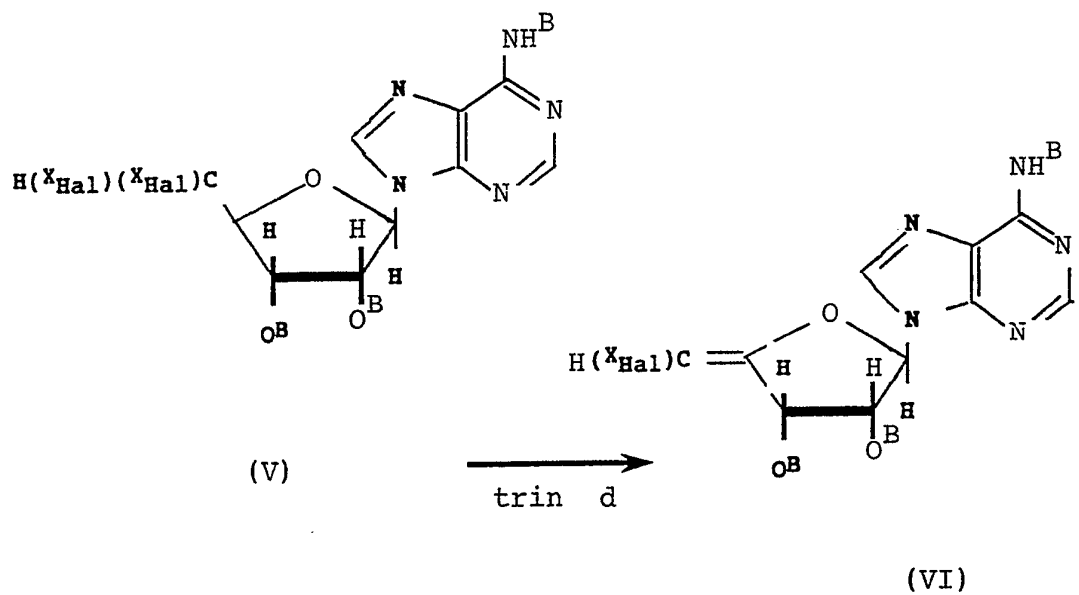
eller et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt heraf.

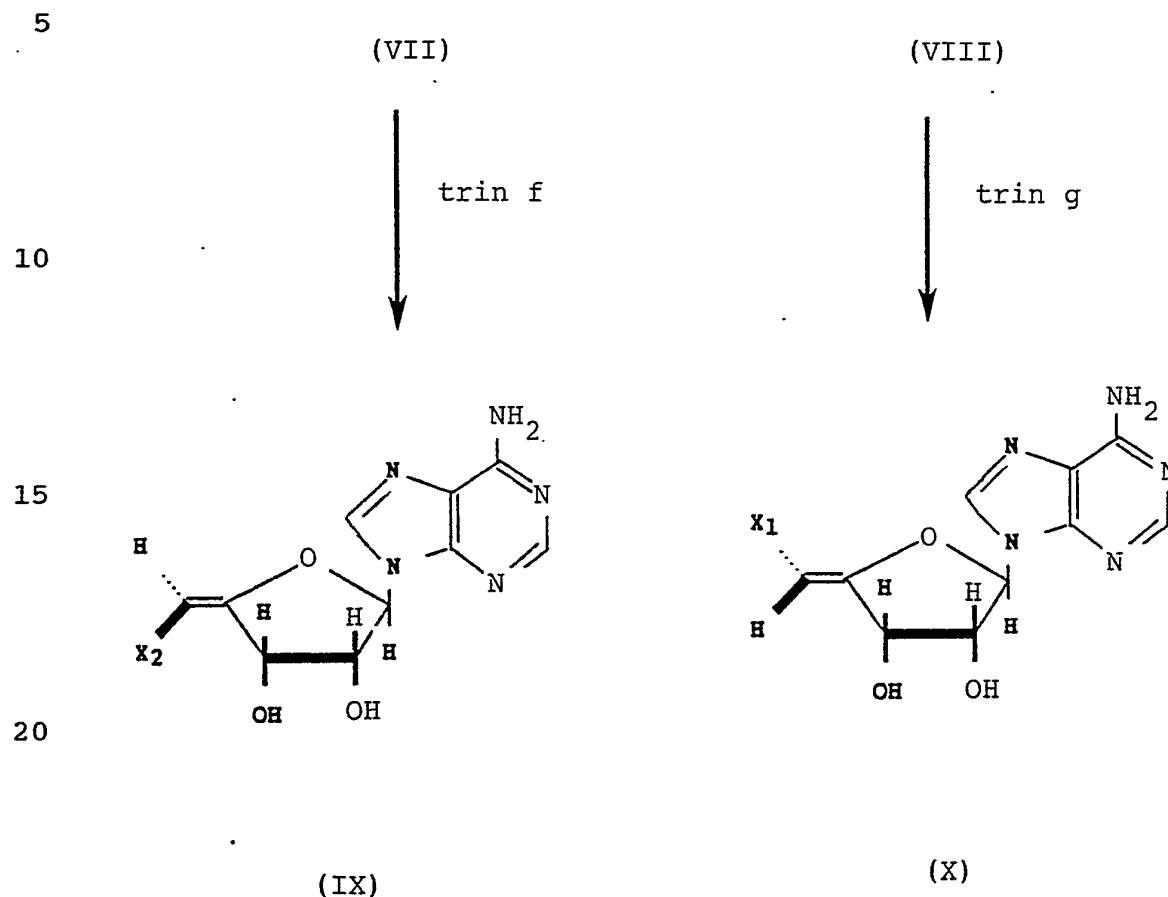
Den foreliggende opfindelse angår også et farmaceutisk præparat, som er ejendommeligt ved, at det indeholder en effektiv mængde af en forbindelse ifølge opfindelsen.

Som anvendt heri betyder betegnelsen "halogen" eller " X_{Hal} " et fluor-, chlor-, brom- eller iodatom.

Adenosin-derivaterne med formlen I, hvori enten X_1 eller X_2 betyder hydrogen, kan fremstilles under anvendelse af fremgangsmåder og tekniker, der er kendte og påskønnede af fagfolk. En gængs syntesefremgangsmåde er anført i reaktionsskema A, hvori alle substituenten, med mindre andet er anført, er som tidligere defineret.

Reaktionsskema A

Reaktionsskema A (fortsat)

Reaktionsskema A (fortsat)

25

Grundlæggende blokeres i trin a de reaktive hydroxy- eller aminogrupper, der er forskellige fra 5'-hydroxygruppen med standard blokeringsmidler, der er kendte af fagfolk. Disse blokerende grupper kan være konventionelle aminobeskyttelsesgrupper for aminogruppen og konventionelle hydroxybeskyttelsesgrupper for 2'- og 3'-hydroxygruppen. O^B og NH^B i reaktionsskema A repræsenterer 2'- og 3'-hydroxygrupperne og aminogruppen blokeret med en blokeringsgruppe hvor det er passende.

Udvælgelsen og udnyttelsen af særlige blokeringsgrup-

per er kendte af fagfolk. I almindelighed bør de blokeringsgrupper vælges, der hensigtsmæssigt beskytter de aktuelle amino- eller hydroxygrupper under de efterfølgende syntesetrin, og som er lette at fjerne under betingelser, der ikke
5 forårsager nedbrydning af det ønskede produkt.

Eksempler på egnede hydroxybeskyttelsesgrupper er C₁₋₆-alkyl, tetrahydropyranyl, methoxymethyl, methoxyethoxymethyl, tert.butyl, benzyl og triphenylmethyl. Betegnelsen C₁₋₆-alkyl betyder en mættet carbonhydridgruppe med 1 til 6
10 C-atomer med ligekædet, forgrenet eller cyclisk konfiguration. De foretrukne blokeringsgrupper for 2'- og 3'-hydroxy er 2', 3'-O-isopropyliden, hvilken dannes ved omsætning af den ikke-blokerede forbindelse med acetone.

Eksempler på egnede aminobeskyttelsesgrupper er benzoyl, formyl, acetyl, trifluoracetyl, phthalyl, tosyl, benzensulfonyl, benzyloxycarbonyl, substitueret benzyloxycarbonyl (f.eks. p-chlor-, p-brom-, p-nitro-, p-methoxy-, o-chlor-, 2,4-dichlor- og 2,6-dichlor-derivater), tert.butyl-oxycarbonyl (Boc), tert.amyloxycarbonyl, isopropyloxycarbonyl, 2-(p-biphenyl)-isopropyloxycarbonyl, allyloxycarbonyl,
20 cyclopentyloxycarbonyl, cyclohexyloxycarbonyl, adamantyloxycarbonyl, phenylthiocarbonyl og triphenylmethyl. Den foretrukne aminobeskyttelsesgruppe er det di-benzoylderivat, der fremstilles ved at omsætte den ikke-blokerede forbindelse
25 med benzoylchlorid.

I trin b oxideres det passende blokerede 5'-hydroxyderivat III til det tilsvarende aldehyd IV. Det foretrukne oxidationsmiddel er dicyclohexylcarbodiimid, methylphosphonsyre eller dichloreddikesyre og dimethylsulfoxid.

30 Aldehydet IV kan eventuelt derivatiseres til forbedring af forbindelsens håndteringskarakteristika eller til at gøre oprensningen heraf lettere ved hjælp af fremgangsmåder og teknikker, der er kendte og påskønnede af fagfolk. F.eks. kan 5',5'-(N,N'-diphenylethylendiamino)-derivatet
35 fremstilles ved hjælp af fremgangsmåden ifølge Ranganathan et al. (J. Org. Chem., 39, 290 (1974)).

I trin c dannes 5',5'-di-halogenderivatet V (dvs. " $X_{\text{Hal}}(X_{\text{Hal}})C$ ") ved at omsætte det tilsvarende aldehyd IV med diethylaminosvovl-trihalogenid eller et lignende halogen-substiueret reagens. Diethylaminosvovl-trihalogenid fore-
5 trækkes.

I trin d dehydrohalogeneres 5'-di-halogenderivatet V til dannelse af det umættede derivat VI (dvs. " $(H)(X_{\text{Hal}})C$ "). Det foretrukne reagens til fremkaldelse af dehydrohalogenringen er kalium-tert.butoxid i nærværelse af dimethylsulfoxid.

10 I trin e fjernes hydroxybeskyttelsesgrupperne i overensstemmelse med konventionelle fremgangsmåder og teknikker, der er kendte og påskønnede af fagfolk. F.eks. kan 2', 3'-O-isopropyliden-blokeringsgruppen fjernes ved at omsætte VI med vandig trifluoreddikesyre. (Z)- og (E)-isomerene,
15 dvs. hhv. VII og VIII, kan på gængs måde isoleres på dette trin af syntesen ved udnyttelse af gængse isoleringsteknikker, hvilke er kendte og påskønnede af fagfolk. Alternativt kan (Z)- og (E)-isomerene isoleres efter afblokering af aminobeskyttelsesgrupperne som beskrevet nedenfor i trinnene
20 f og g.

I trinnene f og g fjernes (Z)- og (E)- isomerenes, dvs. hhv. VII og VIII, aminobeskyttelsesgruppe under anvendelse af fremgangsmåder og teknikker, der er velkendte og påskønnede af fagfolk. F.eks. kan benzoylaminoblokeringsgruppen fjernes ved hydrolyse med ammoniak.
25

Udgangsmaterialet, der anvendes i den almene syntesefremgangsmåde, der er anført i reaktionsskema A, er let tilgængeligt for fagfolk.

De følgende eksempler viser en syntese som beskrevet
30 ved hjælp af reaktionsskema A.

Eksempel 1.(Z)- og (E)-4',5'-Didehydro-5'-deoxy-5'-fluoradenosin5 Trin a: N⁶-benzoyl-2',3'-O-isopropyliden-adenosin.

Adenosin omdannes til dets 2',3'-acetonid efterfulgt af benzoylering til N⁶-benzoyl-derivatet i overensstemmelse med den fremgangsmåde, der er beskrevet af Smrt et al. (Coll. Czech. Chem. Comm. 29, 224 (1964)).

10

Trin b: N⁶,N⁶-Bis-benzoyl-5-deoxy-2',3'-O-isopropyliden-5',5'-(N,N'-diphenylethyldiamino)adenosin.

N⁶-Benzoyl-2',3'-O-isopropylidenadenosin omdannes til N⁶-benzoyl-5'-deoxy-2',3'-O-isopropyliden-5',5'-(N,N'-diphenylethyldiamino)adenosin i overensstemmelse med den fremgangsmåde, der er beskrevet af Ranganathan et al. [J. Org. Chem. 39, 290 (1974)]. Til 2,96 g af dette produkt i 10 ml pyridin, der er afkølet i et isbad, sættes 1,15 ml (9,9 mmol) benzoylchlorid. Blandingen omrøres natten over ved stuetemperatur, hvorefter den hældes over i isvand. Produktet ekstraheres over i 100 ml chloroform, hvorefter det tørres med magnesiumsulfat. Opløsningen indampes på en rotationsfordamper, hvorefter der tilsættes toluen. Inddampningen gentages under vakuum, hvorefter der opsamles 4,07 g af et gult skum. Produktet percoleres gennem en 40 mm x 10 cm flash-silikagelkolonne med 4% ethylacetat/96% dichlormethan. De egnede fraktioner samles og indampes, hvorefter der opsamles en gul olie. Denne olie opløses i ethanol og indampes tre gange, hvorved fås et fast stof. Det faste stof tritureres med 50 ml ethanol, hvorefter det filtreres. Det faste stof tørres under vakuum, hvorved fås 2,67 g af titelforbindelsen [smeltepunkt 135-138°C].

NMR (CDCl₃, 90 MHz): δ 1,30 (3H, S) 1,50 (3H, S), 3,3-3,7 (4H, m), 4,55 (1H, m), 5,1 (2H, d, J = 2), 5,65 (1H, d, J = 2), 6,1 (1H, S), 6,3-7,8 21H, M), 8,40 (1H, S).

Trin b, fortsat: N⁶,N⁶-Bis-benzoyl-2',3'-O-isopropylidenadenosin-5'-aldehyd.

Til 2,64 g (3,73 mmol) N⁶,N⁶-bis-benzoyl-5'-deoxy-2',3'--O-isopropyliden-5',5'-(N,N'-diphenylethylendiamino)-
5 adenosin i 370 ml dichlormethan ved 0°C sættes en opløsning af 1,56 g (8,2 mmol) p-toluensulfonsyre-monohydrat i 180 ml acetone.

Blandingen omrøres i 1,5 timer, hvorefter den filtreres. Filtratet indampes på en rotationsfordamper, og remanensen
10 deles mellem 200 ml dichlormethan og vand. Dichlormethanopløsningen tørres med magnesiumsulfat, og den indampes til et skum. 2,10 g af dette skum opløses i 200 ml benzen, og der tilbagesvales i et Dean-Stark-apparat i 1 time. Opløsningsmidlet indampes, hvorved fås 2,06 g af titelforbindelsen.
15 (NMR-spektrum viser mere end 80% af produktet som aldehyd).

NMR (CDCl₃), 90 MH): δ 1,40 (3H, S) 1,70 (3H, S), 4,65 (1H, S), 5,3 (1H, d, J = 7), 5,45 (1H, bred d, J = 7), 6,2 (1H, S), 7,2-7,8 (10H, m), 8,10 (1H, S), 8,45 (stor) og 8,55 (1H
20 sammen, 2 S), 9,3 (1H, S, CHO).

Trin c: N⁶,N⁶-Bis-benzoyl-5'-deoxy-5',5'-difluor-2',3'-O-isopropylidenadenosin.

25 6,5 g N⁶,N⁶-Bis-benzoyl-2',3'-O-isopropylidenadenosin-5'-aldehyd chromatograferes på en 40 ml x 7 cm flash-silika-gelkolonne med 15% ethylacetat/85% dichlormethan-opløsningsmiddel. Alle fraktioner med UV-aktivt materiale samles og indampes på tyndtlagschromatograf (TLC), hvorved fås 5,2
30 g af et skum. Skummet tilbagesvales i 200 ml benzen i 2 timer, hvorefter blandingen indampes og tørres under vakuum, hvorved fås 4,65 g oprenset N⁶,N⁶-bis-benzoyl-2',3'-O-isopropylidenadenosin-5'-aldehyd. 3,90 g af 5'-aldehydet opløses i 25 ml dichlormethan (destilleret fra calciumhydrid), og
35 til denne opløsning sættes 3,2 ml (3 ækvivalenter) diethylaminosvovl-trifluorid. Blandingen omrøres i 6 timer. Herefter

fortyndes blandingen med chloroform, hvorefter den hældes over i 50 ml af en omrørt mættet vandig natriumbicarbonatopløsning. Produktet ekstraheres over i 400 ml chloroform, hvorefter det tørres med MgSO_4 . Opløsningsmidlet indampes, 5 hvorved fås 3,60 g af et skum. Produktet percoleres gennem en 40 mm x 12 cm flash-silikagelkolonne med 4% ethylacetat/-96% dichlormethan-opløsningsmiddel. 738 mg af titelforbindelsen isoleres ved hjælp af TLC (R_f 0,6 med 10% ethylacetat/90% dichlormethan som opløsningsmiddel).

10

NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1,42 (3H, s) 1,65 (3H, s) 4,42-4,53 (1H, 3 m) 5,27 (1H, dd, $J = 2,7, 5,9$), 5,39 (1H, dd, $J = 1,7, 6,0$) 5,96 (1H, td, $J = 5,5, 4,5$), 7,34-7,52 (6H, m), 7,85 (4H, d, $J = 7,2$), 8,15 (1H, s), 8,67 (1H, s).

15

^{19}F -NMR (CDCl_3 , 282 MHz, ppm fra external CFCI_3)- 54,87 (ddd, $J = 12,4, 55,2, 299,0$)
- 50,71 (ddd, $J = 10, 55,2, 299,1$)

20 MS (FAB - XENON) $M + 1 = 536$

Analyse:

Beregnet for $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_5$: C 60,56, H 4,33

Fundet: C 60,26, H 4,44.

25

Trin d: N^6 -Benzoyl-4',5'-didehydro-2',3'-O-isopropyliden-5'-deoxy-5'-fluoradenosin

Til 401 mg (0,75 mmol) knust N^6, N^6 -bis-benzoyl-5'-deoxy-5',5'-difluor-2',3'-O-isopropylidenadenosin og 335 30 mg (4 ækvivalenter) kalium-tert.butoxid under nitrogen sættes 2 ml dimethylsulfoxid (destilleret fra calciumhydrid). Blandingen omrøres under nitrogen i 21 timer. Reaktionen stoppes med 4 ml af en mættet ammoniumchlorid-opløsning, hvorefter der ekstraheres med ethylacetat, hvorved fås 274 mg af en 35 gul olie. Olien percoleres gennem en 20 mm x 15 cm flash-kolonne med 30% ethylacetat/70% dichlormethan. De frak-

tioner, der har to pletter tæt sammen ved $R_f = 0,55$ (TLC med ethylacetat som opløsningsmiddel), samles. Disse fraktioner inddampes, hvorved fås 183 mg af titelforbindelsen indeholdende to isomere i et 2:1-forhold.

5

NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1,34 og 1,37 (lille) (3H sammen 2 s.), 1,49 (3H, s), 5,35-5,38 (1H, m), 5,56 og 5,90 (1H sammen; d, $J=4$ og m, resp.), 6,23 (bred s, lille) og 6,25 (1H sammen), 6,43 (d, $J=74$, stor) og 6,81 (d, $J=77$; 1H sammen),
 10 7,39-7,98 (6H, m), 8,646 (stor) og 8,653 (lille; 2 s, 1H sammen), 9,05 (1H, bred, NH).

NMR ^{19}F , 282 MHz, ppm fra external CFCl_3 : δ - 158,94 (d, $J=74$ stor), 174,4 (d, $J=77$, lille) MS: (CI) $M+1 = 412$.

15

Trin e: N^6 -Benzoyl-4',5'-didehydro-5'-deoxy-5'-fluoradenosin

178 mg N^6 -benzoyl-4',5'-didehydro-2',3'-O-isopropyliden-5'-deoxy-5'-fluoradenosin (2:1 blanding af isomere)
 20 opløses i 2 ml kold trifluoreddikesyre-vand (4:1). Blandingen omrøres ved stuetemperatur i 50 minutter, hvorefter den inddampes på en rotationsfordamper. Remanensen chromatograferes på 20 mm x 40 cm flash-silikagelkolonne med ethylacetat som opløsningsmiddel. Fraktioner samles, hvorved fås 3 mg
 25 af den isomer, med den højere R_f -værdi (den isomer, der forekommer i mindst mængde), 58 mg af en blanding af isomere, og 83 mg af den isomer med lavere R_f -værdi (den isomer, der forekommer i størst mængde) af titelforbindelsen.

30 NMR (CD_3OD , isomer med højere R_f -værdi, 90 MHz): δ 5,1 (2H, m), 6,35 (1H, d, $J=6$), (1H, D, $J=74$), 7,5-8,2 (5H, m), 8,63 (1H, s), 8,72 (1H, S).

NMR (CD_3OD , hovedisomeren med lavere R_f -værdi, 90 MHz): δ
 35 5,00-5,10 (2H, m), 6,37 (1H, d, $J=7$), 6,48 (1H, a, $J=75$), 7,54-8,19 (5H, m), 8,53 (1H, s), 8,62 (1H, s).

Trin f: (Z)-4',5'-didehydro-5'-deoxy-5'-fluoradenosin.

83 mg N⁶-benzoyl-4',5'-didehydro-5'-deoxy-5'-fluoradenosin (den ovenfor anførte isomer med den laveste R_f-værdi) opløses i absolut ethanol, hvorefter der indampes
5 og genopløses i 6 ml ethanol. Herefter bobles vandfrit ammoniak gennem den isafkølede opløsning i et 20 mm x 12 cm Carius-rør. Herefter forsegles røret, og isbadet fjernes. Efter 14 timer ved stuetemperatur åbnes røret, og opløsningen indampes, hvorved fås 87 mg af det rå produkt. Dette tritu-
10 reres i 1 ml methanol, hvorefter det faste stof filtreres fra. Produktet tørres under vakuum, hvorved fås 20 mg af titelforbindelsen (et hvidt pulver, der bliver blødt ved 100-110°C, og som smelter ved 225-230°C).

15 NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ 5,02-5,05 (2H, m), 6,28 (1H, d, J=F), 6,56 (1H, d, J=7,52), 8,21 (1H, s), 8,33 (1H, s).

¹⁹F-NMR (282 MHz, ppm fra external CFCl₃):
-166,76 (d, J=75,2)

20

MS: (FAB-XENON) M + 1 = 268

Trin g: 4',5'-didehydro-5'-deoxy-5'-fluoradenosin, med E-isomeren som hovedkomponenten.

25 58 mg N⁶-benzoyl-4',5'-didehydro-5'-deoxy-5'-fluoradenosin (en blanding af isomeren med den højere R_f-værdi, der er hovedisomeren) opløses i 5 ml absolut ethanol, og herefter bobles ammoniak gennem den isafkølede opløsning i et 20 mm x 12 cm Carius-rør i 3 minutter. Røret forsegles,
30 og isbadet fjernes. Efter 15 timer ved stuetemperatur åbnes røret, og opløsningen indampes. Remanensen opløses i 2 ml methanol, hvorefter der chromatograferes på en 20 mm x 12 cm flash-silikagelkolonne. Der elueres med ethylacetat, efterfulgt af 10% methanol/90% ethylacetat. De fraktioner,
35 der indeholder materiale med en R_f-værdi på 0,23 (10% methanol/90% ethylacetat) samles og indampes, hvorved fås 30 mg

af produktet. Der tritureres herefter i 12 mg methanol, hvorefter det faste stof filtreres fra. Produktet tørres under vakuum, hvorved fås 16 mg af titelforbindelsen (et gråhvidt pulver). NMR indikerer en 4:1 blanding mellem E-

5 -isomeren og Z-isomeren.

¹H-NMR (E-isomer CD₃OD 300MHz): δ 5,03-5,07 (2H, m) 6,21 (1H, d, J=6,3), 7,02 (1H, d, J=78,6), 8,20 (1H, s), 8,32 (1H, s).

10

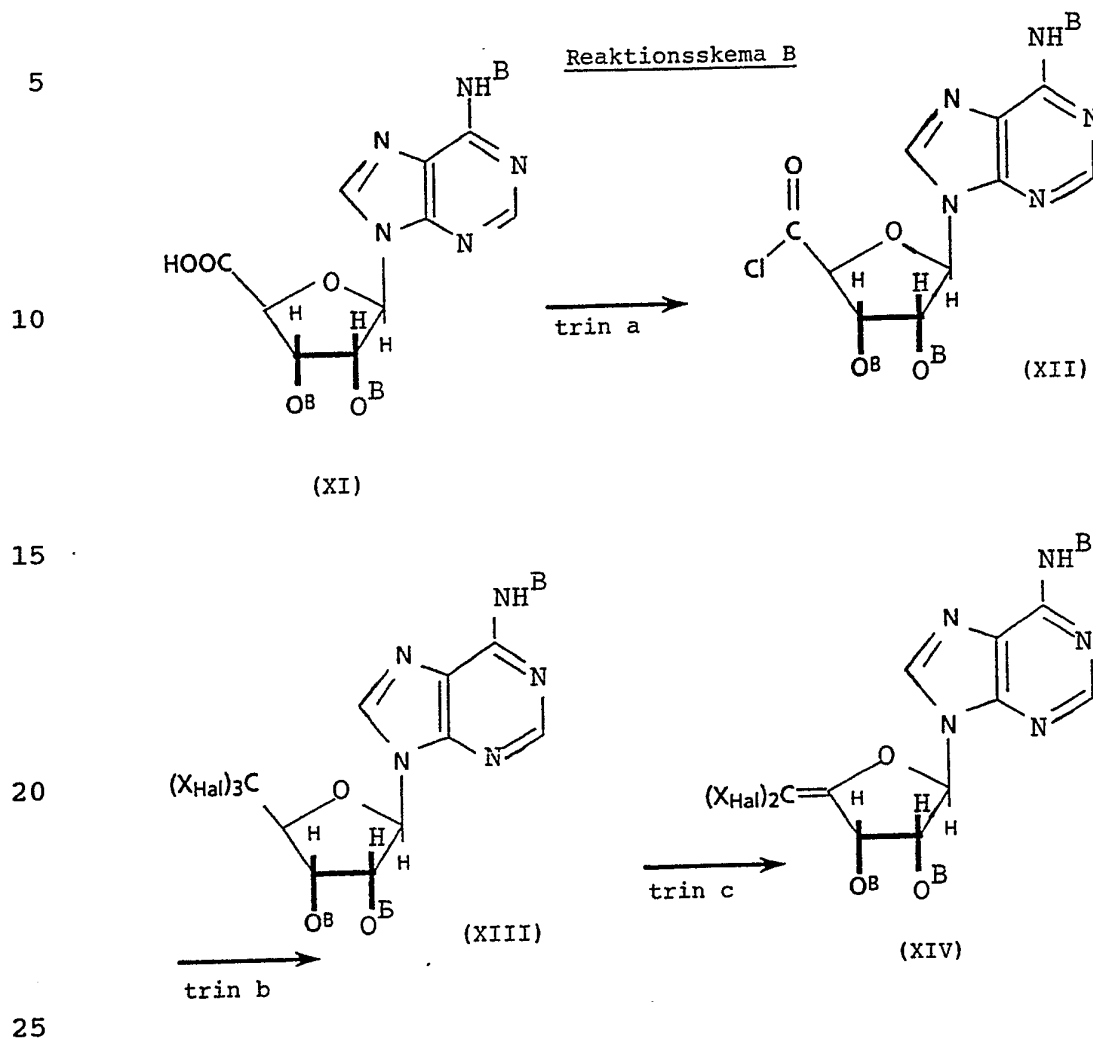
¹⁹F-NMR (E-isomer, CD₃OD, 282 MHz, ppm fra ext. CFCl₃):- 182,30 (d, J=78,5).

MS: (CI) mH+=268.

15

Adenosin-derivaterne med formlen I, hvori X₁ og X₂ begge betyder halogen, kan fremstilles i overensstemmelse med konventionelle fremgangsmåder og teknikker, hvilke er kendte og påskønnede af fagfolk. En almen syntese fremgangsmåde er anført i reaktionsskema B.

20

Reaktionsskema B

I trin a omdannes carboxylsyrederivatet XI, i hvilket amino- og hydroxygrupperne er blokeret på en måde, der er analog med den, der er beskrevet i reaktionsskema A, til syrechloridet XII. Det foretrukne reagens til denne omsætning er SOCl_2 . Carboxylsyrederivatet XI kan fremstilles ved oxidation af den tilsvarende alkohol i overensstemmelse med den metode, der er beskrevet af Harmon et al. [Chem. Ind. (London) 1141 (1969)].

Syrechlorid-derivatet XII omdannes herefter til trihalogenderivatet XIII. For at opnå trifluor-derivatet kan

XII f.eks. omsættes med phenylsvovl-trifluorid i 1,1,2-trichlor-1,2,2-trifluorethan. For at opnå trichlor-derivatet XIII kan XII omsættes med phosphorpentachlorid eller andre af fagfolk kendte og påskønnede reagenser.

- 5 I trin c omdannes trihalogenid-derivatet XIII (dvs. " $(X_{Hal})_3C$ ") til det 5',5'-di-halogen-4',5'-umættede derivat XIV ved en omsætning, der er analog med den, der er beskrevet i reaktionsskema A (trin d). Det foretrukne reagens til trin c er kalium-tert.butoxid i dimethylsulfoxid.

- 10 Amino- og hydroxyblokeringsgrupperne kan herefter fjernes på en måde, der er analog med den, der er beskrevet i reaktionsskema A (trinnene e, f og g).

Udgangsmaterialet, der anvendes ved den almene syntese-fremgangsmåde, der er anført i reaktionsskema B, er let tilgængeligt for fagfolk og kan fremstilles som beskrevet i Het. Chem., 14, 195 (1977)

Det følgende eksempel viser en syntese som den er beskrevet i reaktionsskema B.

20 Eksempel 2.

4',5'-Didehydro-5'-deoxy-5',5'-difluoradenosin

Trinnene a og b: 2',3'-O-Isopropyliden-5'-deoxy-5',5',5'-trifluoradenosin

- 3,32 g (0,02 mol) phenylsvovl-trifluorid (der er fremstillet som det er beskrevet af Sheppard, JACS 84, 3058 (1962)] bringes sammen med 3,25 g (0,01 mol) af syrechloridet af 2',3'-O-isopropylidenadenosin-5'-carboxylsyre [der er fremstillet, som det er beskrevet i Nucleic Acid Chemistry, Ed.: Townsend and Tipson, John Wiley, 1978, side 701] i 30 ml 1,1,2-trichlor-1,2,2-trifluorethan, og blandingen varmes natten over ved 120°C. Hertil sættes chloroform, og blandingen hældes over i isvand. Blandingens ekstraheres herefter med en vandig natriumbicarbonatopløsning. Det organiske lag inddampes hvorved fås det rå produkt, og dette chromatograferes herefter på en flash-silikagel med ethylacetat/methanol, hvorved fås titelforbindelsen.

Trin c: 4',5'-didehydro-2',3'-O-isopropyliden-5'-deoxy-5',5'-difluoradenosin

Til 300 mg (0,9 mmol) 2',3'-O-isopropyliden-5'-deoxy-5',5',5'-trifluoradenosin og 410 mg (4 ækvivalenter) kalium-
 5 -tert.butoxid sættes 2 ml dimethylsulfoxid, og blandingen omrøres herefter under nitrogen. Reaktionen stoppes med vand, hvorefter der ekstraheres med ethylacetat, hvorved der fås det rå produkt. Det rå produkt chromatograferes på en silikagel med ethylacetat, hvorved fås titelforbindelsen.

10

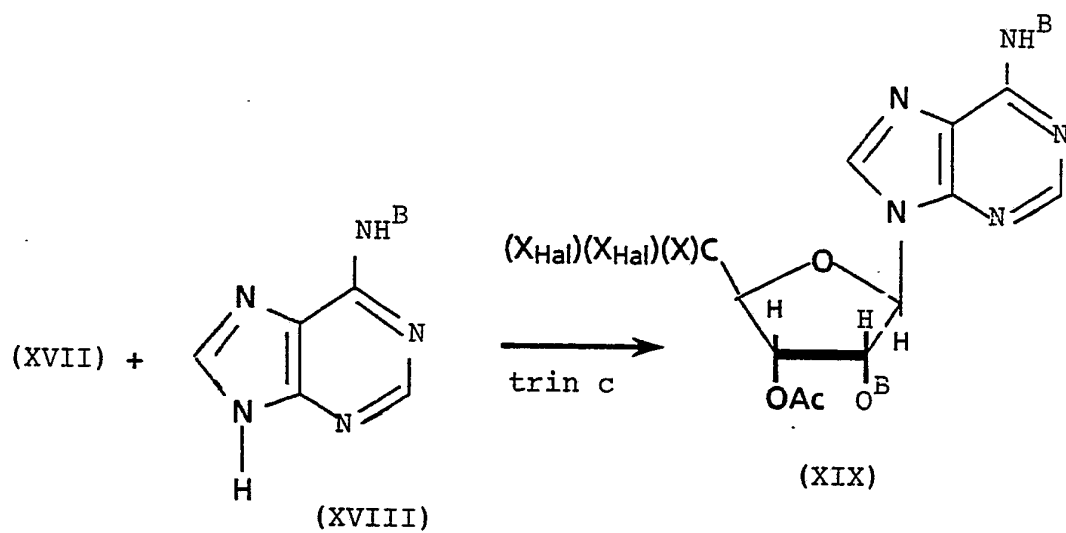
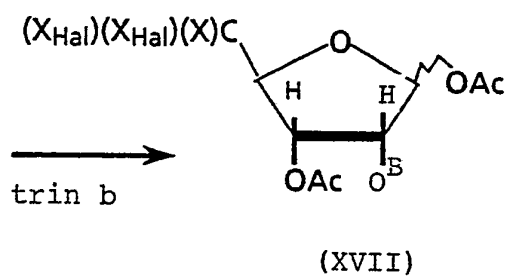
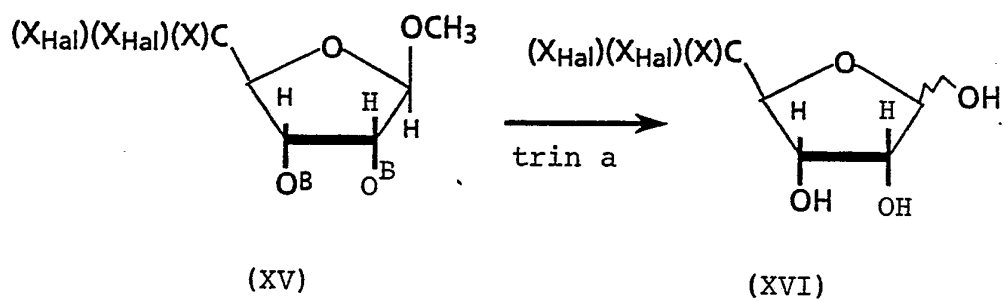
Afblokering: 4',5'-didehydro-5'-deoxy-5',5'-difluoradenosin

100 mg 4',5'-didehydro-2',3'-O-isopropyliden-5'-deoxy-5',5'-difluoradenosin behandles med 2 ml trifluoreddikesyre/vand (4:1) i 1 time, hvorefter opløsningsmidlet indampes.
 15 Der chromatograferes herefter på en silikagel med ethylacetat/methanol, hvorved fås 60 mg af titelforbindelsen.

^1H NMR (DMSO- d_6 , ethanol-toppe udeladt) δ 4,03-4,12 (m, 1H), 4,36 (m, 1H), 4,77 (q, 1H, $J = 6$ Hz), 5,67 (d, 1H, $J =$
 20 5,1 Hz, OH), 5,70 (d, 1H, $J = 6,3$ Hz, OH), 6,13 (d, 1H, $J = 6,3$ Hz), 6,31 (td, 1H, $J = 5,3$ og 4,7 Hz), 7,34 (bs, 2H, NH_2), 8,16 (s, 1H), 8,32 (s, 1H);

^{19}F NMR (DMSO- d_6) -125,9 (ddd, $J = 9,3, 55,1$, og 291,2 Hz),
 25 -127,2 (ddd, $J = 9,9, 54,9$ og 291,2 Hz).

En alternativ fremgangsmåde til fremstilling af adenosin-derivater med formlen I, hvori én eller begge af X_1 og X_2 betyder halogen, er anført i reaktionsskema C. Denne
 30 fremgangsmåde involverer særskilt fremstilling af adenosylbasen og ribosyldelene, hvorefter der gennemføres en kondensation af de pågældende dele.

Reaktionsskema C

Di- eller tri-halogensubstituerede ribosyl-derivater XV fremstilles i overensstemmelse med standardteknikker og fremgangsmåder, der er kendte og påskønnede af fagfolk. F.eks. kan disse forbindelser fremstilles ved hjælp af fremgangsmåder der er analoge med den, der er beskrevet af Sharma et al. (Tet. Lett. 1977, 3433) til fremstillingen af methyl-5-deoxy-5,5-difluor-2,3-isopropylidenribose.

Disse derivater XV hydrolyseres i trin a under anvendelse af en syre, såsom eddikesyre. Dihydrolyserede derivater XVI omdannes efterfølgende til de tilsvarende eddikesyre-estere XVII i trin b ved omsætning med eddikesyreanhydrid i pyridin.

Fremgangsmåder til dannelse af adenin-derivatet XVIII involverer også standardteknikker og fremgangsmåder, der er kendte og påskønnede af fagfolk.

Eddikesyreesteren XVII kan kondenseres med det passende adenin-derivat XVIII ved en fusionsreaktion eller ved en kondensationsreaktion i nærværelse af bis-trimethylsilyl-acetamid og en Lewis-syre, såsom trimethylsilyltrifluor-methansulfonat.

Det kondenserede produkt XIX kan herefter afblokeres ved hjælp af hydrolyse, og herefter passende blokeres som beskrevet i reaktionsskema A (trin a), hvorefter det yderligere kan omsættes til tilvejebringelse af forbindelser med den almene formel I som beskrevet i reaktionsskema A (trinnene d til g).

Udgangsmaterialer, der anvendes ved den almene syntesefremgangsmåde, der er anført i reaktionsskema C, er let tilgængelige for fagfolk.

I følgende eksempel vises en typisk syntese, som den er beskrevet ved hjælp af reaktionsskema C.

Eksempel 3.N⁶,N⁶-Bisbenzoyl-5'-deoxy-5',5'-difluor-2',3'-O-isopropylidenadenosin

- 5 Trin a og b: 5-deoxy-5,5-difluorribose og 5-deoxy-5,5-difluor-1,2,3-tri-O-acetylribose

1,12 g (5 mmol) methyl-5-deoxy-5,5-difluor-2,3-isopropylidenribose, der er fremstillet som det er beskrevet af Sharma et al., Tet. Lett. 1977, 3433-3436), opløses i 5
10 ml 80%'s eddikesyre, hvorefter blandingen opvarmes ved 80°C i 4 timer, hvorefter der omrøres natten over ved stuetemperatur. Opløsningsmidlet inddampes, hvorefter der tilsættes toluen, og blandingen inddampes igen, hvorved fås 5-deoxy-5,5-difluorribose. Til remanensen sættes 2,55 ml (2 mmol)
15 eddikesyreanhydrid og 10 ml pyridin, hvorefter blandingen omrøres natten over. Blandingen underkastes vandig oparbejdning, hvorefter der chromatograferes på en flash-silikagel (cyclohexan/dichlormethan), hvorved der fås 5-deoxy-5,5-difluor-1,2,3-tri-O-acetylribose.

20

Trin c: N⁶-Benzoyl-5'-deoxy-5',5'-difluor-2',3'-O-acetyladenosin

Til 1,06 g (4,4 mmol) N-benzoyladenin i 30 ml af acetonitril sættes 3,2 ml (13 mmol) bis-trimethylsilylac-
25 amid. Blandingen varmes i 0,5 time ved tilbagesvaling. Herefter afkøles blandingen, og der tilsættes 1,00 g (3,4 mmol) 5-deoxy-5,5-difluor-1,2,3-tri-O-acetylribose efterfulgt af 1,5 ml trimethylsilyltrifluormethansulfonat. Herefter tilbagesvales blandingen i 5 timer, hvorefter den afkøles, og
30 den hældes over i en mættet natriumbicarbonatopløsning. Produktet ekstraheres over i chloroform, hvorefter der tørres og inddampes, hvorved der fås det rå produkt. Produktet chromatograferes på en flash-silikagel, hvorved der fås titelforbindelsen.

Afblokering: 5'-deoxy-5',5'-difluoradenosin

- Til 700 mg (1,5 mmol) N⁶-benzoyl-5'-deoxy-5',5'-difluor-2',3'-O-acetyladenosin i 20 ml ethanol i et Carius-rør sættes gasformig ammoniak, medens der afkøles i is.
- 5 Røret forsegles, hvorefter det tillades at henstå natten over. Herefter åbnes røret, og opløsningsmidlet indampes. Produktet chromatograferes herefter på en flash-silikagel (ethylacetat/methanol), hvorved der fås titelforbindelsen.

10 Blokering: 5'-deoxy-5',5'-difluor-2',3'-O-isopropylidenadenosin

- Til 300 mg (1 mmol) 5'-deoxy-5',5'-difluoradenosin i 3 ml acetone, der indeholder 215 mg (1,1 mmol) p-toluensulfonsyre-monohydrat, sættes 0,65 ml (4 mmol) ethyl-orthoformiat under omrøring. Blandingen omrøres i 2 timer, hvorefter den neutraliseres med fortyndet ammoniumhydroxid. Blandingen deles mellem vand og chloroform, hvorefter chloroformen indampes. Produktet chromatograferes herefter på en flash-silikagel (ethylacetat/methanol), hvorved fås titelforbindelsen.
- 20

Blokering: N⁶,N⁶-Bis-benzoyl-5'-deoxy-5',5'-difluor-2',3'-O-isopropylidenadenosin

- Til 160 mg 5'-deoxy-5',5'-difluor-2',3'-O-isopropylidenadenosin i 1 ml pyridin sættes 0,17 ml benzoylchlorid, hvorefter blandingen omrøres natten over. Blandingen deles mellem vand og chloroform. Chloroformen indampes, og reamensen chromatograferes på en flash-silikagel, hvorved fås titelforbindelsen.
- 25

- 30 Den yderligere oparbejdning af titelforbindelsen til opnåelse af forbindelserne med formen IX og X er beskrevet i reaktionsskema A.

Forbindelserne med formlen I menes at udøve deres inhiberende virkning på AdoMet-afhængig transmethylering ved inhibering af AdoHcy-hydrolase, hvorved der tilvejebringes en forøgelse af AdoHcy's vævsniveauer, der igen fremkalder feedback-inhibering af AdoMet-afhængig transmethylering. Det skal imidlertid forstås, at den foreliggende opfindelse ikke er begrænset af nogen særlig teori eller foreslået mekanisme, der skal forklare opfindelsens effektivitet ved en slutanvendelse.

10 Som det vides af fagfolk er forskellige sygdomstilstande, såsom visse neoplastiske sygdomstilstande og virale infektioner, karakteriserede ved kraftig AdoMet-afhængig transmethyleringsaktivitet. Som det anvendes heri betyder betegnelsen "kraftig" et aktivitetsniveau, der tillader
15 sygdomstilstanden at skride fremad.

Betegnelsen "neoplastisk sygdomstilstand", som den anvendes heri, refererer til en unormal tilstand eller forfatning, der er karakteriseret ved en cellevækst med meget hurtig formering eller neoplasma. Neoplastiske sygdomstilstande, der er karakteriserede ved en kraftig AdoMet-afhængig transmethyleringsaktivitet, og mod hvilke behandling med en forbindelse med formlen I vil være særlig anvendelig, omfatter: leukæmier, såsom akut lymfoblastleukæmi, kronisk lymfocyt-leukæmi, akut myeloblastleukæmi og kronisk myelocyt-
20 leukæmi; carcinomaer, såsom de i cervix, oesophagus, maven, tyndtarmen, colon og lunger; sarcomaer, såsom osteosarcoma, osteosarcoma, liposarcoma, hemangioma og hemangiosarcoma; melanomaer, herunder amelanotisk melanoma og melanotisk melanoma; og blandede typer af neoplasiaer, såsom carcinosarcoma, lymfoid vævstype, follicular reticulum, cel-
25 lesarcoma og Hodgkins sygdom.

En terapeutisk effektiv antineoplastisk mængde af en forbindelse med formlen I refererer til en mængde, der effektivt styrer væksten af neoplasmaen eller forlænger patientens
35 overlevelse ud over hvad der forventes i fravær af en sådan behandling, ved indgivelse af enkelt dosis eller ved ind-

givelse af en dosis flere gange til patienten. Som det anvendes heri betyder "styring af væksten" af neoplasmaen at væksten og metastaser sænkes, afbrydes, bremses eller stoppes, og det indikerer ikke nødvendigvis en samlet eliminering
5 af neoplasmaen.

En viral infektion, som er karakteriseret ved en kraftig AdoMet-afhængig transmetyleringsaktivitet, kan behandles ved indgivelse af en terapeutisk effektiv antiviral mængde af en forbindelse med formlen I. Betegnelsen "viral
10 infektion", der anvendes heri, refererer til en unormal tilstand eller forfatning, der er karakteriseret ved viral transformation af celler, viral replikation og formering. Virale infektioner, der er karakteriserede ved en kraftig AdoMet-afhængig transmetyleringsaktivitet, og mod hvilke
15 behandling med en forbindelse med formlen I vil være særlig anvendelig, omfatter: retrovira, såsom HTLV-I, HTLV-II, human immunodefekt vira, HTLV-III (AIDS-virus) og lignende; RNA-vira, såsom influenza type A, B og C, fåresyge, mæslinger, rhinovirus, dengue-feber, røde hunde, rabies, hepatitis virus A, encephalitis virus og lignende; DNA-vira,
20 såsom herpes, vaccinia, pappilomavirus (vorte), hepatitis virus B og lignende.

En terapeutisk effektiv antiviral mængde af en forbindelse med formlen I refererer til en mængde, der effektivt
25 kontrollerer virusen. Denne virale kontrol betyder at den virale transformation af celler eller replikationen og formeringen af virus sænkes, afbrydes, bremses eller stoppes, og det indikerer ikke nødvendigvis en fuldstændig eliminering af virus.

30 En terapeutisk effektiv dosis kan let bestemmes af den behandlende læge som fagmand, under anvendelse af konventionelle teknikker og ved at iagttage de resultater, der er opnået under analoge forhold. Ved bestemmelsen af den terapeutiske effektive dosis skal den udøvende diagnostiker tage
35 hensyn til et antal faktorer, herunder: arten af pattedyr; dets størrelse, alder og almene sundhedstilstand; den speci-

fikke sygdom, der er involveret; graden eller alvoren af sygdommen; den individuelle patients svar; den særlige forbindelse, der indgives; indgivelsesmåden; det indgivende præparats biotilgængelighedskarakteristika; det valgte doseringssystem, anvendelsen af ledsagende medicinbehandling og andre relevante omstændigheder.

En terapeutisk effektiv mængde af en forbindelse med formelen I forventes at variere fra ca. 0,1 mg pr. kg kropsvægt pr. dag (mg/kg/dag) til ca. 100 mg/kg/dag. Foretrukne mængder forventes at variere fra ca. 0,5 til ca. 10 mg pr. kg pr. dag.

Ved behandling af en neoplastisk sygdomstilstand eller en viral infektion kan en terapeutisk effektiv anti-neoplastisk eller antiviral mængde af en forbindelse med formelen I indgives sammen med en terapeutisk effektiv inhiberende mængde af en adenosindeaminase (ADA)-inhibitor. Betegnelsen "sammen med" angår indgivelse af I sammen med en ADA-inhibitor på i det væsentlige den samme tid, eller behandling af en patient med en ADA-inhibitor før eller efter behandling med en forbindelse med formelen I. En terapeutisk effektiv inhiberende mængde af en ADA-inhibitor er en mængde, der effektivt kan inhibere ADA hos patienten signifikant.

ADA deaminerer forbindelser med formelen I og nedbryder derved de aktive forbindelser til relativt ikke-aktive metaboliter. Når en forbindelse med formelen I og en ADA-inhibitor indgives sammen, vil dosen være mindre i mængde eller i indgivelsesfrekvens end den, der er nødvendig når en forbindelse med formelen I indgives alene.

Forskellige farmaceutisk acceptable ikke-toksiske ADA-inhibitorer kan anvendes, herunder deoxycoformycin. En terapeutisk effektiv inhiberende mængde af ADA-inhibitoren varierer fra ca. 0,05 mg pr. kg pr. dag til ca. 0,5 mg pr. kg pr. dag, og fortrinsvis fra ca. 0,1 mg pr. kg pr. dag til ca. 0,3 mg pr. kg pr. dag. Deoxycoformycin er den ADA-inhibitor, der foretrækkes ved anvendelse til terapi sammen

med forbindelser med formlen I.

Ved udførelsen af behandlingen af en patient, der lider af en ovenfor beskrevet sygdomstilstand, kan en forbindelse med formlen I indgives på enhver form eller måde, der gør forbindelsen biotilgængelig i effektive mængder, herunder orale og parenterale veje. F.eks. kan forbindelser med formlen I indgives oralt, subcutant, intramuskulært, intravenøst, transdermalt, intranasalt, rektalt og lignende. Oral indgivelse foretrækkes i almindelighed. Fagfolk inden for fremstilling af præparater kan let udvælge den egnede indgivelsesform og -måde, afhængigt af de særlige karakteristika for den valgte forbindelse og den sygdomstilstand, der skal behandles, sygdommens stadie og andre relevante omstændigheder.

Forbindelserne kan indgives alene eller i form af et farmaceutisk præparat i kombination med farmaceutisk acceptable bærerstoffer eller excipienter, hvor blandingsforholdet og naturen heraf bestemmes af den valgte forbindelses opløselighed og kemiske egenskaber, den valgte indgivelsesvej og gængs farmaceutisk praksis. Yderligere kan forbindelser med formlen I indgives som ovenfor yderligere i kombination med en ADA-inhibitor. Forbindelserne ifølge opfindelsen kan have form af farmaceutisk acceptable syreadditionssalte af hensyn til stabilitet, evnen til at krystallisere, forøget opløselighed og lignende.

Den foreliggende opfindelse angår som nævnt også et farmaceutisk præparat, der indeholder en terapeutisk effektiv mængde af en forbindelse med formlen I. Forbindelsen kan være blandet med eller på anden måde være i forbindelse med ét eller flere farmaceutisk acceptable bærerstoffer eller excipienter. Det farmaceutiske præparat, der indeholder en terapeutisk effektiv mængde af en forbindelse med formlen I, kan indeholde en terapeutisk effektiv ADA-inhiberende mængde af en ADA-inhibitor i sammenblanding med eller på anden måde i forbindelse med ét eller flere farmaceutisk acceptable bærerstoffer eller excipienter. Betegnelsen "tera-

peutiske effektive mængder", som den anvendes i forbindelse med forbindelser med formlen I, refererer til effektive inhiberende, antineoplastiske eller antivirale mængder som det er passende.

5 De farmaceutiske præparater fremstilles på en inden for farmacien kendt måde. Bærestoffet eller excipienten kan være et fast materiale, et semi-fast materiale eller en væske, der kan tjene som et bærestof eller medie for den aktive komponent. Egnede bærerstoffer eller excipienter er
10 kendte af fagfolk. Det farmaceutiske præparat kan tilpasses oral eller parenteral anvendelse, og det kan indgives til patienten i form af tabletter, kapsler, stikpiller, opløsninger, suspensioner eller lignende.

Forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse
15 kan indgives oralt, f.eks. med et indifferent fortyndingsmiddel eller med et spiseligt bærerstof. De kan være indesluttede i gelatinekapsler eller sammenpressede i tabletter. Med hensyn til oral terapeutisk indgivelse kan forbindelserne være inkorporeret med excipienter og anvendt i form af ta-
20 bletter, pastiller, kapsler, eliksirer, suspensioner, sirupper, vafler, tyggegummier og lignende. Disse præparater bør indeholde mindst 4% af forbindelsen ifølge opfindelsen, den aktive komponent, men det kan variere afhængigt af den særlige form, og mængden kan passende være mellem ca. 4
25 vægtprocent til ca. 70 vægtprocent af enhedens vægt. Den mængde af forbindelsen, der er til stede i præparaterne, er således, at der opnås en egnet dosering. Foretrukne sammensætninger og præparater ifølge den foreliggende opfindelse fremstilles således, at en oral doseringsenhedsform indehol-
30 der mellem 5,0 til 300 mg af en forbindelse ifølge opfindelsen.

Tabletter, piller, kapsler, pastiller og lignende kan også indeholde et eller flere af de følgende hjælpemidler:

35 bindemidler, såsom mikrokrySTALLINSK cellulose, traganth gummi eller gelatine; excipienter, såsom stivelse eller

lactose, desintegreringsmidler, såsom alginsyre, Primogel, majsstivelse og lignende; smøremidler, såsom magnesiumstearat eller Sterotex; glidemidler, såsom kolloidt siliciumdioxid; og sødemidler, såsom saccharose eller saccharin, kan tilsæt-
5 tes, eller et smagsstof, såsom pebermynte, methylsalicylat eller orangesmag. Når doseringsenhedsformen er en kapsel kan den foruden materialer af den ovenfor nævnte type indeholde et væskeformigt bærestof, såsom polyethylenglycol eller en fed olie. Andre doseringsenhedsformer kan indeholde
10 andre forskellige materialer, der ændrer doseringsenhedens fysiske form, f.eks. overtrækninger. Tabletter eller piller kan således være overtrukne med sukker, shellak eller andre enteriske overtrækningsmidler. En sirup kan foruden de foreliggende forbindelser indeholde saccharose som et sødemiddel
15 og visse konserveringsstoffer, farvestoffer og smagsstoffer. De materialer, der anvendes til fremstilling af disse forskellige præparater, bør være farmaceutisk rene og ikke-toksiske i de mængder, der anvendes.

Med hensyn til parenteral terapeutisk indgivelse kan
20 forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse være inkorporeret i en opløsning eller suspension. Disse præparater bør indeholde mindst 0,1% af en forbindelse ifølge opfindelsen, men det kan varieres til at være mellem 0,1 og ca. 50 vægtprocent deraf. Mængden af den foreliggende forbindelse
25 ifølge opfindelsen i sådanne præparater er således, at der opnås en egnet dosering. Foretrukne sammensætninger og præparater ifølge den foreliggende opfindelse fremstilles således, at en parenteral doseringsenhed indeholder mellem 5,0 til 100 mg af forbindelsen ifølge opfindelsen.

30 Opløsningerne eller suspensionerne kan også omfatte ét eller flere af de følgende hjælpemidler: sterile fortyndingsmidler, såsom vand til injektion, en saltvandsopløsning, ikke-flygtige olier, polyethylenglycoler, glycerol, propylen-glycol eller andre syntetiske opløsningsmidler; antibak-
35 terielle midler, såsom benzylalkohol eller methylparaben; antioxidanter, såsom ascorbinsyre eller natriumbisulfit;

cheleringsmidler, såsom ethylendiamintetraeddikesyre; puffer, såsom acetater, citrater eller phosphater, og midler til regulering af toniciteten, såsom natriumchlorid eller dextrose. Det parenterale præparat kan være indesluttet i
5 ampuller, éngangssprøjter eller multidosishætteflasker, der er fremstillet af glas eller plastik.

Ethvert af de ovenfor beskrevne farmaceutisk præparater, der indeholder forbindelser med formlen I kan også indeholde en terapeutisk effektiv inhiberende mængde af en
10 ADA-inhibitor i sammenblanding eller på anden måde i forbindelse med de ovenfor beskrevne komponenter.

Som med enhver gruppe af strukturelt beslægtede forbindelser, der udviser en særlig generisk anvendelse, er visse grupper og konfigurationer for forbindelserne med
15 formlen I foretrukne til slutanvendelsen heraf.

Med hensyn til substituenterne X_1 og X_2 foretrækkes i almindelighed forbindelser, hvori én af X_1 og X_2 betyder fluor, og den anden betyder hydrogen. Forbindelsen hvori X_1 betyder fluor og X_2 betyder hydrogen er især foretrukket.

S-Adenosyl-L-homocystein-hydrolase-(SAH)-inhiberende aktivitet.

Kinetiske data for inhibering af SAH-hydrolase bestemmes for forbindelser ifølge opfindelsen. K_i og K_{inact} beregnes for de forbindelser, der udviser tidsafhængig inhibering (forbindelse A og B). K_i beregnes for de forbindelser, der udviser reversibel inhibering.

Muselever-SAH-hydrolase-bestemmelse:

SAH-hydrolase oprenses delvis fra muselever og bestemmes i syntese-retningen, idet væsentlige som beskrevet af Ragione og Pegg, Biochem. J. 210, 429 (1983). Delvis rensed SAH-hydrolase forinkuberes med forskellige koncentrationer af forbindelsen, der skal undersøges. På forskellige tidspunkter udtages portioner og undersøges for enzymaktivitet ved anvendelse af $[2-^3H]$ -adenosin og L-homocystein som substrater. Kinetiske konstanter for tidsafhængige inhibitorer bestemmes ved metoden ifølge Kitz og Wilson, J. Biol. Chem. 237, 3245 (1962).

Rottelever-SAH-hydrolase-bestemmelse:

SAH-hydrolase oprenses fra rottelever, i det væsentlige som beskrevet af Fujioka og Takata, J. Biol. Chem. 256, 1631 (1981) og bestemmes i hydrolyse-retningen ved kontinuerlig overvågning i nærværelse af substrat og inhibitor. Dannelsen af L-homocystein følges spektrofotometrisk, i det væsentlige som beskrevet af Wolfson et al., J. Biol. Chem. 261, 4492 (1986). For tidsafhængige inhibitorer tilpasses kurveforløbene til eksponentialfunktioner, og der beregnes pseudo-førsteordens-hastighedskonstanter (k_{obs}) ved forskellige inhibitorkoncentrationer. K_i og k_{inact} fås ud fra et plot af $1/k_{obs}$ mod $1/[inhibitor]$. For reversible inhibitorer bestemmes K_i ud fra begyndelsesreaktionshastighederne i nærværelse af varierende koncentrationer af inhibatoren og under anvendelse af en korrektion for substratkoncentrationen i forhold til K_m .

Antiviral/antiproliferativ aktivitet.

Antiretroviral aktivitet vurderes ved XC-plaque-bestemmelsen under anvendelse af Moloney-leukæmivirus (MoLV) som model for human immundefekt-virus (HIV), i det væsentlige som beskrevet af Bowlin og Proffitt, J. Interferon Res. 3, 19 (1983). Den minimale hæmmende koncentration for en 50%'-reduktion af cytopatiske effekter (IC₅₀) af Moloney-leukæmivirus bestemmes. IC₅₀-resultaterne er anført i tabel 1.

Den antivirale effekt af forbindelse A vurderes også mod Friend-leukæmivirus in vivo i en serie på 3 undersøgelser. Resultaterne af disse undersøgelser er vist i tabel 2. CDF1-Hanmus anbringes i en af 3 eller 4 behandlingsgrupper og behandles i 14 dage på følgende måde:

1. Kontrol - dyrene udsættes ikke for Friend-leukæmivirus.

2. Virus-kontrol - dyrene inficeres på dag 0 ved intravenøs injektion af 0,2 ml miltsuspension inficeret med Friend-leukæmivirus (1:50.000, vægt/volumen).

3. Virus + forbindelse A (1,0 mg/kg) - dyrene inficeres med Friend-leukæmivirus som beskrevet for gruppe 2, og forbindelse A (1,0 mg/kg i.p.) indgives fra dag 1 til dag 10.

4. Virus + AZT (100 mg/kg) - dyrene inficeres med Friend-leukæmivirus som beskrevet for gruppe 2, og AZT (3'-azido-3'-deoxy-thymidin (100 mg/kg i.p.) indgives fra dag 1 til dag 10.

På dag 14 aflives dyrene, og miltene vejes. Ved denne forsøgsudformning svarer miltvægten til den virale aktivitet (se Friend, J. Exp. Med. 105, 307-316 (1957)). Som vist i tabel 2 medfører behandling af virusinficerede mus med forbindelse nr. A en statistisk signifikant nedsættelse af miltvægten. Dette resultat viser, at behandling af virusinficerede mus med forbindelse A medfører en nedsættelse af virusaktiviteten in vivo.

Desuden vurderes forbindelse A mod vaccinia-virus (IC₅₀: 0,03 µM), herpes I-virus (IC₅₀: 10 µg/ml) og for antiproliferativ aktivitet mod HeLa-celler (IC₅₀: 1 µg/ml).

Tabel 1: Kinetiske konstanter og IC₅₀-værdier mod MoLV

Forb.	Tidsafhængig inhibering	Muselever-SAH- -hydrolase ^{a)}		Rottelever-SAH- -hydrolase ^{b)}			IC ₅₀ (µg/ml)
		K _I (µM)	kinact (min ⁻¹)	K _I (µM)	kinact (min ⁻¹)	K _i ^{c)} (µM)	
A	ja	0,55	0,28	6,5	0,8	N.A.	0,05
B	ja	1,04	0,23	2,4	0,14	N.A.	0,25
C	nej	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1,6	3,3
D	nej	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	3,0	1,3
E	nej	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1,5	0,1

a) bestemt i synteseretningen

b) bestemt i hydrolyseretningen

c) K_i for kompetitiv inhibering med rottelever-SAH

A = (Z)-4',5'-didehydro-5'-deoxy-5'-fluoradenosin

B = (E)-4',5'-didehydro-5'-deoxy-5'-fluoradenosin

C = (Z)-4',5'-didehydro-5'-deoxy-5'-chloradenosin

D = (E)-4',5'-didehydro-5'-deoxy-5'-chlor-5'-fluoradenosin

E = (Z)-4',5'-didehydro-5'-deoxy-5'-chlor-5'-fluoradenosin

N.A. = ikke bestemt

Tabel 2ANTI-VIRAL EFFEKT AF FORBINDELSE A^d)

		Miltvægt (g, ± standardafvigelse) ^{a)}		
		Forsøg I (n = 5)	Forsøg II (n = 10)	Forsøg III (n = 10)
5				
10	Kontrol (intet virus)	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,01
	Virus	0,80 ± 0,35	0,27 ± 0,08	0,42 ± 0,14
15	Virus + for- bindelse A (1,0 mg/kg)	0,31 ± 0,04 ^{a)}	0,28 ± 0,11	0,31 ± 0,06 ^{b)}
20	Virus + AZT (100 mg/kg)	NT ^{c)}	0,23 ± 0,04	0,30 ± 0,04 ^{b)}

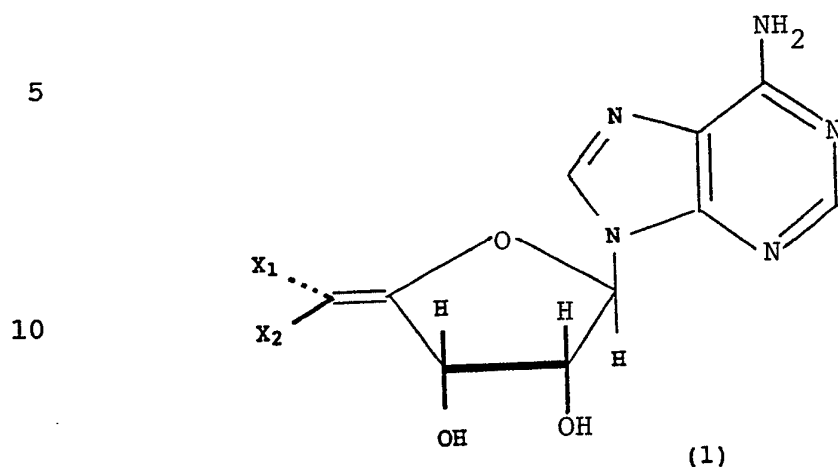
a) $p < 0,001$ b) $p < 0,05$

25 c) ikke testet

d) (Z)-4',5'-didehydro-5'-deoxy-5'-fluoradenosin

P a t e n t k r a v .

1. Adenosin-derivat med formlen



hvor

15 X_1 og X_2 uafhængigt af hinanden betyder hydrogen eller halogen, med det forbehold, at mindst én af X_1 og X_2 altid betyder et halogenatom,

eller et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt heraf.

2. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
20 ved, at X_1 betyder fluor, og X_2 betyder hydrogen.

3. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at X_2 betyder fluor, og X_1 betyder hydrogen.

4. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at X_1 og X_2 begge betyder fluor.

25 5. Farmaceutisk præparat, k e n d e t e g n e t
ved, at det indeholder en effektiv mængde af en forbindelse ifølge krav 1.