

PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN NUKLEOZID-SZÁRMAZÉKOK

Kivonat

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány új (I) általános képletű, a ribofuranozil-csoport 4' és 5' helyzetű szénatomján helyettesített pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid-származékokra és alkalmazásukra vonatkozik.

Az (I) általános képletben

- A jelentése oxigén- vagy kénatom vagy metiléncsoport;
X jelentése hidrogénatom, amino- vagy hidroxicssoport;
Y jelentése hidrogénatom, halogénatom vagy aminocsoport;
Z jelentése hidrogén- vagy halogénatom vagy $-R$, $-OH$, $-OR$, $-SH$, $-SR$, $-NH_2$, $-NHR$, $-NR_2$, $-CN$, $-C(O)NH_2$, $-COOH$, $-COOR$, $-CH_2NH_2$, $-C(=NOH)NH_2$ vagy $-C(=NH)NH_2$ képletű csoport, ahol R jelentése alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport,
 R_2 és R_3 jelentése egymástól függetlenül hidrogén- vagy fluoratom vagy hidroxicssoport;
 R_4 jelentése hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport, ahol R_4 adott esetben heteroatomot és/vagy funkciós csoportot tartalmaz;
 R_5 jelentése hidroxicssoport, $-OP(O)(OH)_2$, $-P(O)(OH)_2$ képletű vagy $-OP(O)(OR')_2$ vagy $-P(O)(OR')_2$ általános képletű csoport, és
 R' jelentése védőcsoport,
 R_5' jelentése alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport, ahol R_5' legalább két szénatomot tartalmaz és adott esetben heteroatomot és/vagy funkciós csoportot tartalmaz.

A vegyületek többek között rákellenes és immunmódosító hatással rendelkeznek, citotoxikus hatásuk azonban kisebb mértékű, mint az ismert nukleozid-származékoké.

felhasználás: (I) 

~~96297-9353a-MR/JG~~

03-VII-08

Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Budapest

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

PIRROLO[2,3-D]PIRIMIDIN NUKLEOZID-SZÁRMAZÉKOK

Nukleozid-származékokat régóta használnak antimetabolitokként rákos megbetegedések és vírusfertőzések kezelésére. A nukleozid-származékok a sejtbe való belépés után gyakran foszforileződnek nukleozid-mentő utakon, amelyek során a megfelelő mono-, di- vagy trifoszfátokká alakulnak. A trifoszforilezett nukleozid-származékokat más, sejten belül kifejtett hatás mellett gyakran a DNS vagy RNS polimerázok szubsztrátjaiként használják, amelyek így beépülnek a DNS-be vagy RNS-be. A trifoszforilezett nukleozid-származékok erős polimeráz inhibitorok, ezért kiválthatják az éppen keletkezőben lévő nukleinsav molekula kialakulási folyamatának idő előtti megszakadását. A trifoszforilezett nukleozid-származékok beépülnek a nukleinsav replikáció vagy átírás folyamatába és gén kifejeződési vagy működési zavart okozhatnak.

Sejtszinten a nukleozid-származékok beavatkozhatnak a sejt ciklusba is, és különösen kedvező hatásuk, hogy a rákos sejtek apoptózist idézik elő. A nukleozid-származékokról ismert az is, hogy képesek bizonyos immunválaszok módosítására.

A technika állásából számos nukleozid-származék ismert, amelyek viszonylag nagymértékű rákellenes hatással rendelkeznek. A fenti ismert vegyületek között vannak timidilát szintáz inhibitorok, például az 5-fluor-

-uridin, adenzin dezamináz inhibitorok, például a 2-klór-adenzin és ilyen vegyület a neplanocin A is, ami S-adenozil-homocisztein hidroláz inhibitor. Valamennyi vagy majdnem valamennyi ismert nukleozid-származék azonban a normál emlős sejteket is veszélyezteti, elsősorban azért, mert az ismert nukleozid-származékok nem rendelkeznek kellő szelektivitással a normál és a tumor sejtek között. A kellő szelektivitás hiánya gyakran komoly mellékhatásokat okoz, és ezért korlátozza a fenti származékok gyógyászati hatását.

A technika állásából ugyan számos nukleozid-származék ismert, de valamennyi vagy majdnem valamennyi rendelkezik valamilyen komoly hátránnyal is. Ezért még mindig szükség van nukleozid-származékokra vonatkozó módszerek és nukleozid-származékokat tartalmazó gyógyászati készítmények kifejlesztésére.

A jelen találmány a cukorrészben módosított pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid-származékokra vonatkozik, amelyeknek az emlős sejtekre kifejtett toxikus hatása lényegesen kisebb, mint az ismert származékoké, azonban a rákos sejtekre kifejtett citotoxikus hatása jelentős. A szerkezeti módosítás a ribofuranozilcsoport 4' és 5' helyzetű szénatomjainak helyettesítésére vonatkozik, de nem korlátozódik erre. A jelen találmány szerinti pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid-származékok kedvező immunmódosító hatással rendelkeznek, ide értve az 1-es típusú citokinek, például az IL-2 serkentését és a 2-es típusú citokinek, például az IL-4 visszaszorítását. A vegyületek immunmódosító tulajdonságuk következtében rák, vírusos, autoimmun és gyulladásos megbetegedések kezelésében valamint idegen szövet kilökődésének gátlására alkalmazhatók.

A találmány tárgya az (I) általános képletű pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid származékok, ahol

A jelentése oxigén- vagy kénatom vagy metilénecsoprt;

X jelentése hidrogénatom, amino- vagy hidroxicsoprt;

- Y jelentése hidrogénatom, halogénatom vagy aminocsoport;
- Z jelentése hidrogén- vagy halogénatom vagy -R, -OH, -OR, -SH, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -CN, -C(O)NH₂, -COOH, -COOR, -CH₂NH₂, -C(=NOH)NH₂ vagy -C(=NH)NH₂ képletű csoport, ahol R jelentése alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport;
- R₂ és R₃ jelentése egymástól függetlenül hidrogén- vagy fluoratom vagy hidroxics csoport;
- R₄ jelentése hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport, ahol R₄ adott esetben heteroatomot és/vagy funkciós csoportot tartalmaz;
- R₅ jelentése hidrogénatom, hidroxics csoport, -OP(O)(OH)₂, -P(O)(OH)₂ képletű vagy -OP(O)(OR')₂ vagy -P(O)(OR')₂ általános képletű csoport, és
- R' jelentése védőcsoport,
- R_{5'} jelentése alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport, ahol R_{5'} legalább két szénatomot tartalmaz és adott esetben heteroatomot és/vagy funkciós csoportot tartalmaz.

A találmány szerinti nukleozid-származékok közé tartoznak az (Ia) általános képletű pirrolo[2,3-d]pirimidin-származékok is, ahol

- Z jelentése -CN, -C(O)NH₂, -C(=NH)NH₂ vagy -C(=NO)NH₂ és
- R₄ és R_{5'} jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkil-csoport, ahol R₄ és R_{5'} adott esetben egymástól függetlenül heteroatomot és/vagy funkciós csoportot tartalmaz; azzal a megkötéssel, hogy R₄ és R_{5'} nem jelenthet egyszerre hidrogénatomot.

A találmány tárgya továbbá a fenti vegyületek alkalmazása tumor növekedés gátlására és az 1-es típusú és a 2-es típusú citokinek és kemokinek termelődésének módosítására.

A találmány tárgya, jellemzői és előnyei könnyebben érthetővé vál-

nak a következőkben leírt előnyös megvalósítási módok és az ábrák alapján.

Az 1. ábra a találmány szerinti vegyületek előállítására szolgáló első reakcióvázlat.

Az 2. ábra a találmány szerinti vegyületek előállítására szolgáló második reakcióvázlat.

A 3. ábra a találmány szerinti vegyületek előállítására szolgáló harmadik reakcióvázlat.

A 4. ábra a találmány szerinti vegyületek előállítására szolgáló negyedik reakcióvázlat.

Az 5. ábra a találmány szerinti vegyületek előállítására szolgáló ötödik reakcióvázlat.

A 6. ábra a találmány szerinti vegyületek előállítására szolgáló hatodik reakcióvázlat.

A 7. ábra a találmány szerinti vegyületekre adott konkrét példák.

A 8A és a 8B ábrák a találmány szerinti vegyületek 1-es típusú és 2-es típusú citokinek kibocsátására gyakorolt hatását bemutató diagramok.

Az 1. táblázat különböző találmány szerinti vegyületek citotoxicitását ábrázolja.

A 2. táblázat a DNS szintézis arányát bemutató táblázat különböző találmány szerinti vegyületekkel kezelt sejteken.

A 9. ábra a találmány szerinti vegyületek humán prosztata rák sejtek VEGF kibocsátásra gyakorolt gátló hatását ábrázoló diagram.

A 10. ábra a találmány szerinti vegyületek humán prosztata rák sejtek IL-8 kibocsátásra gyakorolt gátló hatását ábrázoló diagram.

1. táblázat

Pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid-származékok citotoxicitásaMTS vizsgálat

Vegyület	Prostata-rák	Normál fibroblaszt sejtek	Melanoma rák	Tüdőrák	Ovarian R	Ovarian NR
	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀	EC ₅₀
(61)	12,5	50	40	34		
(59)	>100	>100	>100	>100		
(44)	0,07	0,08	0,06	0,02		
(57)	0,01	0,08	0,01	0,06		
(48)	>100	NT	>100	>100		
(46)	60,1	NT	>100	99,3		
(53)	98	39	82,5	97,5		
(10)	>100	NT	>100	>100		
(15)	>100	NT	>100	>100		
(26a)(5'-R)	>100	>100	>100	>100		
(27a)(5'-R)	>100	>100	>100	>100		
(23a)(5'-S)	44,2	45,6	51,8	30,1		
(21a)(5'-S)	98,2	>100	>100	90,9		
(23a)(5'-R)	20,4	45,5	43,9	24,8	12,1	43,4
(21a)(5'-R)	>100	>100		NT		
(24a)(5'-S)	>100	39,6	87,3	80,7		
(24a)(5'-R0)	70,1	34,9	70,1	30,8		
(49)	5,6	3,3	NT	NT	5,7	5,1
(64)	4,3	2,3	NT	NT	4,4	3,7
(50)	>100	>100	>100	>100		
(51)	>100	>100				
(23e)(5'-R)	50,6	>100				
(23f)(5'-R)	49,5	>100				

2. táblázat

A teljes DNS szintézis gátlása pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid-származékokkal kezelt sejtkultúrákban 72 órás te-
nyésztési idő alatt

Prosztatárak sejtek, HTB 81												
Konc. μM	Keze- letlen	(25a)(5'-S)	(26a)(5'-S)	(27a)(5'-S)	(25a)(5'-R)	(26a)(5'-R)	(27a)(5'-R)	(23a)(5'-S)	(21a)(5'-S)	(23a)(5'-R)	(21a)(5'-R)	(21a)(5'-R)
100		3,28	4,79	3,11	5,42	5,62	3,2	0,58	0,81	0,74		1,52
50		3,41	5,34	4,16	5,24	5,3	4,69	1,2	2,54	0,89		3,15
25		3,66	5,24	3,84	5,1	5,3	5,39	2,1	4,4	1,15		3,76
12,5		3,09		3,96	5,35	5,2	5,37	2,9	4,3	3,23		3,9
6,25		3,62		3,9	5,5	NT	5,6	3,16	4,5	3,5		4,2
1,56		3,6		4,2	5,8	NT	NT	4,9	4,9	3,8		4,97
0,78		3,61		4,56	6,1	NT	5,9	5,3	5,3	4,82		5,3
0	5,78											
Normál sejtek/emberi fibroblaszt sejtek												
100		3,6	4,35	1,47	4,19	4,31	2,33	0,93	3,65	1,29		3,75
50		3,7	4,56	4	4,29	4,35	4,1	1,33	4,3	1,89		4,1
25		4,32	4,63	4,32	4,14	4,6	4,3	4,5	4,5	4,7		4,2
12,5		4,28	4,55	4,2	4,32	4,9	5,1	5,1	4,6	4,6		4,4
6,25		4,15	4,35	4,1	NT	5	5	5	4,5	4,8		4,6
1,56		4,36	4,43	NT	NT	5,2	5,2	5	4,4	4,7		4,5
0,78		4,26	4,38	NT	NT	5,3	5,1	5	4,6	4,7		4,7
0	4,47											

Az (I) és (Ia) általános képletű pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid-származékok többféle biológiai hatást fejtenek ki a normál és a hiperproliferatív sejtekre.

Az (I) általános képletű pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid-származékokban a helyettesítők jelentése a következő:

- A jelentése oxigén- vagy kénatom vagy metilénecsoport;
- X jelentése hidrogénatom, amino- vagy hidroxicsoport;
- Y jelentése hidrogénatom, halogénatom vagy aminocsoport;
- Z jelentése hidrogén- vagy halogénatom vagy $-R$, $-OH$, $-OR$, $-SH$, $-SR$, $-NH_2$, $-NHR$, $-NR_2$, $-CN$, $-C(O)NH_2$, $-COOH$, $-COOR$, $-CH_2NH_2$, $-C(=NOH)NH_2$ vagy $-C(=NH)NH_2$ képletű csoport, ahol R jelentése alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport,
- R_2 és R_3 jelentése egymástól függetlenül hidrogén- vagy fluoratom vagy hidroxicsoport;
- R_4 jelentése hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport, ahol R_4 adott esetben heteroatomot és/vagy funkciós csoportot tartalmaz;
- R_5 jelentése hidrogénatom, hidroxicsoport, $-OP(O)(OH)_2$, $-P(O)(OH)_2$ képletű vagy $-OP(O)(OR')_2$ vagy $-P(O)(OR')_2$ általános képletű csoport, és
- R' jelentése védőcsoport,
- R_5' jelentése alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport, ahol R_5' legalább két szénatomot tartalmaz és adott esetben heteroatomot és/vagy funkciós csoportot tartalmaz.

Az "alkil", "alkenil", "alkinil" és az "aralkil" meghatározások alatt a jelen találmány értelmében egyenes és elágazó láncú csoportokat is értünk. Az R_2 és R_3 helyettesítőkkel kapcsolatban rámutatunk arra, hogy R_2 és R_3 egymástól függetlenül lehet α vagy β konfigurációjú. Azokban a vegyületekben, amelyekben az 5' helyzetű szénatom helyettesítői eltérő-

ek, R- vagy S- királis centrum jön létre. A "heteroatom" meghatározást a szerves molekulák szénatomtól eltérő atomjaira alkalmazzuk, a heteroatom előnyösen halogénatom, nitrogénatom, oxigénatom vagy kénatom. A "funkciós csoport" meghatározás alatt reaktív kötések (pl. kettős vagy hármas kötések) és reaktív csoportokat (pl. $-OH$, $-SH$, $-NH_2$, $-N_3$, $-CN$, $-COOH$, $-CHO$, $-CONH_2$ csoportokat stb.) értünk.

Különösen előnyösek azok az (I) általános képletű pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid származékok, amelyekben Z jelentése $-CN$, $-C(O)NH_2$ vagy $-C(=NH)NH_2$ képletű csoport és R_5 jelentése legalább két szénatomot tartalmazó alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkil-csoport.

Az (Ia) általános képletű pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid-származékokban Z jelentése $-CN$, $-C(O)NH_2$, $-C(=NH)NH_2$, vagy $-C(=NOH)NH_2$ képletű csoport és R_4 és R_5 egymástól függetlenül hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil- és aralkil-csoport, ahol R_4 és R_5 adott esetben egymástól függetlenül heteroatomot és/vagy funkciós csoportot tartalmaz; azzal a megkötéssel, hogy R_4 és R_5 nem jelenthet egyszerre hidrogénatomot; a többi helyettesítő jelentése az (I) általános képletnél megadott.

A találmány szerinti vegyületek fentiektől eltérő formájúak illetve szerkezetűek is lehetnek, például elővegyületek vagy másképpen módosított származékok, amelyek előnyösen a gyógyászati és/vagy farmakodinamikai hatás növelése céljából kémiai és/vagy enzimatikusan vannak módosítva. A módosítás célja lehet például a célszervekre, sejtekre illetve szubcelluláris szinten gyakorolt nagyobb specifitás valamint a nagyobb felezési idő az élő szervezetben.

Kialakíthatók például koleszterin adduktok, amelyek megnövelik a célspecifitást a máj felé, vagy apolipoprotein adduktok, amelyek elősegítik, hogy a hatóanyag átlépjen a vér-agy gáton. Kialakíthatók receptor ligandum komplexek, amelyekkel olyan sejtek célozhatók meg, amelyek a ligandumra specifikus receptort bocsátanak ki. Kialakíthatók antitest és

antitest fragmentum komplexek is, amelyek a módosított hatóanyagot szelektíven szállítják egy szubcelluláris helyre. A technika állásából számos elővegyület és módosított forma ismert, különösen előnyösek a függőben lévő 60/216418 (bejelentési nap 2000. április 17.) szabadalmi bejelentésben leírt elővegyületek. A fenti bejelentést teljes egészében a jelen bejelentés részének tekintjük. Töltéssel rendelkező vagy töltés nélküli, lipofil vagy poláros csoportokkal is növelhető a találmány szerinti vegyületek felezési ideje a szérumban, a cél szervekben és/vagy a sejtekben. A találmány szerinti vegyületek foszforilezhetők az 5-ös helyzetű szénatomon, lehetnek di- vagy trifoszforilezettek vagy tartalmazhatnak tiofoszfát csoportot is.

A találmány szerinti vegyületek előnyösen D konfigurációjú cukor csoportot tartalmazhatnak, de a cukor csoport lehet L konfigurációjú is. Azokban a vegyületekben, amelyekben ez lehetséges, az 5-ös helyzetű szénatom lehet R vagy S konfigurációjú és a helyettesítő lehet α vagy β irányú.

A találmány szerinti vegyületekből sokféle gyógyszerforma alakítható ki, például folyadékok, szirupok és gélek (pl. injekciók, szájon át bevehető vagy topikális formák) és szilárd gyógyszerformák (pl. szájon át bevehető formák, injekciózásra kialakított vagy testüregbe való behelyezésre kialakított formák). A találmány szerinti vegyületek egy része a gyomor-bélrendszerben jelenlévő környezetben nem stabil, ezért az ilyen vegyületeknél előnyös az izotóniás oldatot tartalmazó injekciók alkalmazása. Orron belüli adagolással és folyadék inhalálással is elkerülhető a savas bomlás. A gyomor-bélrendszerben nem bomló vegyületek adagolhatók szirup vagy tabletta formájában. Az adott alkalmazástól függően a találmány szerinti vegyületek topikális illetve transzdermális készítményben is alkalmazhatók. A technika állásából számos egyéb gyógyszerforma ismert, amelyek szintén alkalmazhatók a találmány szerinti vegyületekhez;

előnyös formulákat ismertetnek a következő összefoglaló munkában: "Drug Products for Clinical Trials: An. Intl. Guide to Formulation, Production, Quality Control" by Donald C. Monkhouse and Christopher T. Rhodes (szerzők); ISBN:082479852X.

A találmány szerinti vegyületeket tartalmazó készítmények tartalmazhatnak funkcionális és nem-funkcionális adalékokat is. Ha transz-kután adagolás a kívánatos, a készítmény tartalmazhat olyan adalékokat, amelyek elősegítik a bőrbe való behatolást. A készítmények citosztatikus, vírusellenes és immunmodulátor szereket is tartalmazhatnak, amelyek szinergetikus vagy egyszerű additív hatást hoznak létre. A nem-funkcionális adalék lehet például töltőanyag, antioxidáns, ízesítőanyag, színezőanyag; ezek az anyagok a készítmény valamilyen speciális tulajdonságát javítják.

A találmány szerinti vegyületek koncentrációja a hatás kifejtésének helyén mérve előnyösen kb. $1\ \mu\text{M}$ és $100\ \mu\text{M}$ közötti. Ha a találmány szerinti vegyület affinitása kisebb, mint $1\ \mu\text{M}$, megfelelő koncentráció lehet például a $999\ \text{nM}$ és a $10\ \text{nM}$ közötti érték, vagy az ennél kevesebb. A viszonylag rövid felezési idejű találmány szerinti vegyületeknél és a gyors körfolyamatban résztvevő vegyületeknél megfelelő a $0,1\ \text{mM}$ és a $100\ \text{mM}$ vagy ennél nagyobb koncentráció. Ebből következik, hogy a dózis tág határok között változhat, de in vitro vagy állatkísérletekkel meghatározható.

Az 5' és 4' szénatomon módosított pirrolopirimidin nukleozid-származékok számos biológiai hatása közül különösen jelentős, hogy a vegyületek módosítják az 1-es típusú és a 2-es típusú citokin termelést, szabályozzák a rákos folyamatokat (azaz csökkentik a DNS szintézist vagy a sejtszaporodást) és csökkentik a kemokinek és a szaporodási faktor termelését, amint azt a továbbiakban ismertetjük.

A találmány szerinti, a sejt citokin kiválasztásának csökkentésére

szolgáló eljárás tartalmaz egy lépést, amelyben az (I) általános képletű vegyületet adagoljuk, és egy másik lépést, amelyben az (I) általános képletű vegyület eljuttatjuk a sejthez olyan koncentrációban, amely befolyásolja a citokin kiválasztást. Az (I) általános képletű vegyületek, a helyettesítők valamennyi kombinációja mellett a találmány tárgyához tartoznak, előnyösek azonban az olyan (I) általános képletű vegyületek, amelyekben R_4 és R_5 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkil-csoport és R_4 és R_5 adott esetben egymástól függetlenül egy heteroatomot és/vagy egy funkciós csoportot tartalmaz; a többi helyettesítő jelentése a az (I) általános képletnél megadott. A találmány szerinti, a sejt citokin kiválasztásának megváltoztatására alkalmazható vegyületek a (III) általános képletű vegyületek, ahol

Z jelentése $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{NNH}_2)\text{NH}_2$ vagy $-\text{C}(=\text{NOH})\text{NH}_2$ és

R_5 jelentése hidrogénatom, $-\text{OH}$, $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$, $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}')_2$ vagy $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')_2$ általános képletű csoport, ahol R' jelentése védőcsoport.

A fenti citokinek előnyösen az 1-es típusú citokinek (pl. IFN_γ) és a 2-es típusú citokinek (pl. IL-4). Az érintett sejt lehet bármilyen ismert, citokint termelő és/vagy kiválasztó sejt, de a sejt előnyösen nyiroksejt vagy rákos sejt (például a prosztata rák sejtek, *infra*).

A hiperproliferatív sejtek növekedésének gátlására szolgáló találmány szerinti eljárás egyik lépése szerint egy (I) általános képletű vegyületet adagolunk, majd ezt eljuttatjuk a hiperproliferatív sejthez olyan koncentrációban, amelyben a vegyület képes gátolni a hiperproliferatív sejt szaporodását. Különösen előnyösek az olyan (I) általános képletű vegyületek, amelyekben R_4 jelentése hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkil-csoport, ahol R_4 adott esetben egy heteroatomot és/vagy egy funkciós csoportot tartalmaz és R_5 jelentése hidrogénatom, alkil-, alke-

nil-, alkinil- vagy aralkil-csoport és R_5 , legalább két szénatomot és adott esetben egy heteroatomot és/vagy egy funkciós csoportot tartalmaz, azal a megkötéssel, hogy R_4 és R_5 , nem jelenthet egyszerre hidrogénatomot; a többi helyettesítő jelentése az (I) általános képletnél megadott.

A hiperproliferatív sejtek közé tartoznak különösen a rákos sejtek, azon belül is a prosztatara sejtek. Nem kötjük magunkat semmilyen elmélethez, de a szaporodás gátlása a DNS szintézis gátlását is jelenti.

A jelen találmány szerinti, a sejt szaporodási faktor kibocsátásának csökkentésére szolgáló módszer egyik lépésében az (I) általános képletű vegyületet adagoljuk, egy másik lépésben pedig a sejthez eljuttatjuk az (I) általános képletű vegyületet olyan koncentrációban, amely csökkenti a sejt szaporodási faktor termelését. A találmány szerinti módszerrel különféle szaporodási faktorok kibocsátása csökkenthető, ezek közül a VEGF kibocsátás csökkentése különösen előnyös. Hasonlóan, a találmány szerinti módszer valamennyi, szaporodási faktort kibocsátó sejt szaporodási faktor kibocsátásának a csökkentésére vonatkozik, különösen azonban a rákos sejtek, azon belül is a prosztatara sejtekre.

A találmány szerinti vegyületek előállításával kapcsolatban a pirrolo-[2,3-d]pirimidin nukleozid-származékok sokféle eljárással előállíthatók, a következő eljárások ismertetése csupán példaként szolgál.

Az 5' szénatomon módosított pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid-származékok előállítása

Az 5' szénatomon helyettesített nukleozid-származékokat pirrolo-[2,3-d]pirimidin bázisok és a megfelelő 5'-helyettesített ribofuranózek kondenzációjával állítjuk elő. Az ismert eljárás szerint [Jones és munkatársai: "Methods in carbohydrate Chemistry" (Whistler és Moffat), VI. kötet, 315-322 old., Academic Press, New York (1972)], előállított (1) vegyületet (1. ábra) valamilyen nukleofillel, például Grignard reagenssel reagáltatva állítottuk elő a (2) vegyületet, amit benzoileztünk majd a kapott vegyületet

trifluorecetsavval reagáltatva előállítottuk a (4) vegyületet. Benzoilezés majd kénsav jelenlétében történő ecetsav/ecetsavanhidriddel való reagáltatás után (6) vegyületet kaptunk, amit a pirrolo[2,3-d]pirimidin bázissal való kondenzációban alkalmaztunk. A Jones és munkatársai: "Methods in carbohydrate Chemistry" (Whistler és Moffat), VI. kötet, 315-322 old., Academic Press, New York (1972) irodalmi helyen leírt (7) vegyületet ismert eljárás szerint tozilát származékká alakítottuk, amit lítium-alumínium-hidriddel redukálva (8) vegyületet kaptunk. Az 1. ábra szerinti módon, hasonlóan eljárva a (8) vegyületet (9) vegyületté alakítottuk. A (9) vegyület és a (19) pirrolo[2,3-d]pirimidin-származék kondenzációjával és ezt követő átalakításával állítottuk elő a (10)-(15) vegyületeket, amint azt a 2. ábrán bemutatjuk.

A 3. ábra szerint a (2) vegyületet átalakítottuk a (16) szulfonáttá, amiből nukleofil helyettesítéssel kaptuk az ellenkező konfigurációjú (17) vegyületet. Az izopropilidén védőcsoportjának eltávolítása és az ezt követő acetilezés után a (18) tetraacetátot kaptuk. Az 5 helyzetű szénatomon helyettesített, védett ribofuranóz és a nukleozid bázis kondenzációját a 4. ábrán mutatjuk be. Az ismert eljárás szerint [Tolman és munkatársai, J. Org. Chem. 91, 2102-2108, (1969)] előállított (19) 5-cianopirrolo[2,3-d]pirimidint trimetilszilil-származékká alakítottuk, majd a (6) vegyülettel kondenzáltuk, trimetilszililtriflát jelenlétében, hasonlóan a toyocamicin előállítására leírt eljáráshoz [Sharma és munkatársai Nukleosides and Nucleotides, 12, 643-648, (1993)]. A kapott kapcsolási termékből hidrogénezéssel eltávolítottuk a brómot, és így a (20) vegyületet kaptuk. A (20) vegyületet vízmentes metanolban ammóniával reagáltattuk és így a (21) és a (23) vegyületeket kaptuk. A (21) vegyületet oxidáltuk és így a (22) vegyületet kaptuk. A (23) vegyületet átalakítottuk a (24) karboxamid-származékká. A (23) és (24) vegyületeket oxidálva előállítottuk a (25) vegyületet kaptuk. A (25) vegyületet hidroxilaminnal reagáltatva a (26) vegyüle-

tet kaptuk, amit Raney nikkell fölött hidrogénezve a (27) vegyületet kaptuk. A (27) vegyületet úgy is előállítottuk, hogy a (25) vegyületet ammóniával melegítettük nyomás alatti tartályban.

A 4' helyzetben módosított pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid-származékok előállítása

Az 5. ábra szerint az (1) vegyületet formaldehiddel reagáltattuk vizes nátriumhidroxidban és így a (28) 4'-hidroximetil-származékot kaptuk, amit szelektíven megvédve előállítottuk a (29) vegyületet. A DMT ezt követő megvédésével és a TBS eltávolításával a (31) vegyületet kaptuk, ami sokféle csoporttal helyettesíthető. A 4-es helyzetben helyettesített származékokat az 5-ös helyzetben helyettesített ribofuranózoknál leírtakhoz hasonlóan átalakítva (ld. 1. ábra) (35) vegyületet kaptunk, amit nukleozid bázissal való kondenzációnál alkalmaztunk.

Az 5' szénatomon helyettesített pirrolopirimidin nukleozid-származékokhoz hasonlóan a 4' szénatomon helyettesített (36) származékokat is a (35) vegyületek és a (19) vegyületek kondenzációjával állíthatjuk elő, amint azt a 6. ábrán bemutatjuk. Az ezt követő átalakítással állíthatók elő a (37)-(42) 4' szénatomon helyettesített pirrolopirimidin származékok.

A 2'-módosított és más pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid származékok előállítása

A következő pirrolopirimidin nukleozid származékokat biológiai vizsgálatok céljára állítottuk elő, néhány vegyületet korábban nyilvánosságra hoztunk (ezeket ismert vegyületként tüntetjük fel). A vegyületeket a 7. ábrán mutatjuk be. Az ismert (43), (44), (52)-(55) és (57) vegyületeket ismert eljárás szerint állítottuk elő [Hinshaw és munkatársai, J. Org. Chem. 92, 236-241. oldalak, (1970)]. Az (56) vegyületet az (52) vegyület hidrogénezésével állítottuk elő. Az ismert (49) vegyületet [Krawczyk és munkatársai, Nukleosides Nucleotides 8, 97-115, (1989)] nátriumnitrittel reagáltatva kaptuk az (50) vegyületet. Az ismert (45) és (48) vegyületeket ismert

eljárás szerint állítottuk elő [Ramasamy és munkatársai, J. Heterocyclic Chem. 25, 1043-1046, (1988)]. A (45) vegyületet ammónia-metanol eleggyel kezelve állítottuk elő a (46) vegyületet, aminek a hidrogénezésével kaptuk a (47) vegyületet. Az (58)-(63) vegyületeket a (45) vegyületből állítottuk elő, az (52)-(57) vegyületek előállításához hasonlóan. Az ismert (64) vegyületet [Krawczyk és munkatársai, Nukleosides Nucleotides 8, 97-115, (1989)] átalakítottuk (65)-(67) vegyületekké. Az ismert (68) vegyületet (Ramasamy és munkatársai, Tetrahedron, 42, 5869-5878, (1986)) átalakítottuk (69) és (70) vegyületekké.

Emberi T-sejtek előállítása és in vitro aktiválása

Egészséges donorokból származó perifériás vér mononukleáris sejteket sűrűség gradiens centrifugálással izoláltunk, majd ezeket Lymphokwik-kal (One Lambda, Canoga Park, CA) T sejtekben dúsítottuk. A monocita szennyezést műanyagra való tapaszttal eltávolítottuk. A tisztított T sejtek adatai: >99% CD2+, < 1% HLA-DR+ és <5% CD25+, ezeket RPMI-AP5-ben tartottuk (RPMI1640 közeg, ami 5% autológ plazmát, 1% L-glutamint, 1% penicillin/sztreptomycin elegyet és 0,05% 2-merkatoetanolt tartalmazott). A citokin protein szint meghatározására a T-sejteket ($0,2 \times 10^6$ sejt 0,2 ml térfogatban) 2 ng forbol mirisztát acetát és 0,1 mg ionomicin (PMA-ION, mindkettő Calbiochem, San Diego, CA, US) hozzáadásával aktiváltuk és 96 üreges tányéron 0 - 10 μ M különböző nukleozid jelenlétében 48 órán át 37 °C-on aktiváltuk. Az aktiválást követően a felülúszóban meghatároztuk a sejtől származó citokin termelést.

Sejten kívüli citokin analízis

A sejt felülúszókban megfelelő hígítás után meghatároztuk az emberi citokin szintet IFN γ és IL-4-re specifikus ELISA kitek (Biosource, Camarillo, CA, US) segítségével. Az ELISA-val kapott eredményeket pg/ml-ben fejeztük ki.

Pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid származékok hatása sejten kívüli citokin szintekre aktivált emberi T sejtekben

A pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid származékok hatását 0 és 10 μM mennyiségben a PMA/ionomicin eleggyel stimulált T sejtek 1-es típusú citokin, az $\text{IFN}\gamma$ és 2-es típusú citokin, az IL-4 kibocsátására a 8A és 8B ábrán mutatjuk be, 5 különböző humán donorból származó mintánál. A citokin szintet a sejtek szabad felülúszójában ELISA alkalmazásával határoztuk meg. A legnagyobb hatást a 7- β -D-ribofuranozil-4-oxopirrolo[2,3-d]pirimidin-5-karboxamidinnál tapasztaltuk. Ez a vegyület 498 ± 83 %-kal növelte az aktivált IL-4 termelést és 43 ± 4 %-kal csökkentette az $\text{IFN}\gamma$ termelést az aktivált kontrollsejtek citokin termeléséhez képest.

A kapott adatokat az aktivált kontroll százalékában fejeztük ki; ezt úgy számítottuk, hogy az aktivált T sejteknek a vizsgált nukleozidok jelenlétében mutatott citokin szintjét elosztottuk a kezeletlen aktivált T sejtek citokin szintjével és ezt 100-zal szoroztuk. A vegyület hozzáadása után változatlan citokin szintet tekintettük az aktivált kontroll 100 %-ának. A PMA-ION által indukált citokin kiválasztás abszolút szintje ($\text{pg/ml} \pm \text{szórás}$) $\text{IFN}\gamma$ esetén 22954 ± 3391 volt; IL-4 esetén 162 ± 40 . A többi szint <30 pg/ml volt mindegyik vizsgált citokinnél.

A pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid származékok citotoxicitása in vitro

A jelen találmány szerinti pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid-származékok biológiailag aktív vegyületek, mivel *in vitro* bizonyos mértékben citotoxikusak. Az ilyen irányú vizsgálatokban a vegyületeket normál humán fibroblasztóma tenyészetben, prosztatarák sejt 81, humán melanóma rák sejt 140, humán tüdőrák sejt 177 és humán petefészek rák R és NR sejtek (valamennyi ATCC készítmény) tenyészetében vizsgáltuk. Ezekben a kísérletekben a sejteket 2000 sejt/200 μl tápközeg sűrűségben oltottuk be minden üregbe (96 üreges lemezen). A vizsgált vegyületeket az üregekbe egyszer, 0,78-100 μM koncentrációban mértük be, közvetlenül a sejtekkel

való beoltás után. A kolorimetriás citotoxicitási esszét (MTS) a kezelés után 72 órával végeztük. A mért adatokból meghatároztuk az EC_{50} értékeket, amit az 1. táblázatban tüntettünk fel. Számos vegyület nem mutatott citotoxicitást $100\ \mu\text{M}$ alatti koncentrációban. Ezekben az esetekben az EC_{50} -re azt adtuk meg, hogy 100-nál nagyobb. A többi vegyületnél az EC_{50} érték a vegyületnek azt a koncentrációját jelenti, amely mellett a sejtpopuláció 50 %-a károsodott.

A pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid-származékok gátolják a sejtek DNS szintézisét in vitro sejtkultúrákban dózis-függő módon.

A pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozid-származékok gátolják az emberi sejt szaporodást in vitro, ami a mért DNS szintből állapítható meg. A kísérletet a fentiekben leírtakhoz hasonlóan végeztük. A vegyületeket egyszer adtuk hozzá a tenyészethez és a DNS szintet 72 órával később mértük. Ekkor az üregekből eltávolítottuk a tenyésztőközeg felét, és ezt vízzel helyettesítettük. Ezután a sejteket $-70\ ^\circ\text{C}$ -ra hűtöttük és így tároltuk legalább 12 órán át. A következő lépésben a sejteket $-70\ ^\circ\text{C}$ -ról szobahőmérsékletre hagytuk melegedni és $1\ \mu\text{M}$ Hoechst 33342-t mértünk be mindegyik üregbe. 2 órás inkubálás után mértük a fluoreszcencia jelet (360-530 nm). Ezzel a módszerrel a DNS mennyiségével arányos fluoreszcencia intenzitást kapunk, DNS-Hoechst 33342 komplex képződése miatt. A kapott eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be. Az adatok a DNS mennyiségének növekedését adják meg a kísérlet kezdetén jelenlévő DNS-hez viszonyítva (2 órával a sejtekkel való beoltás után). A kezeltlen prosztata rák sejtekhez illetve a normál sejtekhez képest a DNS szint 5,78 és 4,47 szeresére növekedett a 72 órás tenyésztési idő alatt.

A (23a)(5'-R) és (23a)(5'-S) vegyületek gátolják a humán prosztata rák sejtek VEGF kiválasztását in vitro

A (23a)(5'-R) és (23a)(5'-S) vegyületek képesek az emberi prosztata rák sejtekből, a HTB81 sejtekből származó ér eredetű endoteliális szapo-

rodási faktor (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) kiválasztásának gátlására. A VEGF jelzi az angiogenezist, mivel ez a molekula döntő szerepet játszik az endoteliális sejtek migrációjában és szaporodásában és a hajszálerek képződésben in vivo. Ennek bizonyítására $0,5 \times 10^5$ sejtet 5 ml tápközegbe oltottuk, 10 cm átmérőjű petricsészékben. A vegyületeket rögtön a beoltás után adtuk hozzá és 72 órán át végeztük a tenyésztést. Ezután a tenyésztőközeget összegyűjtöttük és meghatároztuk a VEGF szintet VEGF Elisa Assay (R&D Systems) segítségével, és ezt pikogram VEGF/ml közeg egységben fejeztük ki. A kapott eredményeket a 9. ábrán ábrázoltuk. A vizsgálati eredményeknek megfelelően mindkét vegyület gátolja a VEGF kiválasztást dóziszfüggő módon.

A(23a)(5'-R) és (23a)(5'-S) vegyületek gátolják a humán prosztataraák sejtek IL-8 kiválasztását in vitro sejttenyésztésben

A (23a)(5'-R) és (23a)(5'-S) vegyületek humán prosztataraák sejtek, a HTB81 sejtek interleukin-8 (IL-8) kiválasztását gátló hatást mutatnak. Az IL-8 az olyan kemo-attraktáns kemokinek közé tartozik (alfa típus), amelyek részt vesznek a gyulladásos folyamatokban, a neurofilekhez való vonzódásuk miatt. A kemokinekről ismert, hogy különféle rákos folyamatokban képződnek. Számos vizsgálattal igazolták, hogy a rákos sejtek kemokin termelésének gátlása kedvező a gazda szervezet számára. Azért, hogy igazoljuk, hogy a két vegyület képes gátolni a prosztataraák sejtek IL-8 kiválasztását, HTB81 prosztataraák sejteket in vitro kezeltünk (23a) vegyületekkel, 5'-R és 5'-S konfigurációjúakkal is, a diagramon feltüntetett koncentrációban. Az összegyűjtött tenyésztő közegben meghatároztuk az IL-8 szintet Elisa Assay segítségével (R&D Systems). A kapott eredmények szerint mindkét vegyület képes az IL-8 kiválasztás gátlására dózis függő módon, amint azt a 10. ábra mutatja.

A találmány szerinti vegyületek biológiai hatása azonban nem korlátozódik a fent leírt hatásokra. A találmány szerinti vegyületek általában

citosztatikus hatásúak különféle hiperproliferatív rendellenességekben, így lokalizált és/vagy áttételes rákok (például limfómák és karcinómák) valamint jóindulatú prosztata hiperplázia és keratózis esetén. A feltalálók alapvetően az IL-4-re (2-es típusú citokin) és IFN γ -ra (1-es típusú citokin) kifejtett biológiai hatást mutatták ki, a találmány szerinti vegyületek általában biológiai hatásuk miatt képesek az IL-4-től és IFN γ -tól eltérő citokinek szintjének módosítására is.

Különösen fontos rámutatni arra, hogy a vegyületek növelhetik vagy csökkenthetik egyes citokinek illetve citokin fajták kibocsátását/kiválasztását. A találmány szerinti vegyületek a szervezet immunrendszerét képesek úgy módosítani, hogy nagyobb 1-es típusú vagy 2-es típusú válasz alakuljon ki. A találmány szerinti vegyületek képesek lehetnek élő szervezetben a vírusok mennyiségének csökkentésére akár közvetlen hatással, vírus polimeráz inhibitoraként, akár közvetve, az immunrendszer aktiválásával, meghatározott humorális vagy sejtválaszt váltva ki. A találmány szerinti vegyületek alkalmazhatók lehetnek az immunrendszer allo- vagy xenografttal szemben adott válaszáinak csökkentésére, az allo- vagy xenografra adott sejtválasz mértékének csökkentésével.

Példák

A következő részben különböző találmány szerinti vegyületek előállítására adunk példákat, a találmány közelebbi bemutatása céljából, de a fentiekben ismertetett találmány korlátozásának szándéka nélkül.

Metil-2,3-O-izopropilidén-5(R,S)-C-etinil- β -D-ribofuranozid előállítása

[(2b) vegyület]

20 ml vízmentes tetrahidrofuránban oldott 4,00 g (19,78 mmol) metil-4-C,5-O-didehidro-2,3-O-izopropilidén- β -D-ribofuranozidhoz [Jones és munkatársai, *Methods and Carbohydrate Chemistry*, 1 kötet, 315-322 oldalak (1972)] kevertetés közben $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on argon atmoszférában cseppeként hozzáadtunk 80 ml-t etinilmagnézium-bromid 0,5 molos tetra-

hidrofurános oldatából (40 mmol). Az adagolás befejezése után a reakcióelegyet lassan (kb. 90 perc alatt) 0 °C-ra melegítettük. A reakciót jég (50 g) - víz (50 ml) elegy hozzáadásával leállítottuk és az elegyet 30 percen át kevertettük. 10 %-os vizes ecetsavval semlegesítettük, majd etilacetáttal kétszer extraháltuk. Az egyesített szerves fázisokat nátriumszulfát felett szárítottuk és bekonzcentráltuk. Szilikagélen végzett kromatográfia után (etilacetát:hexán 1:4) 3,48 g cím szerinti vegyületet kaptunk (R/S arány 1:1) fehér szilárd anyag formájában. A következő vegyületeket hasonlóan állítottuk elő:

a (2a) metil-2,3-O-izopropilidén-5(R)-C-metil-β-D-ribofuranozidot metil-4-C,5-O-didehidro-2,3-O-izopropilidén-β-D-ribofuranozid és etilmagnézium bromid reagáltatásával;

a (2c) metil-2,3-O-izopropilidén-5(R)-C-vinil-β-D-ribofuranozidot metil-4-C,5-O-didehidro-2,3-O-izopropilidén-β-D-ribofuranozid és vinilmagnézium bromid reagáltatásával;

a (2d) metil-5(R)-C-allil-2,3-O-izopropilidén β-D-ribofuranozidot metil-4-C,5-O-didehidro-2,3-O-izopropilidén-β-D-ribofuranozid és allilmagnéziumbromid reagáltatásával.

Metil-2,3-O-izopropilidén-5-O-metánszulfonil-5(R)-C-metil-β-D-ribofuranozid előállítása [(16) vegyület]

50 ml vízmentes piridinben oldott 7,24 g (33,17 mmol) (2a) 2,3-O-izopropilidén-5(R)-C-metil-β-D-ribofuranozidhoz kevertetés közben 0 °C-on hozzáadtunk 3,1 ml (39,92 mmol) metánszulfonil-kloridot. A kapott elegyet szobahőmérsékleten egy órán át kevertettük, 0 °C-ra hűtöttük, 1,0 ml víz hozzáadásával megbontottuk és szobahőmérsékleten további 30 percen át kevertettük. Az oldószert elpárologtattuk és a kapott maradékot etilacetátban oldottuk, telített vizes nátriumklorid oldattal háromszor mostuk, nátriumszulfát felett szárítottuk majd bekonzcentráltuk. Szilikagélen végzett kromatográfia után (30 % etilacetát hexánban) 8,62 g cím szerinti

(16) vegyületet kaptunk színtelen szirup formájában.

Metil-2,3-O-zopropilidén-5-O-acetil-5(S)-C-metil-β-D-ribofuranozid előállítása [(17) vegyület]

8,62 g (29,1 mmol) (16) metil-2,3-O-izopropilidén-5-O-metánszulfonil-5(R)-C-metil-β-D-ribofuranozid és 3,5 g (42,5 mmol) vízmentes nátriumacetát 350 ml vízmentes dimetilformamidos szuszpenzióját argon atomszférában 125 °C-on tartottuk 4 napon át. Az oldószert elpárologtattuk és a maradékot szilikagélen kromatografáltuk (25 % etilacetátot tartalmazó hexánnal). 4,0 g cím szerinti (17) vegyületet kaptunk fehér szilárd anyag formájában.

Metil-2,3-O-izopropilidén-4-hidroximetil-β-D-ribofuranozid előállítása [(28) vegyület]

380 ml dioxánban oldott 20,22 g (100 mmol) (1) 4-C,5-O-didehidro-2,3-O-izopropilidén β-D-ribofuranozidhoz 0 °C-on kevertetés közben cseppenként hozzáadtunk 76 ml 37 %-os formaldehid oldatot majd 188 ml 2 M-os nátriumhidroxidot. A kapott reakcióelegyet szobahőmérsékleten 20 órán át kevertettük majd 0 °C-ra hűtöttük, 10 %-os ecetsavval semlegesítettük, bekonzentráltuk kb. 50 %-ra és kétszer extraháltuk metilénkloriddal. Az egyesített szerves fázisokat nátriumszulfát felett szárítottuk és szárazra pároltuk. Szilikagélen végzett kromatográfia (4% metanol kloroformban) után 20,2 g cím szerinti (28) vegyületet kaptunk fehér szilárd anyag formájában.

Metil-2,3-O-izopropilidén-5-dezoxi-β-D-ribofuranozid előállítása [(8) vegyület]

250 ml vízmentes piridinben oldott 14,2 g (70,0 mmol) metil-2,3-O-izopropilidén-β-D-ribofuranozidhoz kevertetés közben 10 °C-on több részletben (30 percen át) hozzáadtunk 19,1 g (100 mmol) p-toluol-szulfonil-kloridot. A kapott elegyet szobahőmérsékleten 18 órán át kevertettük, majd 0 °C-ra lehűtve 5,0 ml víz hozzáadásával megbontottuk a reakció-

elegyet, és további 30 percen át szobahőmérsékleten kevertettük. A maradékot etilacetátban oldottuk, telített vizes nátriumklorid oldattal háromszor mostuk, nátriumszulfát felett szárítottuk majd szárazra pároltuk. Szilikagélen (etilacetát:hexán 1:3) végzett kromatográfia után 24,1 g cím szerinti vegyületet kaptunk fehér szilárd anyag formájában.

120 ml vízmentes dietiléterben oldott 4,58 g (120,5 mmol) LiAlH_4 -hez kevertetés közben hozzáadtunk 140 ml dietiléter:toluol (2,5:1) elegyben oldott 13,1 g (36,55 mmol) metil-2,3-O-izopropilidén-5-O-p-toluolszulfonil- β -D-ribofuranozidot. A kapott elegyet visszafolyatási hőmérsékleten forraltuk 22 órán át majd szobahőmérsékletre hűtöttük, 25 ml etilacetáttal hígítottuk és 5,0 ml víz hozzáadásával megbontottuk. Az oldószert elpárologtattuk. A kapott maradékot etilacetátban oldottuk, telített vizes nátriumklorid oldattal háromszor mostuk, nátriumszulfát felett szárítottuk és szárazra pároltuk. Szilikagélen végzett kromatográfia után (etilacetát:hexán 1:3) 3,58 g cím szerinti vegyületet kaptunk színtelen folyadék formájában.

Metil-5(R)-C-allil-5-O-benzoil-2,3-O-izopropilidén- β -D-ribofuranozid előállítás [(3d) vegyület]

40 ml vízmentes piridinben oldott 4,49 g (18,38 mmol) metil-5(R)-C-allil-2,3-O-izopropilidén- β -D-ribofuranozidhoz kevertetés közben 0 °C-on hozzáadtunk 2,7 ml (23,0 mmol) benzoil-kloridot. A kapott elegyet 18 órán át szobahőmérsékleten kevertettük, jéggel lehűtöttük, 1 ml víz hozzáadásával megbontottuk, majd 30 percen át szobahőmérsékleten kevertettük. Az oldószert elpárologtattuk, a maradékot etilacetátban oldottuk és háromszor mostuk telített vizes nátriumklorid oldattal, majd nátriumszulfát felett szárítottuk és bekonzentráltuk. Szilikagélen végzett kromatográfia után (12 % etilacetát hexánban) 6,26 g cím szerinti (3d) vegyületet kaptunk színtelen szirup formájában.

A következő vegyületeket hasonlóan állítottuk elő:

a (3b) metil-5-O-benzoil-5(R,S)-C-etinil-2,3-O-izopropilidén-β-D-ribofuranozidot (R/S arány 1:1) a (2b) metil-5(R,S)-C-etinil-2,3-O-izopropilidén-β-D-ribofuranozidból;

a metil-4-C-benzoiloxi-metil-5-O-benzoil-2,3-O-izopropilidén-β-D-ribofuranozidot a metil-2,3-O-izopropilidén-4-C-hidroximetil-β-D-ribofuranozidból.

Metil-5(R)-C-allil-5-O-benzoil-β-D-ribofuranozid előállítása [(4d) vegyület]

9:1 arányú TFA-víz elegyben oldott 6,2 g (17,8 mmol) (3d) metil-5(R)-C-allil-5-O-benzoil-2,3-O-izopropilidén β-D-ribofuranozidot 0 °C-on kevertettünk 90 percen át majd szárazra pároltuk. A kapott maradékot 20 ml 1:1 arányú metanol-toluol elegyben feloldottuk majd szárazra pároltuk. Szilikagélen végzett kromatográfia után (etilacetát:hexán 1:1) 3,70 g cím szerinti (4d) vegyületet kaptunk fehér szilárd anyag formájában.

A következő vegyületeket is hasonló módon állítottuk elő:

a (4b) metil-5-O-benzoil-5(R,S)-C-etinil-β-D-ribofuranozidot (R/S arány 1:1) a (3b) metil-5-O-benzoil-5(R,S)-C-etinil-2,3-O-izopropilidén-β-D-ribofuranozidból;

a metil-5-O-benzoil-4-C-benzoiloximetil-β-D-ribofuranozidot a metil-5-O-benzoil-4-C-benzoiloximetil-2,3-O-izopropilidén-β-D-ribofuranozidból.

Metil-5(R)-C-allil-2,3,5-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranozid előállítása [(5d) vegyület]

80 ml vízmentes piridinben oldott 3,60 mg (11,68 mmol) (4d) metil-5(R)-C-allil-5-O-benzoil-β-D-ribofuranozidhoz 0 °C-on kevertetés közben hozzáadtunk 3,0 ml (25,84 mmol) benzoil-kloridot. A kapott elegyet szobahőmérsékleten kevertettük 18 órán át, jéggel lehűtöttük, 1 ml víz hozzáadásával megbontottuk, majd szobahőmérsékleten 30 percen át kevertettük. A kapott elegyet bekonzentráltuk, etilacetáttal hígítottuk, háromszor mostuk telített vizes nátriumklorid oldattal, nátriumszulfát felett szárí-

tottuk majd szárazra pároltuk. Szilikagélen végzett kromatográfia után (15 % etilacetát hexánban) 5,3 g cím szerinti (5d) vegyületet kaptunk, szintelen szirup formájában.

A következő vegyületeket hasonló módon állítottuk elő:

az (5b) metil-5(R,S)-C-etinil-2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranozidot (R:S arány 1:1) a (4b) metil-5-O-benzoil-5(R,S)-C-etinil- β -D-ribofuranozidból,

a metil-4-C-benzoiloximetil-2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranozidot a 4-C-benzoiloximetil-5-O-benzoil- β -D-ribofuranozidból.

1-O-Metil-2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-vinil- β -D-ribofuranóz előállítása [(5c) vegyület]

11 ml 9:1 tf/tf arányú trifluorecetsav/víz elegyben oldott 1,0 g (4,3 mmol) (2c) metil-2,3,-O-izopropilidén-5(R)-C-vinil- β -D-ribofuranozidot 0 °C-on 30 percen át kevertettünk majd szárazra pároltuk. A maradékot metanolban oldottuk és szárazra pároltuk (háromszor), majd piridinben oldottuk és a piridint elpárologtattuk, majd végül 11 ml vízmentes piridinben oldottuk. Az oldathoz 1,9 ml (16 mmol) benzoil-kloridot adtunk. A reakcióelegyet 25 °C-on 16 órán át kevertettük, majd 20 ml jeges vízbe öntöttük. Az elegyet kétszer 20 ml diklórmétánnal extraháltuk, majd a szerves fázisokat nátriumszulfát felett szárítottuk és szárazra pároltuk. A maradékot szilikagélen kromatografáltuk (0-5 % etilacetát diklórmétánban), 1,0 g cím szerinti (5c) vegyületet kaptunk szirup formájában.

1-O-Acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-allil-D-ribofuranóz előállítása [(6d) vegyület]

14 ml ecetsav és 1,75 ml (18,36 mmol) ecetsavanhidrid elegyében oldott 4,0 g (7,74 mmol) (5d) metil-5(R)-C-allil-2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranozidhoz 0 °C-on kevertetés közben hozzáadtuk 200 μ l (3,79 mmol) tömény kénsav 4,0 ml ecetsavas oldatát. A kapott elegyet szobahőmérsékleten 20 órán át kevertettük, 0 °C-ra hűtöttük, hideg etilacetáttal

hígítottuk, majd vízzel, 5 %-os vizes NaHCO_3 -tal és telített vizes nátrium-klorid-oldattal mostuk, nátriumszulfát felett szárítottuk és bekonzentráltuk. Szilikagélen végzett kromatográfia után (etilacetát-hexán 1:4) 2,82 g cím szerinti (6d) vegyületet kaptunk (α/β arány 1:2) színtelen hab formájában.

A következő vegyületeket hasonlóan állítottuk elő:

a (6b) 1-O-acetil-5-(R,S)-C-etinil-2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranózt (R/S arány 1:1 és α/β arány 1:2) az (5b) metil-5(R,S)-C-etinil-2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranozidból;

az 1-O-acetil-4-C-benzoiloximetil-2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranózt (α/β arány 1:3) a metil-4-C-benzoiloximetil-2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranozidból;

az 5(R)-C-metil-1,2,3,5-tetra-O-acetil- β -D-ribofuranózt a metil-2,3-O-izopropilidén-5(R)-C-metil- β -D-ribofuranozidból.

a (6a) 1,2,3,5-tetra-O-acetil-5(S)-C-metil-D-ribofuranózt a metil-5-O-acetil-2,3-O-izopropilidén-5(R)-C-metil- β -D-ribofuranozidból;

a (9) 5-dezoxi-1,2,3-tri-O-acetil-D-ribofuranózt a metil-5-O-acetil-2,3-O-izopropilidén- β -D-ribofuranozidból;

a (6c) 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-vinil- β -D-ribofuranózt a metil-2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-vinil- β -D-ribofuranozidból.

4-Amino-6-bróm-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-allil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidin előállítása

1,05 g (4,41 mmol) 4-amino-6-bróm-5-cianopirrolo[2,3-d]pirimidint [Tolman és munkatársai: J. Org. Chem., 91, 2102-2108, (1969)] és 50 mg ammóniumsulfátot szuszpendáltunk 75 ml HMDS és 25 ml vízmentes m-xilol elegyében, majd a szuszpenziót argon atmoszférában 18 órán át visszafolyatási hőmérsékleten forraltuk. Az oldószereket eltávolítottuk és a maradékot vákuumban szárazra pároltuk. A maradékot 80 ml vízmentes 1,2-diklóretánban oldottuk és 2,00 g (3,67 mmol) 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-allil-D-ribofuranózt adtunk hozzá. Jeges hűtés mellett 5

ml vízmentes 1,2-diklóretánban oldott 1,3 ml (7,30 mmol) TMSOTf-et adtunk hozzá. Az elegyet argon atmoszférában szobahőmérsékleten 30 percen át kevertettük, majd 90 órán át visszafolyatási hőmérsékleten forraltuk, a reakcióelegyet (hidegen) jég/ NaHCO_3 -ra (50 ml) való öntéssel megbontottuk és szűrtük. A szerves fázist elválasztottuk, nátriumsulfát felett szárítottuk, és bekonzcentráltuk. Szilikagélen végzett kromatográfia után (etilacetát-hexán 2:3) 1,81 g cím szerinti vegyületet kaptunk szintelen szilárd anyag formájában.

A következő vegyületeket hasonlóan állítottuk elő:

a 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R,S)-C-etinil- β -D-ribofuranozil)-pirrolo[2,3-d]pirimidint (R/S arány 1:1) az 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-5(R,S)-C- etinil-D-ribofuranóz és a 4-amino-6-bróm-5-ciano-pirrolo[2,3-d]pirimidin reagáltatásával;

a 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(4-benzoiloximetil-2,3,5-tri-O-benzoil-(β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3d]pirimidint az 1-O-acetil-4-benzoiloximetil-2,3,5-tri-O-benzoil-D-ribofuranóz és a 4-amino-6-bróm-5-cianopirrolo[2,3-d]pirimidin reagáltatásával;

a 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(1,2,3,5-tetra-O-acetil-5(R)-C-metil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint az 1,2,3,5-tetra-O-acetil-5(R)-C-metil-D-ribofuranóz és a 4-amino-6-bróm-5-cianopirrolo[2,3-d]pirimidin reagáltatásával;

a 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(1,2,3,5-tetra-O-acetil-5(S)-C-metil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint az 1,2,3,5-tetra-O-acetil-5(S)-C-metil-D-ribofuranóz és a 4-amino-6-bróm-5-cianopirrolo[2,3-d]pirimidin reagáltatásával;

a 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(2,3-di-O-acetil-5-dezoxi- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint az 1,2,3-tri-O-acetil-5-dezoxi-D-ribofuranóz és a 4-amino-6-bróm-5-cianopirrolo[2,3-d]pirimidin reagáltatásával;

a 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-vinil- β -D-

-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint az 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-vinil- β -D-ribofuranóz és a 4-amino-6-bróm-5-cianopirrolo[2,3-d]pirimidin reagáltatásával.

4-Amino-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-allil- β -D-ribofuranozil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin előállítása [(20e) vegyület]

25 ml ecetsavban oldott 738 mg (1,0 mmol) 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-allil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidinhez két részletben, 1órás időközzel 1,04 g cink port (16,0 mmol) adtunk. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 20 órán át kevertettük majd szűrtük. A szűrletet szárazra pároltuk és a maradékot szilikagélen kromatografáltuk (etilacetát-hexán 1:1). 450 mg cím szerinti (20e) vegyületet kaptunk szintelen hab formájában.

A következő vegyületeket hasonlóan állítottuk elő:

a (20b) 4-amino-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R,S)-C-etenil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint (R/S arány: 1:1) a 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R,S)-C-etenil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidinből;

a (20c) 4-amino-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-vinil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint a 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-vinil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidinből.

4-Amino-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-propil- β -D-ribofuranozil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin előállítása [(20f) vegyület]

50 ml dioxánban szuszpendáltunk 400 mg (0.54 mmol) 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-allil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint, 10%-os Pd/C (100 mg, kb. 50% víz) katalizátort és 0,5 ml trietilamint. A szuszpenziót hidrogénező berendezésben (H_2 20 psi) 4 órán át rázattuk. A katalizátort leszűrtük és dioxánnal mostuk. A szűrleteket egyesítettük és bekonzcentráltuk, a maradékot szilikagélen kromatografáltuk (etilacetát-hexán 1:1). 340 mg cím szerinti (20f) vegyületet kap-

tunk színtelen hab formájában.

A következő vegyületeket hasonlóképpen állítottuk elő:

a (20d) 4-amino-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R,S)-C-etil-(β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint (R/S arány 1:1) a 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R,S)-C-etinil-(β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidinből;

a 4-amino-5-ciano-7-(4-benzoiloximetil-2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint a 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(4-benzoiloximetil-2,3,5-tri-O-benzoil-(β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidinből;

a (20a) 4-amino-5-ciano-7-(1,2,3,5-tetra-O-acetil-5(R)-C-metil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint a 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(1,2,3,5-tetra-O-acetil-5(R)-C-metil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidinből.

a (20a) 4-amino 5-ciano-7-(1,2,3,5-tetra-O-acetil-5(S)-C-metil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint a 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(1,2,3,5-tetra-O-acetil-5(S)-C-metil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidinből;

a 4-amino-5-ciano-7-(1,2, 3-tri-O-acetil-5-dezoxi- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint a 4-amino-6-bróm-5-ciano-7-(1,2,3-tri-O-acetil-5-dezoxi- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidinből;

a 4-amino-5-ciano-7-(2,3-didezoxi- β -D-glicero-pentofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint a 4-amino-5-ciano-7-(2,3-didezoxi- β -D-pent-2-enofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidinből.

4-Amino-5-ciano-7-(5 (R)-C-allil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2, 3-d]pirimidin előállítása [(23e) vegyület]

40 ml metanolban oldott 300 mg (0,454 mmol) 4-amino-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-allil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint 0 °C-on ammóniával telítettünk. Az oldatot 2 napon át szobahőmérsékleten állni hagytuk. Az oldószert elpárologtattuk és a maradékot 20 mg vízmentes nátriumacetáttal együtt 20 ml dimetilformamidban szuszpendáltuk. Az elegyet argonatmoszférában 5 órán át 120 °C-on kevertettük.

Az oldószeret elpárologtattuk. A maradékot szilikagélen adszorbeáltattuk majd a szilikagél oszlopról metanol-etilacetat (1:25) eleggyel eluáltuk. 145 mg cím szerinti vegyületet kaptunk szintelen szilárd anyag formájában.

A kapott terméket, ami főkomponensként (21) és (23) vegyületet tartalmazott, DMF-ben melegítettük. A vegyületeket szilikagélen végzett kromatográfiával választottuk el.

A (21) vegyületet elkülönítettük.

A következő vegyületeket hasonlóan állítottuk elő:

a (23f) 4-amino-5-ciano-7(5(R)-C-propil- β -D-ribofuranozil)pirrolo-[2,3-d]imidint a 4-amino-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-propil- β -D-ribofuranozil)-pirrolo[2,3-d]imidinből;

a (23b) 4-amino-5-ciano-7(5(R,S)-C-etenil- β -D-ribofuranozil)pirrolo-[2,3-d]imidint (R-S arány 1:1) a 4-amino-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R,S)-C-etenil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]imidinből;

a (23d) 4-amino-5-ciano-7-(5(R,S)-C-etil- β -D-ribofuranozil)pirrolo-[2,3-d]imidint (R-S arány 1:1) a 4-amino-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R,S)-C-etil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]imidinből;

a (33d) 4-amino-5-ciano-7-(4-hidroximetil- β -D-ribofuranozil)pirrolo-[2,3-d]imidint a 4-amino-5-ciano-7-(4-benzoiloximetil-2,3,5-tri-O-benzoil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]imidinből;

a (23a) (5'-R) 4-amino-5-ciano-7-(5(R)-C-metil- β -D-ribofuranozil)-pirrolo[2,3-d]imidint a 4-amino-5-ciano-7-(1,2,3,5-tetra-O-acetil-5(R)-C-metil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]imidinből;

a (23a) (5'-S) 4-amino-5-ciano-7-(5(S)-C-metil- β -D-ribofuranozil)-pirrolo[2,3-d]imidint a 4-amino-5-ciano-7-(1,1,3,5-tetra-O-acetil-5(S)-C-metil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]imidinből;

a (10) 4-amino-5-ciano-7-(5deoxi- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]imidint a 4-amino-5-ciano-7-(1,2,3-tri-O-acetil-5-deoxi- β -D-ribofuranozil)-pirrolo[2,3-d]imidinből;

a (23c) 4-amino-5-ciano-7-(5(R)-C-vinil- β -D-ribofuranozil)pirrolo-[2,3-d]pirimidint a 4-amino-5-ciano-7-(2,3,5-tri-O-benzoil-5(R)-C-vinil- β -D-ribofuranozil)pirrolo-[2,3-d]pirimidinből.

4-Amino-5-ciano-7-(2,3-di-O-metánszulfonil-5-O-terc-butil-difenilszilil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidin előállítása

5,83 g (20,0 mmol) (43) toyocamicin 100 ml vízmentes piridines oldatához kevertetés közben 0 °C-on 6,2 ml (24,0 mmol) terc-butil-klór-difenilszilánt adtunk.

A kapott elegyet szobahőmérsékleten 18 órán át kevertettük, majd 0 °C-ra hűtöttük és 3,4 ml (44,0 mmol) metánszulfonilkloridot adtunk hozzá.

A kapott elegyet szobahőmérsékleten 2 órán át kevertettük, jéggel hűtöttük, 2 ml víz hozzáadásával megbontottuk és szobahőmérsékleten további 30 percen át kevertettük. Az oldószert elpárologtattuk. A maradékot etilacetátban oldottuk, háromszor mostuk telített vizes nátriumklorid oldattal, nátriumszulfát felett szárítottuk és bekonzcentráltuk. Szilikagélen végzett kromatográfiás elválasztás után (etilacetát:hexán 3:1) 8,41 g cím szerinti vegyületet kaptunk szintelen szilárd anyag formájában.

4-Amino-5-ciano-7-(5-O-terc-butildifenilszilil-2,3-didehidro-2,3-didezoxi- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidin előállítása

640 mg (5,0 mmol) tellúr port 200 mesh szűrőn argon atmoszférában szitáltunk majd 11,25 ml-t adtunk hozzá lítium trietilbórhidrárt 1,0 molos tetrahidrofurános oldatából; az oldat 11,25 mmol lítium trietilbórhidrárt tartalmazott. Az elegyet szobahőmérsékleten 6 órán át kevertettük majd 5 °C-ra hűtöttük és hozzáadtunk 12 ml tetrahidrofuránban oldott 1,40 g (2,09 mmol) 4-amino-5-ciano-7-(2,3-di-O-metánszulfonil-5-O-terc-butildifenilszilil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint. A kapott elegyet szobahőmérsékleten kevertettük 18 órán át, jéggel hűtöttük majd 5 ml 0 °C-os víz hozzáadásával megbontottuk és szobahőmérsékleten 30 percen át kevertettük. Az oldószert elpárologtattuk és a maradékot etilacetáttal

extraháltuk. Az extraktumokat bekonzentráltuk és szilikagélen kromatografáltuk (15% etilacetátot tartalmazó hexánnal). 640 mg cím szerinti vegyületet kaptunk színtelen hab formájában.

4-Amino-5-ciano-7-(2,3-didehidro-2,3-didezoxi- β -D-ribofuranozi)pirrolo[2,3-d]pirimidin előállítása [(49) vegyület]

2,55 g (5,32 mmol) 4-amino-5-ciano-7-(5-O-terc-butildifenilszilil-2,3-didehidro-2,3-didezoxi- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]pirimidint 100 ml vízmentes tetrahidrofuránban oldottunk és kevertetés közben 5 °C-on hozzáadtunk 6,6 ml-t tetrabutilammónium fluorid 1,0 molos tetrahidrofurános oldatából. A kapott elegyet szobahőmérsékleten kevertettük 3 órán át majd bekonzentráltuk. Szilikagélen történő kromatografálás után (eluálás 6% metanolt tartalmazó etilacetáttal) 1,09 g cím szerinti (49) vegyületet kaptunk színtelen szilárd anyag formájában.

5-Ciano-7-(5(R)-C-metil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidon előállítása [(25a) vegyület]

306 mg (1,0 mmol) 4-amino-5-ciano-7-(5(R)-C-metil- β -D-ribofuranozil)-pirrolo[2,3-d]pirimidin és 2 ml ecetsav 30 ml vizes oldatához 55 °C-on kevertetés közben részletenként hozzáadtunk 590 mg (8,55 mmol) nátriumnitritet. A kapott elegyet 70 °C-on 3 órán át kevertettük majd további 300 mg (4,30 mmol) nátriumnitritet adtunk hozzá. Az elegyet ugyanezen a hőmérsékleten kevertettük további 18 órán át. Az oldószert eltávolítottuk és a maradékot szilikagélen kromatografáltuk (12 % metanolt tartalmazó metilénkloriddal). 210 mg cím szerinti (5'-R) (25a) vegyületet kaptunk színtelen hab formájában.

A következő vegyületeket hasonlóan állítottuk elő:

a (25a) (5'-S) 4-amino-5-ciano-7-(5(S)-C-metil- β -D-ribofuranozil)-pirrolo[2,3-d]-4-pirimidont a 4-amino-5-ciano-7-(5(S)-C-metil- β -D-ribofuranozil)-pirrolo[2,3-d]pirimidinből;

az (58) 4-amino-5-ciano-7- β -D-arabinofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-piri-

midont a 4-amino-5-ciano-7-(5-dezoxi- β -D-arabinofuranozil)pirrolo[2,3-d]-pirimidinből;

a (11) 4-amino-5-ciano-7-(5-dezoxi- β -D-ribofuranoszil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidont a 4-amino-5-ciano-7-(5-dezoxi-(β -D-ribofuranoszil)-pirrolo[2,3-d]pirimidinből;

az (50) 4-amino-5-ciano-7-(2,3-didezoxi-2,3-didehidro- β -D-glicero-pentofuranoszil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidont a 4-amino-5-ciano-7-(2,3-didezoxi- β -D-pent-2-enofuranoszil)pirrolo[2,3-d]pirimidinből;

a (65) 4-amino-5-ciano-7-(2,3-didezoxi-(β -D-glicero-pentofuranoszil)-pirrolo[2,3-d]-4-pirimidont a 4-amino-5-ciano-7-(2,3-didezoxi-(β -D-glicero-pentofuranoszil)pirrolo[2,3-d]primidinből;

a (69) 4-amino-5-ciano-7-(2-dezoxi- β -D-furanoszil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidont a 4-amino-5-ciano-7-(2-dezoxi- β -D-eritropentofuranoszil)pirrolo[2,3-d]pirimidinből;

7-(5(R)-C-Metil- β -D-ribofuranoszil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidon-5-karboxamidoxim előállítás [(24a) vegyület]

50 ml etanolban szuszpendáltunk 240 mg (0.784 mmol) 5-ciano-7-(5(R)-C-metil- β -D-ribofuranoszil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidont, 163 mg (2,352 mmol) hidroxilamin hidrokloridot és 162 mg (1,176 mmol) kálium karbonátot és argon atmoszférában 18 órán át kevertettük. A csapadékot leszűrjük és meleg etanollal mostuk. A szűrletet bekonzentráltuk és a maradékot szilikagélen kromatografáltuk (20 % metanol metilén kloridban). 170 mg cím szerinti (26a) (5'-R) vegyületet kaptunk szintelen szilárd anyag formájában.

A következő vegyületeket hasonlóan állítottuk elő:

a (60) 4-amino-5-ciano-7-((3-D-arabinofuranoszil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidon-5-karboxamidoximot a 4-amino-5-ciano-7-(5-dezoxi- β -D-arabinofuranoszil)-pirrolo[2,3-d]-4-pirimidonból;

a (13) 4-amino-5-ciano-7-(5-dezoxi- β -D-ribofuranoszil)pirrolo[2,3-d]-4-

-pirimidon-5-karboxamidoximot a 4-amino-5-ciano-7-(5-dezoxi- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidonból;

az (51) 4-amino-5-ciano-7-(2,3-didehidro-2,3-didezoxi- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidon-5-karboxamidoximot a 4-amino-5-ciano-7-(2,3-didehidro-2,3-didezoxi- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidonból;

a 4-amino-5-ciano-7-(2-dezoxi- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidon-5-karboxamidoximot a 4-amino-5-ciano-7-(2-dezoxi- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidonból;

7-(5(R)-C-Metil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidon-5-karboxamidin-hidroklorid előállítása [(27a) vegyület]

75 ml vízben szuszpendáltunk 110 mg (0,324 mmol) 7-(5(R)-C-metil- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidon-5-karboxamidoximot, 20 mg (0,374 mmol) ammóniumkloridot és 200 mg Raney nikkelt (50%-os vizes diszperzió); majd hidrogénező berendezésben rázattuk (H_2 50 psi) szobahőmérsékleten 18 órán át. A katalizátort leszűrtük és meleg vízzel mostuk.

Az egyesített szűrleteket bekonzentráltuk és a terméket metanolból átkristályosítottuk. 100 mg cím szerinti (27a) (5'-R) vegyületet kaptunk szintelen szilárd anyag formájában.

A következő vegyületeket hasonlóan állítottuk elő:

a (63) 4-amino-5-ciano-7-(β -D-arabinofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidon-5-karboxamidin hidrokloridot a 4-amino-5-ciano-7-(5-dezoxi- β -D-arabinofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidon-5-karboxamidoximból;

a (15) 4-amino-5-ciano-7-(5-dezoxi- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidon-5-karboxamidin hidrokloridot a 4-amino-5-ciano-7-(5-dezoxi- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidon-5-karboxamidoximból;

a (70) 4-amino-5-ciano-7-(2-dezoxi-(β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidon-5-karboxamidin hidrokloridot a 4-amino-5-ciano-7-(2-dezoxi-

- β -D-ribofuranozil)pirrolo[2,3-d]-4-pirimidon-5-karboxamidoximból.

A fentiekben bemutattuk a pirrolo[2,3-d]pirimidin nukleozidok különböző megvalósítási módjait és alkalmazásait. A szakember számára azonban nyilvánvaló, hogy a találmány tárgyán belül a fentiekben leírtak nagyon sokféle módosítása lehetséges. A találmányt meghatározására csak az igénypontok szolgálnak. A megvalósítási módok és az igénypontok értelmezése során minden meghatározást a lehető legszélesebb értelemben használunk. Különösen a "tartalmazza" "tartalmazó" kifejezésekkel elemekre, lépésekre és komponensekre utalunk és nem kizárólagos meghatározásokat adunk, vagyis az elemek, komponensek és lépések más olyan elemekkel, komponensekkel és lépésekkel együtt lehetnek jelen vagy azokkal együtt alkalmazzuk őket, amelyekre nem utalunk kifejezetten.

Szabadalmi igénypontok:

1. (I) általános képletű nukleozid-származékok, ahol

- A jelentése oxigén- vagy kénatom vagy metilénecsoporth;
- X jelentése hidrogénatom, amino- vagy hidroxicsoporth;
- Y jelentése hidrogénatom, halogénatom vagy aminocsoport;
- Z jelentése hidrogén- vagy halogénatom vagy -R, -OH, -OR, -SH, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -CN, -C(O)NH₂, -COOH, -COOR, -CH₂NH₂, -C(=NOH)NH₂ vagy -C(=NH)NH₂ képletű csoport, ahol R jelentése alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport,
- R₂ és R₃ jelentése egymástól függetlenül hidrogén- vagy fluoratom vagy hidroxicsoporth;
- R₄ jelentése hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport, ahol R₄ adott esetben heteroatomot és/vagy funkciós csoportot tartalmaz;
- R₅ jelentése hidroxicsoporth, -OP(O)(OH)₂, -P(O)(OH)₂ képletű vagy -OP(O)(OR')₂ vagy -P(O)(OR')₂ általános képletű csoport, és
- R' jelentése védőcsoport,
- R_{5'} jelentése alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport, ahol R_{5'} legalább két szénatomot tartalmaz és adott esetben heteroatomot és/vagy funkciós csoportot tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti nukleozid-származékok, ahol Z jelentése cianocsoport, -C(O)NH₂ vagy -C(=NH)NH₂ képletű csoport és R_{5'} legalább két szénatomot tartalmaz és jelentése alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport.

3. Az 1. igénypont szerinti nukleozid-származékok körébe tartozó (Ia) általános képletű vegyületek, ahol

- Z jelentése ciano-, -C(O)NH₂, -C(=NH)NH₂ vagy -C(=NOH)NH₂ képletű csoport és



R_4 és R_5 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport és R_4 és R_5 adott esetben egymástól függetlenül heteroatomot és/vagy funkciós csoportot tartalmaz, azzal a megkötéssel, hogy R_4 és R_5 nem lehet egyszerre hidrogénatom.

4. Egy (II) általános képletű vegyület - ahol a (II) általános képletben

A jelentése oxigén- vagy kénatom vagy metiléncsoport; X jelentése hidrogénatom, amino- vagy hidroxics csoport; Y jelentése hidrogén- vagy halogénatom vagy aminocsoport;

Z jelentése hidrogénatom, halogénatom, R, -OH, -OR, -SH, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -CN, -C(O)NH₂, -COOH, -COOR, -CH₂NH₂, -C(=NOH)NH₂ vagy -C(=NH)NH₂ képletű csoport, ahol R jelentése alkil-, alkenil- alkinil- vagy aralkilcsoport;

R_2 és R_3 egymástól függetlenül hidrogén- vagy fluoratom vagy hidroxics csoport;

R_4 és R_5 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport, ahol R_4 és R_5 adott esetben egymástól függetlenül egy heteroatomot és/vagy funkciós csoportot tartalmaz;

R_5 jelentése hidrogénatom vagy -OH, -OP(O)(OH)₂, -P(O)(OH)₂ képletű vagy -OP(O)(OR')₂ vagy -P(O)(OR')₂ általános képletű csoport, ahol R' jelentése védőcsoport -,

alkalmazása sejt citokin kiválasztásának megváltoztatására szolgáló gyógyszer előállítására, amely gyógyszerrel a (II) általános képletű vegyület a sejt citokin kiválasztásának megváltoztatására képes koncentrációban juttatható el a sejthez.

5. A 4. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a citokin egy 1-es típusú citokin.

6. Az 5. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy az 1-es típusú citokin az IFN γ .

7. A 4. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a citokin egy 2-es típusú citokin.

8. A 7. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a 2-es típusú citokin az IL-4.

9. A 4. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a sejt egy limfocita.

10. A 4. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a sejt egy rákos sejt.

11. A 10. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a rákos sejt egy prosztatata rákos sejt.

12. Egy (III) általános képletű vegyület – ahol a (III) általános képletben

Z jelentése $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{NNH}_2)\text{NH}_2$ vagy $-\text{C}(=\text{NOH})\text{NH}_2$ képletű csoport, ahol R_5 jelentése hidrogénatom, hidroxicsoprot, $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ képletű vagy $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}')_2$ vagy $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')_2$ általános képletű csoport, ahol R' jelentése védőcsoport,

alkalmazása sejt citokin kiválasztásának megváltoztatására szolgáló gyógyszer előállítására, amely gyógyszerrel a (III) általános képletű vegyület a sejt citokin kiválasztásának megváltoztatására képes koncentrációban juttatható el a sejthez.

13. Egy (IV) általános képletű vegyület - ahol

A jelentése O, S vagy $-\text{CH}_2-$;

X jelentése hidrogénatom, amino- vagy hidroxicsoprot;

Y jelentése hidrogén- vagy halogénatom vagy aminocsoport;

Z jelentése hidrogénatom, halogénatom, R, $-\text{OH}$, $-\text{OR}$, $-\text{SH}$, $-\text{SR}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{COOR}$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{NOH})\text{NH}_2$ vagy $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ képletű csoport, ahol R jelentése alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport;

R_2 és R_3 jelentése egymástól függetlenül hidrogén- vagy fluoratom vagy hidroxicsoport;

R_4 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkil-, alkenil- vagy alkinil- vagy aralkilcsoport, ahol R_4 adott esetben egy heteroatomot és/vagy egy funkciós csoportot tartalmaz;

R_5 jelentése hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil- vagy aralkilcsoport, ahol R_5 legalább két szénatomot és adott esetben egy heteroatomot és/vagy egy funkciós csoportot tartalmaz;

R_5 jelentése hidrogénatom, $-OH$, $-OP(O)(OH)_2$, $-P(O)(OH)_2$ képletű vagy $-OP(O)(OR')_2$ vagy $-P(O)(OR')_2$ általános képletű csoport, ahol R' jelentése védőcsoport, azzal a megkötéssel, hogy R_4 és R_5 nem jelenthet egyszerre hidrogénatomot -,

alkalmazása egy hiperproliferatív sejt szaporodásának gátlására szolgáló gyógyszer előállítására, amely gyógyszerrel a (IV) általános képletű vegyület a sejt szaporodását gátló koncentrációban juttatható el a hiperproliferatív sejthez.

14. A 13. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a hiperproliferatív sejt egy rákos sejt.

15. A 14. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a rákos sejt egy prosztatarák sejt.

16. A 13. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a sejt szaporodásának gátlása magában foglalja a DNS szintézis gátlását.

17. Egy 1. igénypont szerinti vegyület alkalmazása sejt szaporodási faktor kibocsátásának gátlására szolgáló gyógyszer előállítására, amely gyógyszerrel az 1. igénypont szerinti vegyület olyan koncentrációban juttatható a sejthez, amely képes a sejt szaporodási faktor kibocsátásának gátlására.

18. A 17. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a szaporodási faktor a VEGF.

19. A 17. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a sejt egy rákos sejt.

20. A 19. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a rákos sejt egy prosztatatarák sejt.

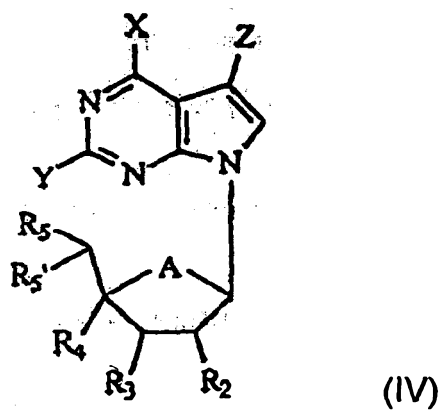
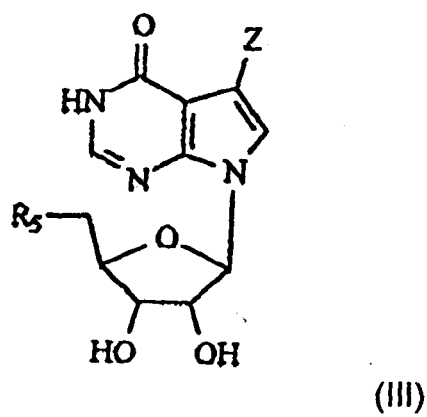
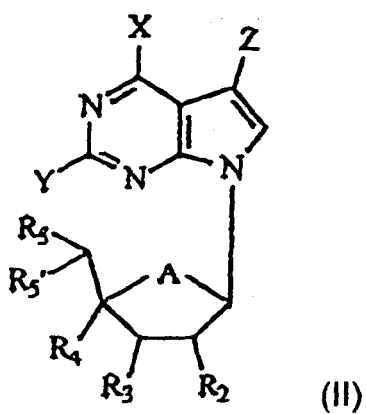
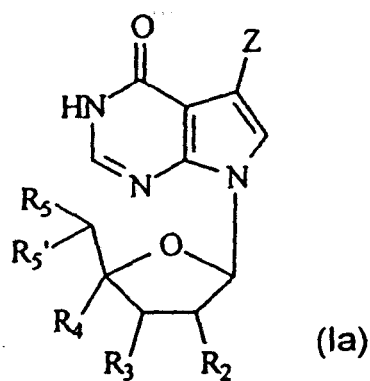
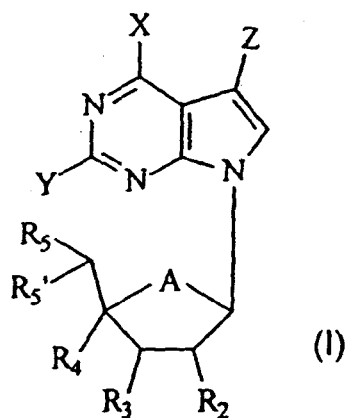
A bejelentő helyett
a meghatalmazott:

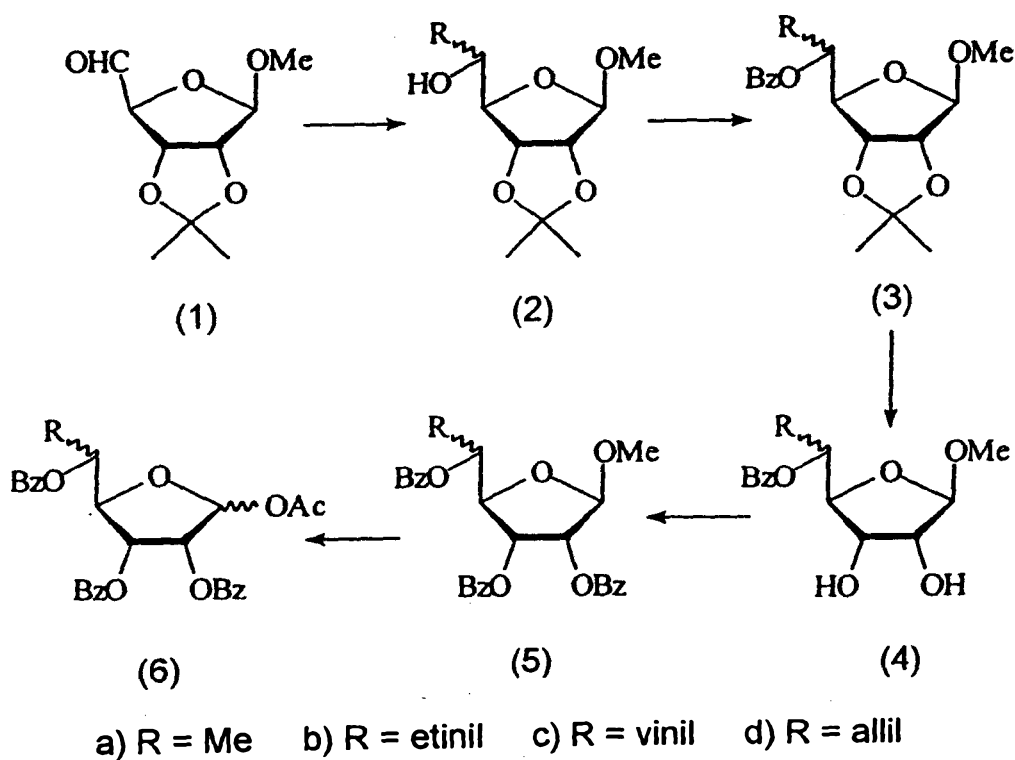
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Molnár Imre
szabadalmi ügyvivő

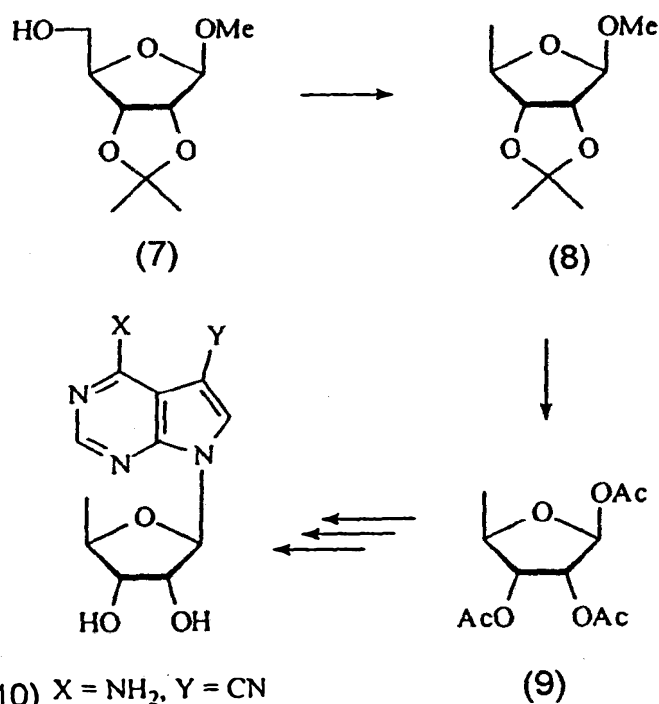
8. lép. rajzról
JPP
03-VII-QX

AR



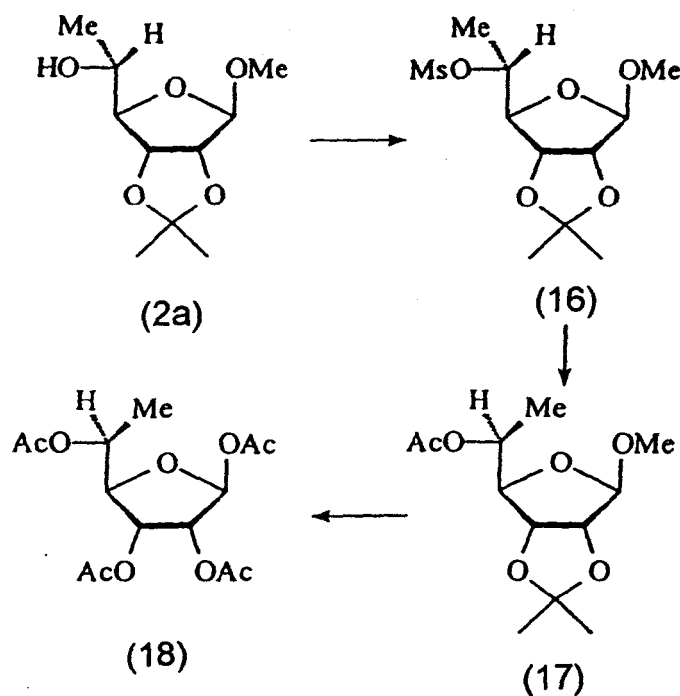


1. ábra

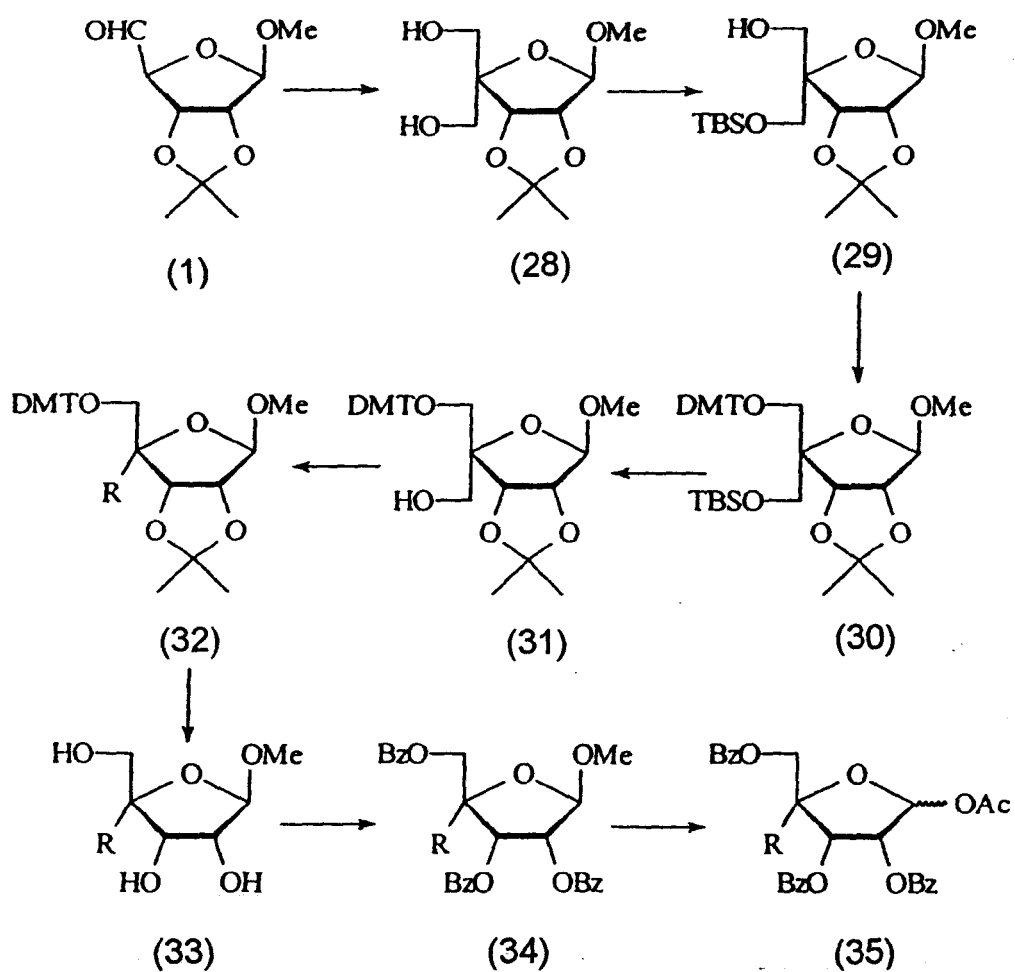


2. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



3. ábra



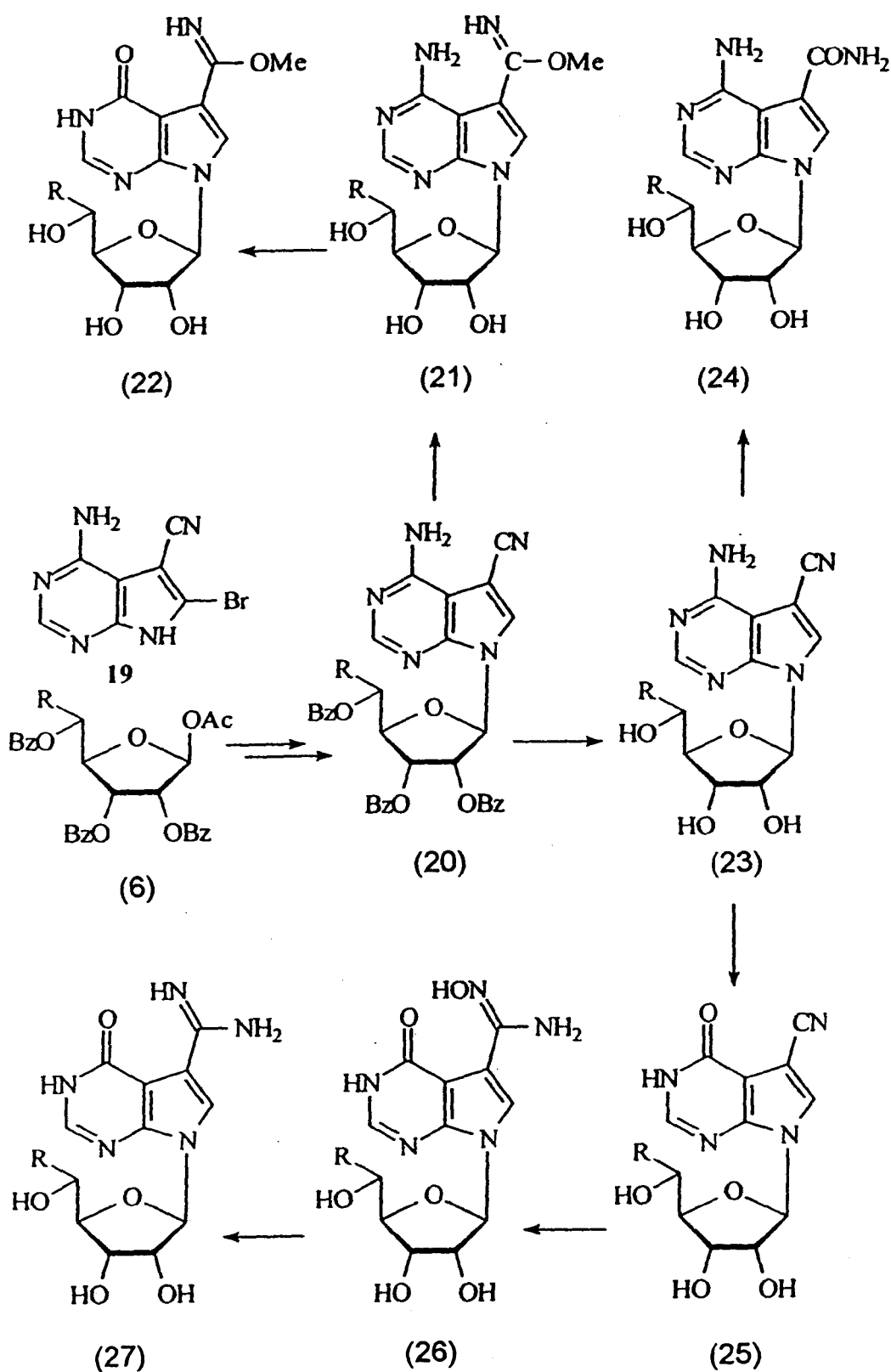
a) R = metil

b) R = vinil

c) R = etil

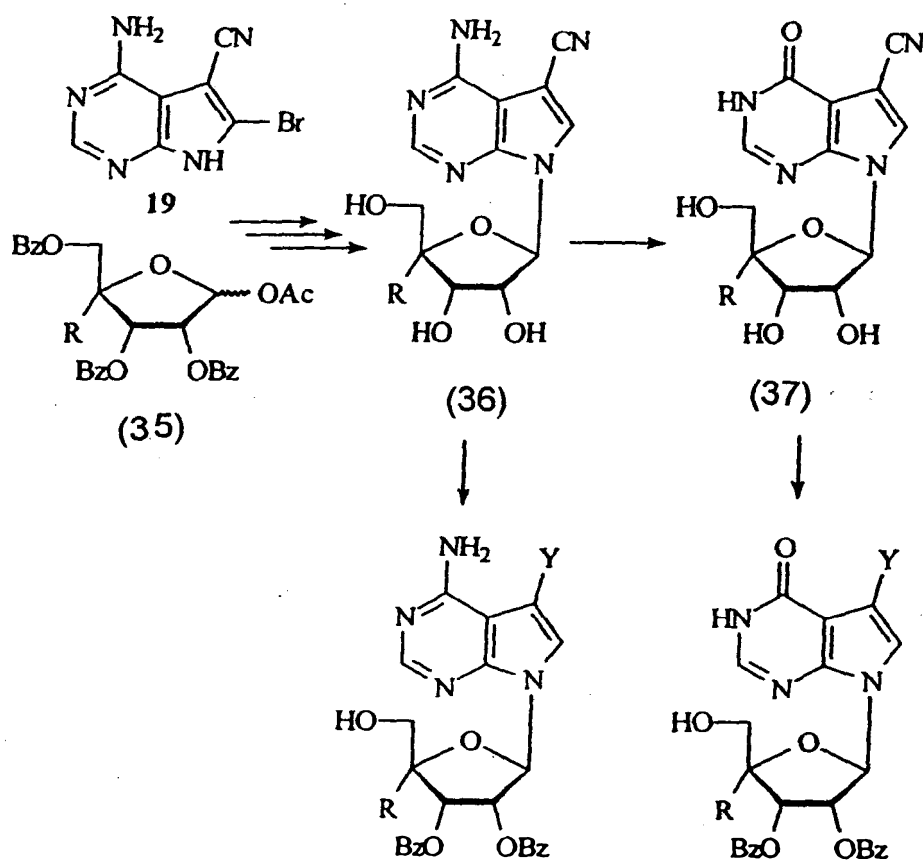
d) R = HOCH₂

5. ábra

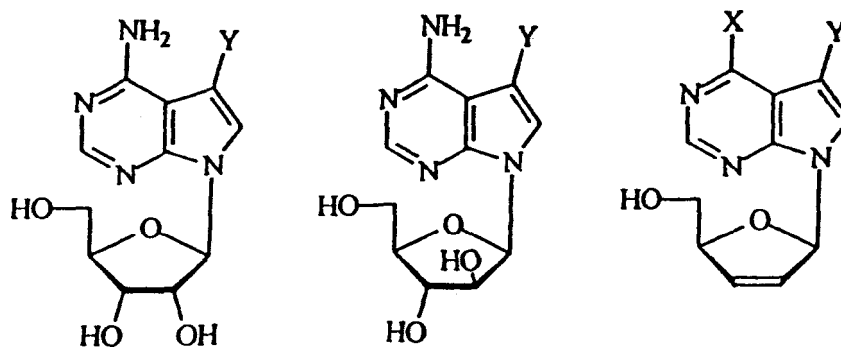


a) R = Me b) R = etinil c) R = vinil
 d) R = etil e) R = allil f) R = propil

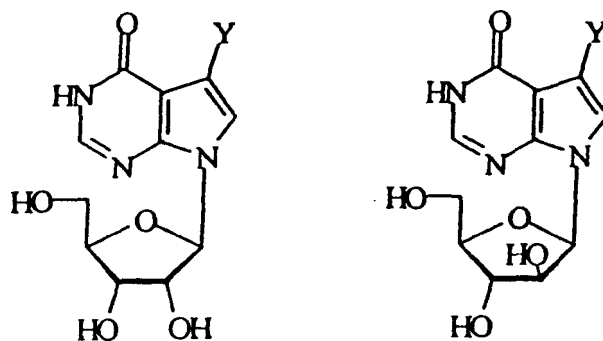
4. ábra



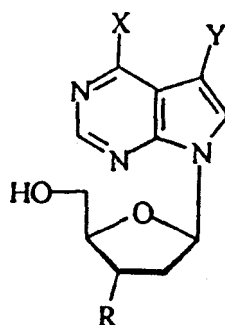
6. ábra



- (43) $Y = \text{CN}$ (45) $Y = \text{CN}$ (49) $X = \text{NH}_2, Y = \text{CN}$
 (44) $Y = \text{C}(=\text{NH})\text{OMe}$ (46) $Y = \text{C}(=\text{NH})\text{OMe}$ (50) $X = \text{OH}, Y = \text{CN}$
 (47) $Y = \text{CH}_2\text{NH}_2$ (51) $X = \text{OH}$
 (48) $Y = \text{C}(=\text{NNH}_2)\text{NH}_2$ $Y = \text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$



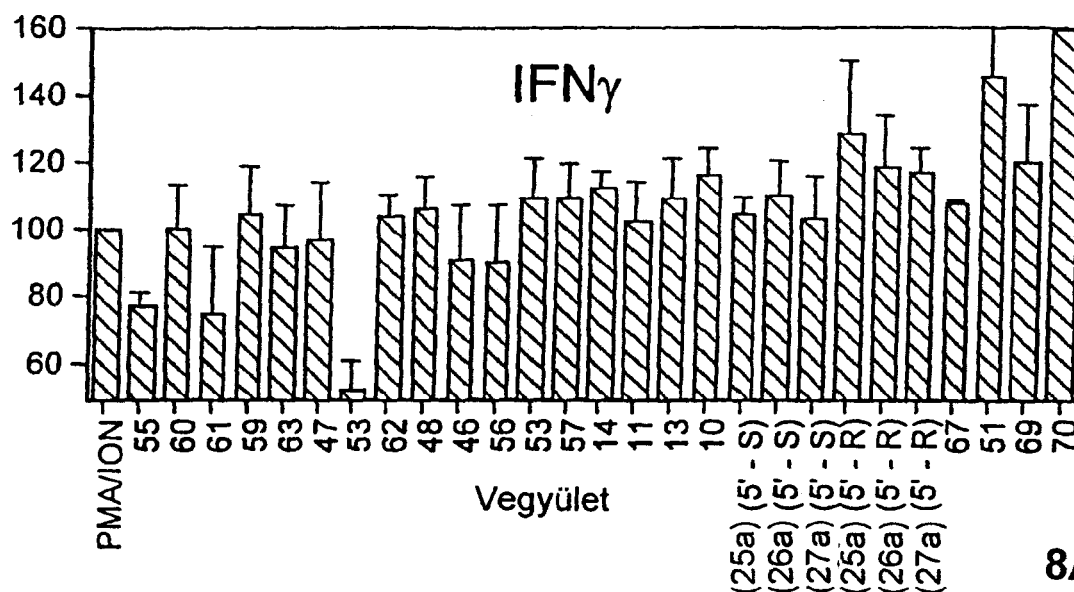
- (52) $Y = \text{CN}$ (58) $Y = \text{CN}$
 (53) $Y = \text{C}(=\text{NH})\text{OMe}$ (59) $Y = \text{C}(=\text{NH})\text{OMe}$
 (54) $Y = \text{C}(=\text{NOH})\text{NH}_2$ (60) $Y = \text{C}(=\text{NOH})\text{NH}_2$
 (55) $Y = \text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ (61) $Y = \text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$
 (56) $Y = \text{CH}_2\text{NH}_2$ (62) $Y = \text{CH}_2\text{NH}_2$
 (57) $Y = \text{C}(=\text{NNH}_2)\text{NH}_2$ (63) $Y = \text{C}(=\text{NNH}_2)\text{NH}_2$



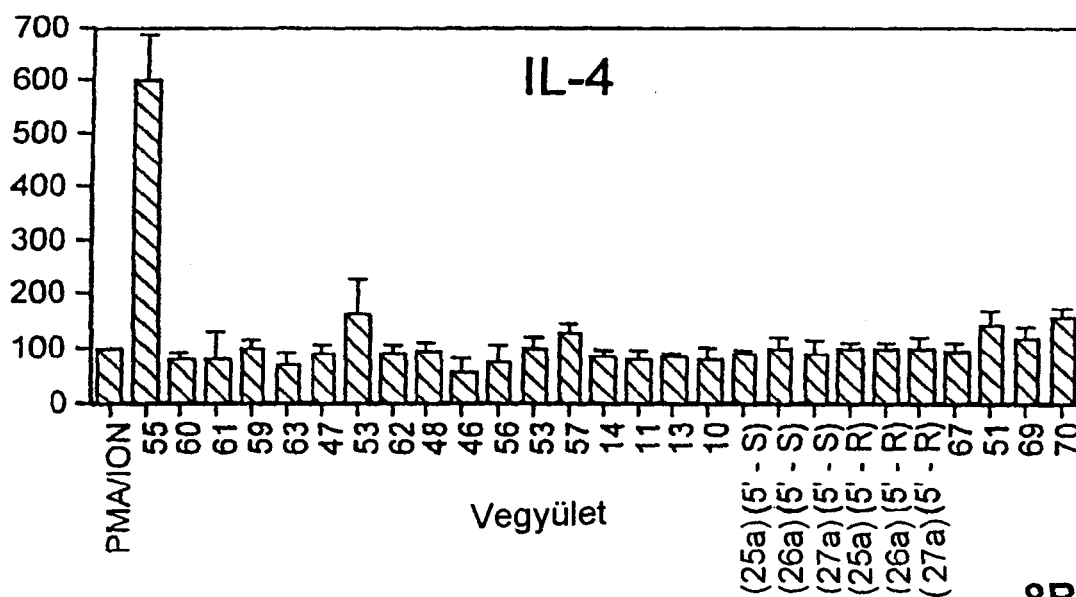
- (64) $X = \text{NH}_2, Y = \text{CN}, R = \text{H}$
 (65) $X = \text{OH}, Y = \text{CN}, R = \text{H}$
 (66) $X = \text{OH}, Y = \text{C}(=\text{NOH})\text{NH}_2, R = \text{H}$
 (67) $X = \text{OH}, Y = \text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2, R = \text{H}$
 (68) $X = \text{NH}_2, Y = \text{CN}, R = \text{OH}$
 (69) $X = \text{OH}, Y = \text{CN}, R = \text{OH}$
 (70) $X = \text{OH}, Y = \text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2, R = \text{OH}$

7. ábra

Aktivált kontroll átlagos %

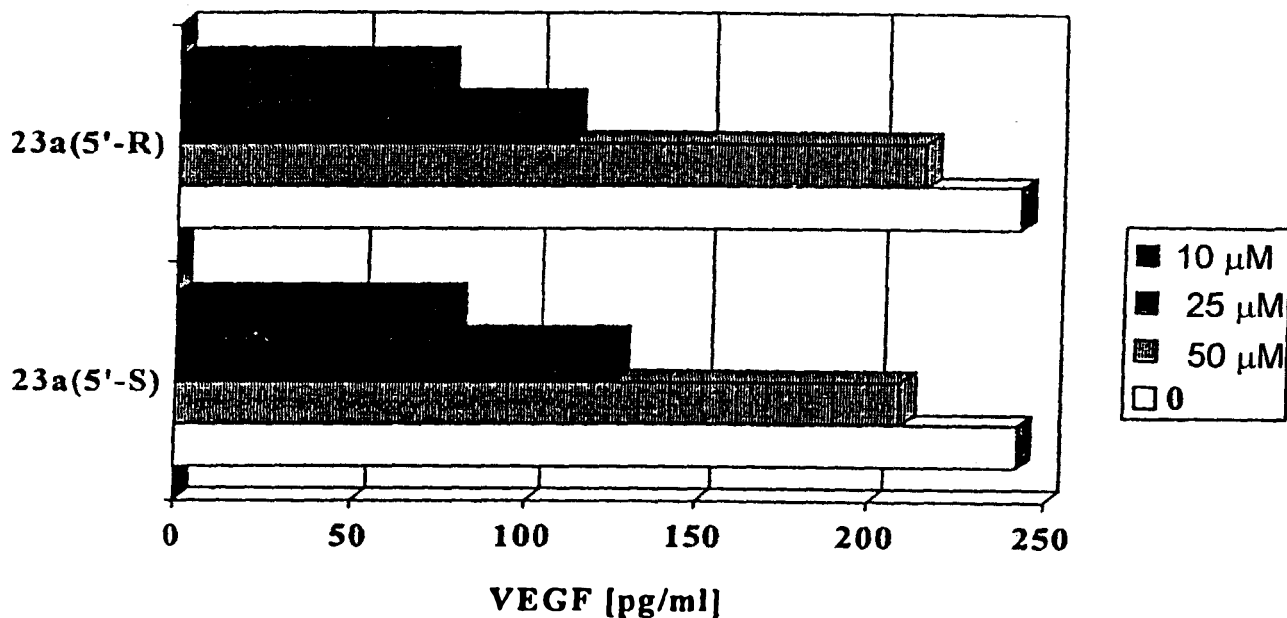


8A ábra



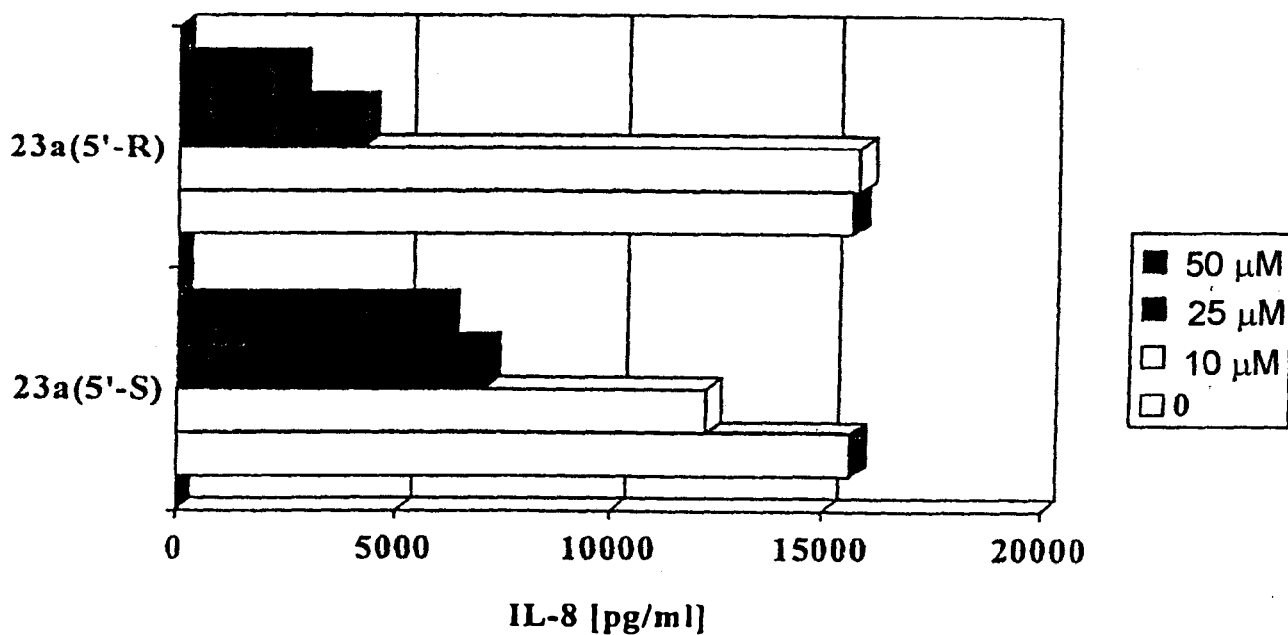
8B ábra

A VEGF kibocsátás gátlása a (23a) vegyületekkel kezelt HTB 81 sejtekben



9. ábra

Az IL-8 kibocsátás gátlása a (23a) vegyületekkel kezelt HTB 81 sejtekben



10. ábra