

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) 66207 B1

(51) Int.Cl.

C 07 H 19/14 (2006.01)

A 61 K 31/7064 (2006.01)

A 61 P 31/14 (2006.01)

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

- (21) Заявителски № 108000
(22) Заявено на 17.07.2003
(24) Начало на действие
на патента от: 18.01.2002

Приоритетни данни

- | | | |
|-------------|-----------------|---------|
| (31) 263313 | (32) 22.01.2001 | (33) US |
| 282069 | 06.04.2001 | US |
| 299320 | 19.06.2001 | US |
| 344528 | 25.10.2001 | US |

- (41) Публикувана заявка в
бюлетин № 8 на 31.08.2004
(45) Отпечатано на 02.05.2012
(46) Публикувано в бюлетин № 4
на 02.05.2012
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

- (73) Патентоприитежател(и):
ISIS PHARMACEUTICALS, INC., 92008
CARLSBAD, 2292 FARADAY AVENUE,
CALIFORNIA; MERCK SHARP & DOHME
CORP., 07065 RAHWAY, 126 EAST
LINCOLN AVENUE, NEW JERSEY (US)

- (72) Изобретател(и):
Steven S. Carroll;
Malcolm MacCoss;
David B. Olsen,
07065-0907 Rahway New Jersey;
Balkrishen Bhat;
Neelima Bhat;
Phillip Dan Cook;
Anne B. Eldrup;
Thazha P. Prakash;
Marija Prhavc;
Quanlai Song,
92008 Carlsbad California (US)

- (74) Представител по индустриална
собственост:
Румяна Стефанова Слабова, 1124
София, ул. "Леонардо да Винчи" 3

- (86) № и дата на РСТ заявка:
PCT/US2002003086, 18.01.2002

- (87) № и дата на РСТ публикация:
WO2002057287, 25.07.2002

(54) НУКЛЕОЗИДНИ ПРОИЗВОДНИ, ИЗПОЛЗВАНИ КАТО ИНХИБИТОРИ НА ЗАВИСИМА ОТ РНК, РНК ВИРУСНА ПОЛИМЕРАЗА

(57) Изобретението се отнася до нуклеозидни съединения и до някои техни производни, които са инхибитори на РНК-зависимата вирусна РНК полимераза. Тези съединения са инхибитори на РНК-зависимата вирусна РНК репликация и се използват при лечението на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция. Те са полезни и като инхибитори на хепатит С вирусната (HCV) NS5B полимераза, като инхибитори на HCV репликацията и/или за лечението на хепатит С инфекция. Изобретението се отнася също така до фармацевтични състави, съдържащи нуклеозидните съединения самостоятелно или в комбинация с други средства, активни срещу РНК-зависимата вирусна РНК инфекция, по-специално HCV инфекция. Изобретението се отнася и до методи за потискане на РНК-зависимата РНК полимераза и на РНК-зависимата вирусна РНК репликация, и/или за лечение на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция с нуклеозидните съединения от изобретението.

(54) НУКЛЕОЗИДНИ ПРОИЗВОДНИ, ИЗПОЛЗВАНИ КАТО ИНХИБИТОРИ НА ЗАВИСИМА ОТ РНК, РНК ВИРУСНА ПОЛИМЕРАЗА

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до нуклеозидни съединения и до някои техни производни, до техния синтез и тяхното използване като инхибитори на РНК-зависимата вирусна РНК полимераза. Съединенията от настоящото изобретение са инхибитори на РНК-зависимата вирусна РНК репликация и са полезни за лечението на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция. Те са особено полезни като инхибитори на хепатит С вирусната (HCV) NS5B полимераза, като инхибитори на HCV репликацията и за лечението на хепатит С инфекция.

Предшестващо състояние на техниката

Вирусната хепатит С инфекция (HCV) е основен здравословен проблем, който води до хронично чернодробно заболяване, такова като цироза и хепатоклетъчна карцинома в голяма част от инфектираните индивиди, която е оценена, че приблизително е 2-15 % от световната популация. Съгласно U. S. Центъра за контрол на заболяемостта се съобщава, че само в Съединените щати има 4.5 милиона заразени хора. Съгласно Световната Здравна Организация, има повече от 200 милиона заразени индивида в целия свят, като всяка година се заразяват поне от 3 до 4 милиона души. Веднъж инфектирани, около 20 % от хората се освобождават от вируса, но останалата част носят вируса HCV през остатъка от живота си. От десет до двадесет процента от хронично инфектираните индивиди развиват евентуално цироза, разрушаваща черния дроб или рак. Вирусното заболяване се пренася парентерално чрез заразна кръв и кръвни продукти, замърсени игли или по полов и вертикален път от инфектирани майки или майките износващи плода. Понастоящем лечението на HCV инфекцията, което се ограничава до имунотерапия само с рекомбинантен интерферон-алфа или в комбинация с нуклеозидния аналог рибавирин, има ограничен благоприятен клиничен ефект. Освен това няма установена ваксина за HCV.

Следователно, има остра нужда от по-добри терапевтични средства, които да са ефективни срещу борбата с хроничната HCV инфекция.

Направен е преглед за положението на не-

- щата от нивото на техниката за лечение на HCV инфекция и е направена справка със следните публикации: B. Dymock, et al., "Novel approaches to the treatment of hepatitis C virus infection," *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 11: 79-96 (2000); H. Rosen, et al., "Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies", *Molecular Medicine Today*, 5: 393-399 (1999); D. Moradpour, et al., "Current and evolving therapies for hepatitis C", *European J. Gastroenterol. Hepatol.*, 11: 1189-1202 (1999); R. Bartenschlager, "Candidate Targets for Hepatitis C Virus-Specific Antiviral Therapy", *Intervirology*, 40: 378-393 (1997); G. M. Lauer and B. D. Walker, "Hepatitis C Virus Infection", *N. Engl. J. Med.*, 345: 41-52 (2001); B. W. Dymock, "Emerging therapies for hepatitis C virus infection", *Emerging Drugs*, 6: 13-42 (2001); и C. Crabb, "Hard-Won Advances Spark Excitement about Hepatitis C", *Science*: 506-507 (2001); като съдържанието на всяка една от тях е включено изцяло тук в цитираната литература.

Предприети са различни подходи при терапията на HCV, които включват потискане на вирусната серинова протеиназа (NS3 протеаза), хеликаза и РНК-зависимата РНК полимераза (NS5B) и разработването на ваксина.

- HCV вирионът е опакован положително-верижен РНК вирус с единична олигонуклеотидна геномна секвенция от около 9600 бази, която кодира полипептид от около 3,010 аминокиселини. Белтъчните продукти на HCV гена се състоят от структурните белтъци С, Е1 и Е2 и от неструктурните белтъци NS2, NS3, NS4А и NS4В, и NS5А, и NS5В. Счита се, че неструктурните (NS) белтъци имат каталитична функция за вирусната репликация. NS3 протеазата освобождава NS5В, РНК-зависимата РНК полимераза от полипептидната верига.

- HCV NS5B полимеразата е необходима за синтеза на двойноверижна РНК от едноверижна вирусна РНК, която служи като матрица в репликационния цикъл на HCV. Следователно NS5B полимеразата се счита като много важен компонент в репликационния комплекс на HCV [виж

K. Ishi, et al., "Expression of Hepatitis C Virus NS5B Protein: Characterization of Its RNA Polymerase Activity and RNA Binding", *Hepatology*, 29: 1227-1235 (1999) и V. Lohmann, et al., "Biochemical and Kinetic Analyses of NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase of the Hepatitis C Virus", *Virology*, 249: 108-118 (1998)].
 Инхибирането на HCV NS5B полимеразата възпрепятства образуването на двойноверижна HCV RNA и следователно представлява един атрактивен подход за създаването на HCV-специфични антивирусни терапии.

Днес е открито, че нуклеозидните съединения от настоящото изобретение и някои техни производни, са мощни инхибитори на РНК-зависимата РНК вирусна репликация и по-специално на HCV репликацията. 5'-трифосфатните производни на тези нуклеозидни съединения са инхибитори на РНК-зависимата вирусна РНК полимераза и по-специално на HCV NS5B полимеразата. Настоящите нуклеозидни съединения и техните производни са полезни за лечение на РНК-зависима вирусна РНК инфекция и по-специално на HCV инфекцията.

Следователно, цел на настоящото изобретение е да осигури нуклеозидни съединения и някои техни производни, които са полезни като инхибитори на РНК-зависимата вирусна РНК полимераза и по-специално като инхибитори на HCV NS5B полимеразата.

Друга цел на настоящото изобретение е да осигури нуклеозидни съединения и някои техни производни, които са полезни като инхибитори на репликацията на РНК-зависимата вирусна РНК и по-специално като инхибитори на репликацията на хепатит С вируса.

Друга цел на настоящото изобретение е да осигури нуклеозидни съединения и някои техни производни, които са полезни за лечението на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция и по-специално за лечението на HCV инфекцията.

Друга цел на настоящото изобретение е да осигури фармацевтични състави, включващи нуклеозидните съединения от настоящото изобретение, свързани с фармацевтично приемлив носител.

Друга цел на настоящото изобретение е да осигури фармацевтични състави, включващи нуклеозидните съединения и техните производни от настоящото изобретение, за използва-

нето им като инхибитори на РНК-зависимата вирусна РНК полимераза и по-специално като инхибитори на HCV NS5B полимеразата.

Друга цел на настоящото изобретение е да осигури фармацевтични състави, включващи нуклеозидните съединения и техните производни от настоящото изобретение, за използването им като инхибитори на РНК-зависимата вирусна РНК репликация и по-специално като инхибитори на HCV репликацията.

Друга цел на настоящото изобретение е да осигури фармацевтични състави, включващи нуклеозидните съединения и техните производни от настоящото изобретение, за използването им при лечението на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция и по-специално при лечението на HCV инфекцията.

Друга цел на настоящото изобретение е да осигури фармацевтични състави, включващи нуклеозидните съединения и техните производни от настоящото изобретение, в комбинация с други средства, активни срещу РНК-зависимата вирусна РНК и по-специално срещу HCV.

Друга цел на настоящото изобретение е да осигури методи за потискане на РНК-зависимата вирусна РНК полимераза и по-специално за потискане на HCV NS5B полимеразата.

Друга цел на настоящото изобретение е да осигури методи за потискане на РНК-зависимата вирусна РНК репликация и по-специално за потискане на HCV репликацията.

Друга цел на настоящото изобретение е да осигури методи за лечението на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция и по-специално за лечението на HCV инфекцията.

Друга цел на настоящото изобретение е да осигури методи за лечението на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция, в комбинация с други средства, активни срещу РНК-зависимата вирусна РНК и по-специално за лечението на HCV инфекцията в комбинация с други средства, активни срещу HCV.

Друга цел на настоящото изобретение е да осигури нуклеозидни съединения и някои техни производни и техни фармацевтични състави, за използването им като лекарствен препарат за потискането на РНК-зависимата вирусна РНК репликация и/или за лечението на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция и по-специално за потискане на HCV репликацията и/или за лечени-

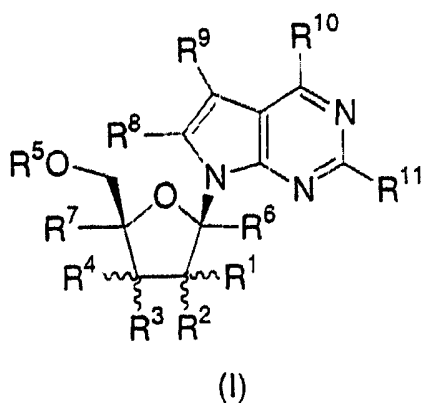
ето на HCV инфекция.

Друга цел на настоящото изобретение е да осигури използването на нуклеозидните съединения и някои техни производни от настоящото изобретение и на техни фармацевтични състави, за производството на лекарствен препарат за потискането на РНК-зависимата вирусна РНК репликация и/или за лечението на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция и по-специално за потискането на HCV репликацията и/или за лечението на HCV инфекция.

Тези цели както и другите ще станат очевидни от подробното описание, което следва.

Техническа същност на изобретението

Настоящото изобретение се отнася до съединения със структурна формула I, с посочената стереохимична конфигурация:



или фармацевтично приемлива тяхна сол; където

R^1 е C_{2-4} алкенил, C_{2-4} алкинил или C_{1-4} алкил, където алкилът не е заместен или е заместен с хидроксид, amino, C_{1-4} алкокси, C_{1-4} алкилтио, или с един до три флуорни атома;

R^2 е водород, флуор, хидроксид, меркапто, C_{1-4} алкокси или C_{1-4} алкил; или R^1 и R^2 заедно с въглеродния атом, към който те са прикрепени, образуват от 3- до 6-членна наситена моноциклическа пръстеновидна система, съдържаща по избор хетероатом, избран от O, S и NC_{0-4} алкил;

R^3 и R^4 , всеки един от тях е независимо избран от групата, съставена от водород, циано, азидо, халоген, хидроксид, меркапто, amino, C_{1-4} алкокси, C_{2-4} алкенил, C_{2-4} алкинил и C_{1-4} алкил, където алкилът не е заместен или е заместен с хидроксид, amino, C_{1-4} алкокси, C_{1-4} алкилтио, или с един до три флуорни атома;

R^5 е водород, C_{1-10} алкилкарбонил, $P_3O_9H_4$, $P_2O_6H_3$, или $P(O)R^{13}R^{14}$;

R^6 и R^7 , всеки един от тях независимо е водород, метил, хидроксиметил или флуорометил;

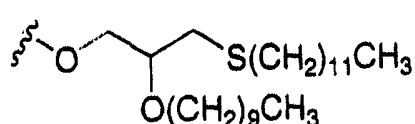
R^8 е водород, C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкинил, халоген, циано, карбокси, C_{1-4} алкилоксикарбонил, азидо, amino, C_{1-4} алкиламино, ди (C_{1-4} алкил) amino, хидроксид, C_{1-6} алкокси, C_{1-6} алкилтио, C_{1-6} алкилсулфонил, (C_{1-4} алкил)₀₋₂ аминометил, или C_{4-6} циклохетероалкил, независимо или заместен с една до две групи, независимо избрани от халоген, хидроксид, amino, C_{1-4} алкил и C_{1-4} алкокси;

R^9 е водород, циано, нитро, C_{1-3} алкил, $NHCONH_2$, $CONR^{12}R^{12}$, $CSNR^{12}R^{12}$, $COOR^{12}$, $C(=NH)NH_2$, хидроксид, C_{1-3} алкокси, amino, C_{1-4} алкиламино, ди (C_{1-4} алкил) amino, халоген, (1,3-оксазол-2-ил), (1,3-тиазол-2-ил), или (имидазол-2-ил); където алкилът не е заместен или е заместен с една до три групи, независимо избрани от халоген, amino, хидроксид, карбокси и C_{1-3} алкокси;

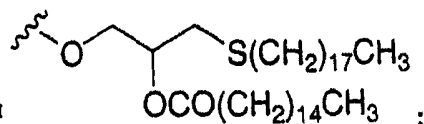
R^{10} и R^{11} , всеки един от тях независимо е водород, хидроксид, халоген, C_{1-4} алкокси, amino, C_{1-4} алкиламино, ди (C_{1-4} алкил) amino, C_{3-6} циклоалкиламино, ди (C_{3-6} циклоалкил) amino, или C_{4-6} циклохетероалкил, не заместен или заместен с една до две групи, независимо избрани от халоген, хидроксид, amino, C_{1-4} алкил и C_{1-4} алкокси;

всеки R^{12} е независимо водород или C_{1-6} алкил; и

R^{13} и R^{14} , всеки един от тях независимо е хидроксид, $OCH_2CH_2SC(=O)C_{1-4}$ алкил, $OCH_2O(C=O)OC_{1-4}$ алкил, $NHCHMeCO_2Me$, $OCH(C_{1-4}$ алкил) $O(C=O)C_{1-4}$ алкил,



или



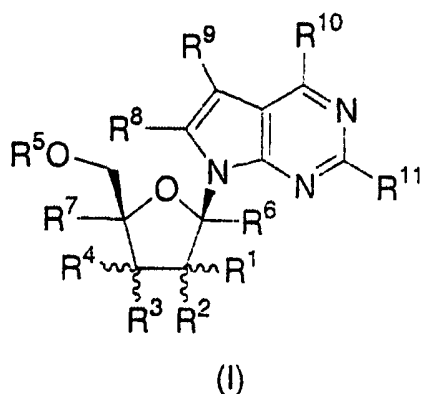
при условие, че когато R^1 е бета-метил, а R^4 е водород или R^4 е бета-метил, а R^1 е водород, R^2 и R^3 са алфа-хидрокси, R^{10} е amino, а R^5 , R^6 , R^7 , R^8 и R^{11} са водород, тогава R^9 не е циано или CONH_2 .

Съединенията с формула I са полезни като инхибитори на РНК-зависимата вирусна РНК полимеразата и по-специално на HCV NS5B полимеразата. Те потискат също така РНК-зависимата вирусна РНК репликация и по-специално HCV репликацията и са полезни за лечението на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция и по-специално за лечението на HCV инфекцията.

В настоящото изобретение са включени също така фармацевтични състави, съдържащи само съединенията или в комбинация с други средства, активни срещу РНК-зависимата вирусна РНК и по-специално срещу HCV, така както и методи за потискане на РНК-зависимата вирусна РНК репликация и за лечението на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция.

Подробно описание на изобретението

Настоящото изобретение се отнася до съединения със структурна формула I, с означената стереохимична конфигурация:



или фармацевтично приемлива негова сол; където

R^1 е C_{2-4} алкенил, C_{2-4} алкинил, или C_{1-4} алкил, където алкилът не е заместен или е заместен с хидрокси, amino, C_{1-4} алкокси, C_{1-4} алкилтио или с един до три флуорни атома;

R^2 е водород, флуор, хидрокси, меркапто, C_{1-4} алкокси, или C_{1-4} алкил; или R^1 и R^2 заедно с въглеродния атом, към който те са прикрепени

образуват от 3- до 6-членна наситена моноциклическа пръстеновидна система, съдържаща по избор хетероатом, избран от O, S и NC_{0-4} алкил;

R^3 и R^4 , всеки един от тях е независимо

избран от групата, съставена от водород, циано, азидо, халоген, хидрокси, меркапто, amino, C_{1-4} алкокси, C_{2-4} алкенил, C_{2-4} алкинил и C_{1-4} алкил, където алкилът не е заместен или е заместен с хидрокси, amino, C_{1-4} алкокси, C_{1-4} алкилтио, или с един до три флуорни атома;

R^5 е водород, C_{1-10} алкилкарбонил, $\text{P}_3\text{O}_9\text{H}_4$, $\text{P}_2\text{O}_6\text{H}_3$, или $\text{P}(\text{O})\text{R}^{13}\text{R}^{14}$;

R^6 и R^7 , всеки един от тях независимо е водород, метил, хидроксиметил или флуорометил;

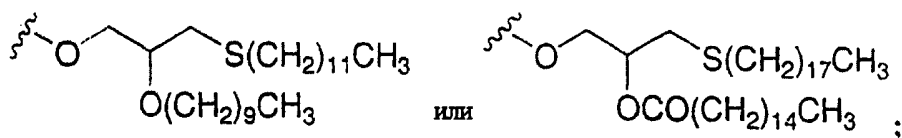
R^8 е водород, C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкинил, халоген, циано, карбокси, C_{1-4} алкилоксикарбонил, азидо, amino, C_{1-4} алкиламино, ди (C_{1-4} алкил) amino, хидрокси, C_{1-6} алкокси, C_{1-6} алкилтио, C_{1-6} алкилсулфонил, (C_{1-4} алкил) $_{0-2}$ amino-метил, или C_{4-6} циклохетероалкил, не заместен или заместен с една до две групи, независимо избрани от халоген, хидрокси, amino, C_{1-4} алкил и C_{1-4} алкокси;

R^9 е водород, циано, нитро, C_{1-3} алкил, NHCONH_2 , $\text{CONR}^{12}\text{R}^{12}$, $\text{CSNR}^{12}\text{R}^{12}$, COOR^{12} , $\text{C}(\text{=NH})\text{NH}_2$, хидрокси, C_{1-3} алкокси, amino, C_{1-4} алкиламино, ди (C_{1-4} алкил) amino, халоген, (1,3-оксазол-2-ил), (1,3-тиазол-2-ил), или (имидазол-2-ил); където алкилът не е заместен или е заместен с една до три групи, независимо избрани от халоген, amino, хидрокси, карбокси и C_{1-3} алкокси;

R^{10} и R^{11} , всеки един от тях независимо е водород, хидрокси, халоген, C_{1-4} алкокси, amino, C_{1-4} алкиламино, ди (C_{1-4} алкил) amino, C_{3-6} циклоалкиламино, ди (C_{3-6} циклоалкил) amino, или C_{4-6} циклохетероалкил, не заместен или заместен с една до две групи, независимо избрани от халоген, хидрокси, amino, C_{1-4} алкил и C_{1-4} алкокси;

всеки R^{12} е независимо водород или C_{1-6} алкил; и

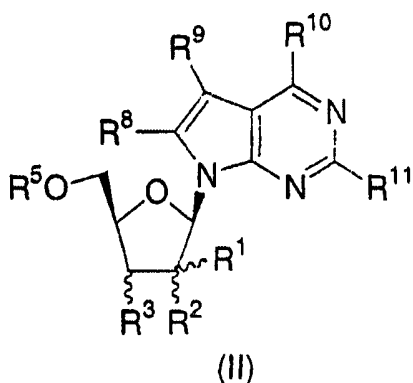
R^{13} и R^{14} всеки един от тях независимо е хидрокси, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SC}(\text{=O})\text{C}_{1-4}$ алкил, $\text{OCH}_2\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{OC}_{1-4}$ алкил, $\text{NHCHMeCO}_2\text{Me}$, $\text{OCH}(\text{C}_{1-4}$ алкил) $\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{C}_{1-4}$ алкил,



при условие, че когато R^1 е бета-метил, а R^4 е водород или R^4 е бета-метил, а R^1 е водород, R^2 и R^3 са алфа-хидрокси, R^{10} е amino, а R^5 , R^6 , R^7 , R^8 и R^{11} са водород, тогава R^9 не е циано или $CONH_2$.

Съединенията с формула I са полезни като инхибитори на РНК-зависимата вирусна РНК полимеразата. Те потискат също така РНК-зависимата вирусна РНК репликация и са полезни за лечението на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция.

В един вариант, съединенията със структурна формула I, са съединения със структурна формула II:



или фармацевтично приемлива тяхна сол; където

R^1 е C_{1-3} алкил, където алкилът не е заместен или е заместен с хидрокси, amino, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} алкилтио, или с един до три флуорни атома;

R^2 е хидрокси, флуоро или C_{1-3} алкокси; R^3 е водород, халоген, хидрокси, amino или C_{1-3} алкокси;

R^5 е водород, $P_3O_9H_4$, $P_2O_6H_3$, или PO_3H_2 ;

R^8 е водород, amino или C_{1-4} алкиламино;

R^9 е водород, циано, метил, халоген или $CONH_2$; и

R^{10} и R^{11} , всеки един от тях независимо е водород, халоген, хидрокси, amino, C_{1-4} алкиламино, ди (C_{1-4} алкил) amino, или C_{3-6} циклоалкиламино;

при условие, че когато R^1 е бета-метил, R^2 и R^3 са алфа-хидрокси, R^{10} е amino, а R^5 , R^8 и R^{11} са водород, тогава R^9 не е циано или $CONH_2$.

Във втори вариант, съединенията със структурна формула I са съединения със структурна формула II, където:

R^1 е метил, флуорометил, хидроксиметил, дифлуорометил, трифлуорометил или аминометил;

R^2 е хидрокси, флуоро или метокси;

R^3 е водород, флуоро, хидрокси, amino или метокси;

R^5 е водород или $P_3O_9H_4$;

R^8 е водород или amino;

R^9 е водород, циано, метил, халоген или $CONH_2$; и

R^{10} и R^{11} , всеки един от тях независимо е водород, флуоро, хидрокси или amino;

при условие, че когато R^1 е бета-метил, R^2 и R^3 са алфа-хидрокси, R^{10} е amino, а R^5 , R^8 и R^{11} са водород, тогава R^9 не е циано или $CONH_2$.

Илюстративни, но не ограничаващи се само до, примери за съединения от настоящото изобретение със структурна формула I, които са полезни като инхибитори на РНК-зависимата вирусна РНК полимеразата са следните:

4-амино-7-(2-С-метил-бета-D-арабинофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-метиламино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-диметиламино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-циклопропиламино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(2-С-винил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(2-С-хидроксиметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(2-С-флуорометил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-5-метил-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,
4-амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-5-карбоксилна киселина,

4-амино-5-бромо-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-5-хлоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-5-флуоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

2,4-диамино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

2-амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

2-амино-4-циклопропиламино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

2-амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-4 (3Н)-он,

4-амино-7-(2-С-етил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(2-С,2-О-диметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-4 (3Н)-он,

2-амино-5-метил-7-(2-С,2-О-диметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-4 (3Н)-он,

4-амино-7-(3-дезоксид-2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(3-дезоксид-2-С-метил-бета-D-арабинофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-2-флуоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(3-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(3-С-метил-бета-D-ксилофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(2,4-ди-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин, и

4-амино-7-(3-дезоксид-3-флуоро-2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин; и

съответните 5'-трифосфати;

или фармацевтично приемлива тяхна сол.

Друг илюстративен пример от настоящото изобретение са съединенията, избрани от групата, съставена от:

4-амино-7-(2-С-метил-бета-D-арабинофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

5 4-амино-7-(2-С-флуорометил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-5-метил-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

10 4-амино-5-бромо-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-5-хлоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

15 4-амино-5-флуоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

и

4-амино-7-(2-С,2-О-диметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

и съответните 5'-трифосфати;

или фармацевтично приемлива тяхна сол.

В един вариант от настоящото изобретение, нуклеозидните съединения от настоящото изобретение са полезни като инхибитори на позитивна едноверижна РНК-зависима вирусна РНК полимераза, инхибитори на позитивна едноверижна РНК-зависима вирусна РНК репликация и/или за лечението на позитивна едноверижна РНК-зависима вирусна РНК инфекция. В една група от този вариант, позитивният едноверижен РНК-зависим РНК вирус е Flaviviridae вирус или Picornaviridae вирус. В подгрупа от тази група, Picornaviridae вирусът е риновирус, полиовирус или хепатит А вирус. Във втора подгрупа от тази група, Flaviviridae вирусът е избран от групата, съставена от вируса на хепатит С, yellow fever вируса (причиняващ маларийна треска), dengue вируса (причиняващ остра заразна тропическа треска), West Nile вируса, Japanese енцефалитен вирус, Banzai вируса и говеждия вирус, причиняващ диария (BVDV). В подгрупа от тази подгрупа, Flaviviridae вируса е хепатит С вирус.

Друг вариант от настоящото изобретение се отнася до метод за потискане на РНК-зависимата вирусна РНК полимераза, до метод за потискане на РНК-зависимата вирусна РНК репликация и/или до метод за лечение на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция в бозайник, нуждаещ се от него, включващо прилагане на бозайника на терапевтично ефективно количество от съединение със структурна формула I.

В един вариант в този аспект от настоящото

изобретение, РНК-зависимата вирусна РНК полимераза е позитивна едноверижна РНК-зависима вирусна РНК полимераза. В една група от този вариант, позитивната едноверижна РНК-зависима вирусна РНК полимераза е Flaviviridae вирусна полимераза или Picornaviridae вирусна полимераза. В една подгрупа от тази група, Picornaviridae вирусната полимераза е риновирусна полимераза, полиовирусна полимераза или полимераза за хепатит А вирус. Във втора подгрупа от тази група Flaviviridae вирусната полимераза е избрана от групата, съставена от полимераза за хепатит С вирус, полимераза за yellow fever вирус (причиняващ маларийна треска), полимераза за dengue вирус (причиняващ остра заразна тропическа треска), полимераза за West Nile вирус, полимераза за Japanese енцефалитен вирус, полимераза за Banzī вирус и полимераза за говеждия вирус, причиняващ диария (BVDV). В подгрупа от тази подгрупа, Flaviviridae вирусната полимераза е полимераза за хепатит С вируса.

Във втори вариант, в този аспект от настоящото изобретение, РНК-зависимата вирусна РНК репликация е позитивна едноверижна РНК-зависима вирусна РНК репликация. В една група от този вариант, позитивната едноверижна РНК-зависима вирусна РНК репликация е Flaviviridae вирусна репликация или Picornaviridae вирусна репликация. В една подгрупа от тази група, Picornaviridae вирусната репликация е риновирусна репликация, полиовирусна репликация или репликация за хепатит А вирус. Във втора подгрупа от тази група Flaviviridae вирусната репликация е избрана от групата, съставена от хепатит С вирусна репликация, yellow fever вирусна репликация (причиняващ маларийна треска), dengue вирусна репликация (причиняващ остра заразна тропическа треска), West Nile вирусна репликация, Japanese енцефалит вирусна репликация, Banzī вирусна репликация и репликация на говеждия вирус причиняващ диария (BVDV). В подгрупа от тази подгрупа, Flaviviridae вирусната репликация е хепатит С вирусна репликация.

В трети вариант, в този аспект от настоящото изобретение, РНК-зависимата вирусна РНК инфекция е позитивна едноверижна РНК-зависима вирусна инфекция. В една група от този вариант, позитивната едноверижна РНК-зависима вирусна РНК инфекция е Flaviviridae вирусна

инфекция или Picornaviridae вирусна инфекция. В една подгрупа от тази група, Picornaviridae вирусната инфекция е риновирусна инфекция, полиовирусна инфекция или хепатит А вирусна инфекция. Във втора подгрупа от тази група Flaviviridae вирусната инфекция е избрана от групата съставена от, хепатит С вирусна инфекция, yellow fever вирусна инфекция (причиняващ маларийна треска), dengue вирусна инфекция (причиняващ остра заразна тропическа треска), West Nile вирусна инфекция, Japanese енцефалит вирусна инфекция, Banzī вирусна инфекция и инфекция от говеждия вирус причиняващ диария (BVDV). В подгрупа от тази подгрупа, Flaviviridae вирусната инфекция е хепатит С вирусна инфекция.

В настоящата заявка, следващите термини имат следните посочени значения.

Алкиловите групи определени по-горе, имат за цел да включват тези алкилови групи с посочената дължина, или с права, или с разклонена конфигурация.

Примери за такива алкилови групи са метил, етил, пропил, изопропил, бутил, вторичен-бутил, третичен бутил, пентил, изопентил, хексил, изохексил и други подобни.

Терминът “алкенил” ще означава прави или разклонени верижни алкени с два до шест общо въглеродни атома, или какъвто и да е друг брой в този обхват (например, етенил, пропенил, бутенил, пентенил и т.н.).

Терминът “алкинил” ще означава прави или разклонени верижни алкини с два до шест общо въглеродни атоми, или какъвто и да е друг брой в този обхват (например, етинил, пропинил, бутинил, пентинил и т.н.).

Терминът “циклоалкил” ще означава циклични пръстени от алкени с три до осем общо въглеродни атоми, или какъвто и да е друг брой в този обхват (т. е., циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклохексил, циклохептил или циклооктил).

Терминът “циклохетероалкил”, има за цел да включва неароматни хетероцикли, съдържащи един или два хетероатома, избрани от азот, кислород и сяра. Примери за 4-6-членен циклохетероалкил включват ацетидинил, пиролидинил, пиперидинил, морфолинил, тиаморфолинил, имидазолидинил, тетрахидрофуранил, тетрахидропиранил, тетрахидротиофенил, пипе-

разинил и други подобни.

Терминът “алкокси” се отнася до прави или разклонени верижни алкоксиди с определен брой въглеродни атоми (например, C_{1-4} алкокси), или какъвто и да е друг брой в този обхват [т. е., метокси ($MeO-$), етоксиди, изопро-

покси и т. н.].
Терминът “алкилтио” се отнася до прави или разклонени верижни алкилсулфиди с определен брой въглеродни атоми (например, C_{1-4} алкилтио), или какъвто и да е друг брой в този обхват [т. е., метилтио ($MeS-$), етилтио, изопро-

пилтио и т. н.].
Терминът “алкиламино” се отнася до прави или разклонени алкиламини с определен брой въглеродни атоми (например, C_{1-4} алкиламино), или какъвто и да е друг брой в този обхват [т. е., метиламино, етиламино, изопропиламино, трет-

бутиламино и т. н.].
Терминът “алкилсулфонил” се отнася до прави или разклонени верижни алкилсулфони с определен брой въглеродни атоми (например, C_{1-6} алкилсулфонил), или какъвто и да е друг брой в този обхват [т. е., метилсулфонил ($MeSO_2-$), етилсулфонил, изопропилсулфонил и т. н.].

Терминът “алкилоксикарбонил” се отнася до прави или разклонени верижни естери на производни на карбоксилна киселина от настоящото изобретение, с определен брой въглеродни атоми (например, C_{1-4} алкилоксикарбонил), или какъвто и да е друг брой в този обхват [т. е., метилоксикарбонил ($MeOCO-$), етилоксикарбонил, или бутилоксикарбонил].

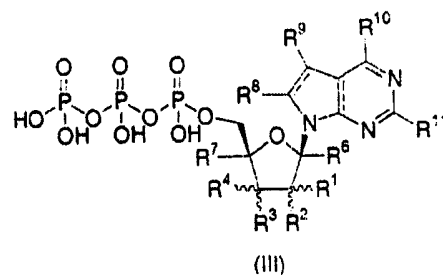
Терминът “арил” включва и двете фенил, нафтил и пиридил. Арилната група е заместена

по избор с една до три групи, независимо избрани от C_{1-4} алкил, халоген, циано, нитро, трифлуорометил, C_{1-4} алкокси и C_{1-4} алкилтио.

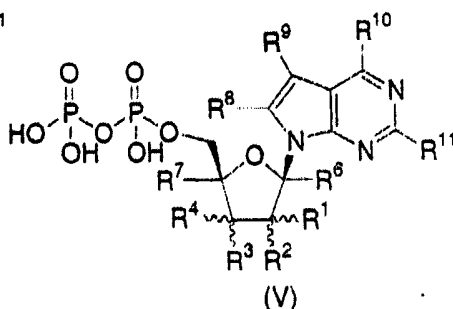
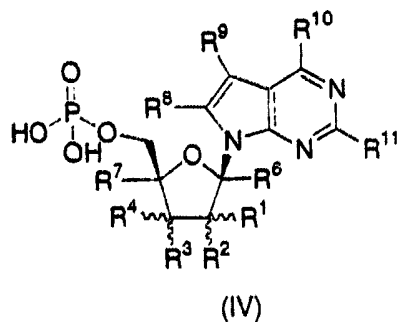
Терминът “халоген” има за цел да включва халогенните атоми флуор, хлор, бром и йод.

Терминът “заместен” ще включва много етапи на заместване чрез посочен заместител. Когато се описват или се претендира за много заместващи групи, заместващото съединение може да бъде независимо заместено с една или повече от описаните заместващи групи или със заместващите групи, за които се претендира поотделно или заедно.

Терминът “5'-трифосфат” се отнася до естер произведен на трифосфорната киселина, при 5'-хидроксилната група на нуклеозидното съединение от настоящото изобретение, притежаващо следната обща структурна формула III:

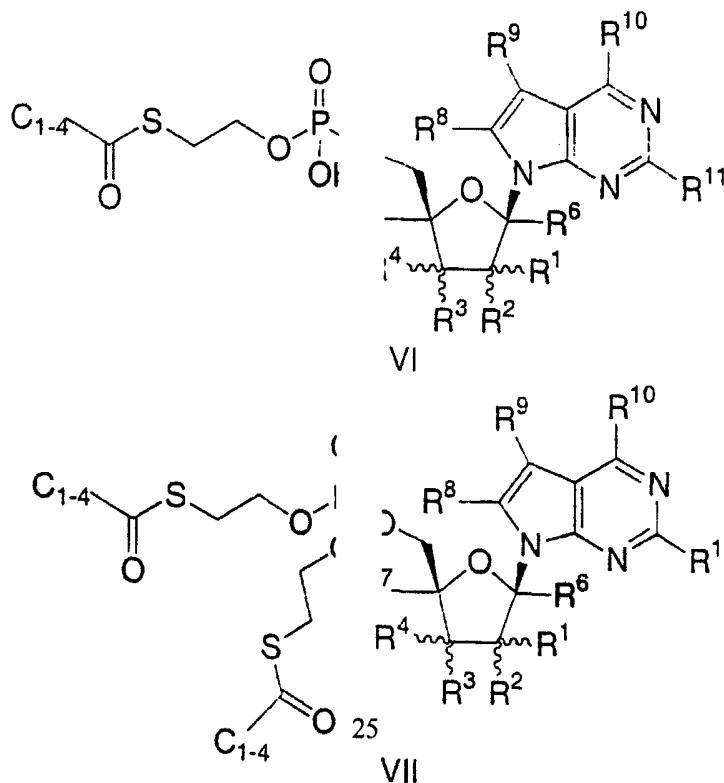


където R^1-R^{11} са както са определени погоре. Съединенията от настоящото изобретение имат за цел също така да включват фармацевтично приемливи соли на трифосфатния естер, така както и фармацевтично приемливи соли, производни на 5'-монофосфатен и 5'-дифосфатен естер, респективно със структурна формула IV и V,



Терминът "5'-(S-ацил-2-тиоетил) фосфат" или "SATE", се отнася до моно- или диестерно производно на 5'-монофосфат нуклеозид произ-

водно от настоящото изобретение, респективно със структурна формула VI и VII, така както и до фармацевтично приемливи соли на моноестера,



Терминът "състав", както във "фармацевтичен състав" има за цел да включва продукт, включващ активната съставка(и) и инертният компонент(и), от който е направен носителя, така както и всеки един продукт, който се получава директно или индиректно от комбинацията, комплексирането или агрегирането на които и да са два или повече от съставките или от дисоциацията на един или повече от съставките, или от други типове реакции или взаимодействия на една или повече от съставките. Съответно, фармацевтичните състави от настоящото изобретение включват всеки един състав, приготвен чрез смесване на съединение от настоящото изобретение и фармацевтично приемлив носител.

Под термините "прилагане на" и "прилагайки" съединение трябва да се разбира, че означават доставяне на съединение от изобретението или на пролекарствен препарат от съединение от изобретението на индивид, нуждаещ се от него.

Друг вариант от настоящото изобретение се отнася до метод за потискане на HCV NS5B полимеразата, потискане на HCV репликацията или до лечение на HCV инфекция, със съединение от настоящото изобретение, в комбинация с едно или повече средства, полезни за лечение на HCV инфекция. Такива средства, активни срещу HCV включват, но не се ограничават само до, рибавирин, левовирин, вирамидин, тимозин алфа-1, интерферон-алфа, PEG-свързан интерферон-алфа (пегинтерферон-алфа), комбинация от интерферон-алфа и рибавирин, комбинация от пегинтерферон-алфа и рибавирин, комбинация от интерферон-алфа и левовирин и комбинация от пегинтерферон-алфа и левовирин. Интерферон-алфа включва, но не се ограничава само до, рекомбинантен интерферон-алфа2а (такъв като Roferon интерферон, наличен от Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ), PEG-свързан интерферон-алфа2а (Pegasys™), интерферон-алфа2b (такъв като Intron-A интерферон, нали-

чен от Schering Corp., Kenilworth, NJ), PEG-свързан интерферон-алфа2b (PegIntron™), рекомбинантен консенсус интерферон (такъв като интерферон алфакон-1) и пречистен интерферон-алфа продукт.

Amgen's рекомбинантният консенсус интерферон има търговското наименование Infergen®. Левовиринът е L-енантиомер на рибавирин, който показва имуномодулираща активност, сходна с тази на рибавирин. Вирамидинът представлява аналог на рибавирин, описан във WO 01/60379 (определен от ICN Pharmaceuticals). В съответствие с този метод от настоящото изобретение, отделните компоненти от комбинацията могат да се прилагат поотделно в различни времена през време на терапевтичния курс, или едновременно като комбинирани, разделени на две или отделни форми. Следователно, трябва да е ясно, че настоящото изобретение обхваща всички тези режими на едновременно или редуващо се лечение и съответно може да се интерпретира терминът "прилагайки". Ясно е, че обхватът от комбинации на съединенията от това изобретение с други средства, полезни за лечение на HCV инфекция, включва по принцип всяка една комбинация с всеки един фармацевтичен състав за лечение на HCV инфекция. Когато съединение от настоящото изобретение или негова фармацевтично приемлива сол се използват в комбинация с второ терапевтично средство, активно срещу HCV, дозата на всяко съединение може да е или същата или различна от дозата, когато се използва само съединението.

За лечението на HCV инфекция, съединенията от настоящото изобретение могат да се прилагат също така в комбинация със средство, което е инхибитор на HCV NS3 сериновата протеаза. HCV NS3 сериновата протеаза е един много важен вирусен ензим и е описано, че може да е прекрасна мишена за потискане на HCV репликацията.

Както субстратните, така и несубстратно базираните инхибитори на HCV NS3 протеазните инхибитори са описани във WO 1998/022496, WO 1998/046630, WO 1999/007733, WO 1999/007734, WO 1999/038888, WO 1999/050230, WO 1999/064442, WO 2000/009543, WO 2000/059929 и GB-2337262. HCV NS3 протеазата, като мишена за разработване на инхибитори на HCV реп-

ликацията и за лечението на HCV инфекция, се дискутира във B. W. Dymock, "Emerging therapies for hepatitis C virus infection," *Emerging Drugs*, 6: 13-42 (2001).

Рибавиринът, левовиринът и вирамидинът могат да упражнят своите анти-HCV ефекти, чрез модулиране на вътреклетъчния пул от гуанинови нуклеотиди, чрез потискане на вътреклетъчния ензим инозин монофосфат дехидрогеназа (IMPDH). IMPDH е лимитиращ скоростта ензим в биосинтетичния път, в *de novo* биосинтезата на гуанинов нуклеотид. Рибавиринът се фосфорилира лесно вътре в клетката и монофосфатното производно е инхибитор на IMPDH. Следователно, инхибирането на IMPDH представлява друга полезна мишена за разкриване на инхибитори на HCV репликацията.

Следователно, съединенията от настоящото изобретение могат да се прилагат също така в комбинация с инхибитор на IMPDH, такъв като VX-497, който е описан във WO 1997/041211 и WO 2001/000622 (определен от Vertex); друг IMPDH инхибитор, като този описан във WO 2000/025780 (определен от Bristol-Myers Squibb); или микофенолат мофетил [виж A. C. Allison и E. M. Eugui, *Agents Action*, 44 (Suppl.): 165 (1993)].

За лечението на HCV инфекция, съединенията от настоящото изобретение могат да се прилагат също така в комбинация с антивирусното средство амантадин (1-аминоадамтан [за по-подробно описание на това средство, виж J. Kirschbaum, *Anal. Profiles Drug Subs.* 12: 1-36 (1983)]).

Използваният тук термин "фармацевтично приемлив" означава, че носителът, разредителят или ексципиентът, трябва да са съвместими с другите съставни части от формулировката и да не са вредни за самия реципиент.

В настоящото изобретение са включени също така фармацевтични състави, включващи нуклеозидните съединения и техни производни от настоящото изобретение, свързани с фармацевтично приемлив носител. Друг пример от изобретението е фармацевтичен състав, приготвен чрез комбиниране на всяко едно от съединенията описани по-горе и фармацевтично приемлив носител. Друг пример от изобретението е метод за приготвяне на фармацевтичен състав,

включващ комбиниране на всяко едно от съединенията описани по-горе и фармацевтично приемлив носител.

В настоящото изобретение са включени също така фармацевтични състави, полезни за потискане на РНК-зависимата вирусна РНК полимеразата, по-специално на HCV NS5B полимеразата, включващи ефективно количество от съединение от настоящото изобретение и фармацевтично приемлив носител. В настоящото изобретение са включени също така и фармацевтични състави, полезни за лечение на зависимата от РНК вирусна РНК инфекция, по-специално на HCV инфекция, така както и метод за потискане на РНК-зависимата вирусна РНК полимеразата, по-специално на HCV NS5B полимеразата и метод за лечение на РНК-зависимата вирусна репликация и по-специално на HCV репликацията. В допълнение, настоящото изобретение е насочено до фармацевтичен състав, включващ терапевтично ефективно количество от съединение от настоящото изобретение, в комбинация с терапевтично ефективно количество от друго средство, активно срещу РНК-зависимия РНК вирус и по-специално, срещу HCV. 25

Активните средства срещу HCV включват, но не се ограничават само до, рибавирин, левовирин, вирамидин, тимозин алфа-1, инхибитор на HCV NS3 сериновата протеаза, интерферон-алфа, PEG-свързан интерферон-алфа (пегинтерферон-алфа), комбинация от интерферон-алфа и рибавирин, комбинация от пегинтерферон-алфа и рибавирин, комбинация от интерферон-алфа и левовирин и комбинация от пегинтерферон-алфа и левовирин.

Интерферон-алфа включва, но не се ограничава само до, рекомбинантен интерферон-алфа2а (такъв като Roferon интерферон, наличен от Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ), интерферон-алфа2b (такъв като Intron-A интерферон, наличен от Schering Corp., Kenilworth, NJ), консенсус интерферон и пречистен интерферон-алфа продукт. Дискусия относно рибавирин и неговата активност срещу HCV, виж J. O. Saunders и S. A. Raybuck, "Inosine Monophosphate Dehydrogenase: Consideration of Structure, 45

Kinetics, and Therapeutic Potential", Ann. Rep. Med. Chem., 35: 201-210 (2000). Друг вариант от настоящото изобретение осигурява използването на нуклеозидни съединения и техни производни и техни фармацевтични състави, за произ-

водство на лекарствен препарат, за инхибиране на РНК-зависимата вирусна РНК репликация, по-специално на HCV репликацията и/или за лечението на зависимата от РНК, вирусна РНК инфекция, по-специално на HCV инфекцията. Друг допълнителен вариант от настоящото изобретение осигурява нуклеозидни съединения и техни производни и техни фармацевтични състави, за използването им като лекарствен препарат, за потискане на РНК-зависимата вирусна РНК репликация, по-специално на HCV репликацията и/или за лечение на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция, по-специално на HCV инфекцията.

Фармацевтичните състави от настоящото изобретение включват съединение със структурна формула I като активна съставка или фармацевтично приемлива негова сол и могат да съдържат също така фармацевтично приемлив носител и по избор други терапевтични съставки.

Съставите включват състави, подходящи за орално, ректално, локално, парентерално (включващо подкожно, интрамускулно и интравенозно), очно (офталмологично), пулмонарно (назална или букална инхалация), или назално приложение, въпреки че най-подходящия начин във всеки даден случай ще зависи от природата и степента на болестното състояние което се лекува и от природата на активната съставка. Те могат да се дават удачно като единично дозирана форма и да се приготвят чрез който и да е от методите добре известни от областта на фармацията.

При случаи когато се използват в практиката, съединенията със структурна формула I могат да се комбинират като активна съставка в смес с фармацевтичен носител, съгласно конвенционалните фармацевтични техники за приготвяне на смеси. Носителят може да има най-разнообразна форма, в зависимост от формата на препарата, необходим за прилагане, например, орално или парентерално (включително интравенозно). При приготвянето на съставите като орално дозирани форми, може да се използва всяка една от обичайните фармацевтични среди, например такива като вода, гликоли, масла, алкохоли, ароматизиращи средства, консерванти, средства за оцветяване и други подобни, в случай на орални течни препарати, например такива като суспензии, тин-

ктури и разтвори; или носители, такива като нишестета, захари, микрокристална целулоза, разредители, средства за гранулиране, смазващи средства, свързващи средства, средства за дезинтегриране и други подобни, в случай на орални твърди препарати, например такива като прахове, твърди и меки капсули и таблетки, като за предпочитане са твърдите препарати за орално приложение пред течните препарати.

Поради лесното им приложение, таблетките и капсулите се използват с голямо предимство под формата на орално единично дозирани форми, като в този случай очевидно се използват твърдите фармацевтични носители. Ако е желателно, таблетките могат да бъдат покрити чрез стандартните техники за водни и неводни покрития. Тези състави и препарати трябва да съдържат поне 0.1 % от активното съединение. Процентът на активната съставка в тези смеси може да варира разбира се, като най-подходящо е той да е между около 2 до около 60 тегл. % от целия препарат. Количеството на активната съставка в такива терапевтично приложими състави е такова, че да се получи ефективна доза. Активните съединения могат да се прилагат също така интраназално, например като течни капки или спрей.

Таблетките, хапчетата, капсулите и други подобни могат да съдържат също така и свързващо средство, такова като трагакантен клей, акация, царевично нишесте или желатин; ексципиенти, такива като дикалциев фосфат; дезинтегриращо средство, такова като царевично нишесте, картофено нишесте, алгинова киселина; смазващо средство като магнезиев стеарат; и средства за подслаждане, такива като захароза, лактоза или захарин. Когато единично дозираната форма е капсула, тя може да съдържа в допълнение към материалите от горния вид, течен носител, такъв като мазно масло.

Могат да присъстват и други разнообразни материали като покриващи или модифициращи физичната форма на дозираната единица. Например, таблетките могат да се покриват с шеллак, захар или и двете. Сиропът или тинктурата, в допълнение към активната съставка могат да съдържат захароза като подслаждащо средство, метил и пропилпарабени като консерватори, оцветители и подсладител, такива като придаващи вкус и аромат на череша или

на портокал.

Съединенията със структурна формула I могат да се прилагат също така парентерално. Разтворите или суспензиите от тези активни съединения могат да се приготвят във вода, смесена подходящо със сърфактант, такъв като хидрокси-пропилцелулоза. Дисперсиите могат да се приготвят също така в глицерол, течни полиетилен гликоли и техни смеси в масла. При стандартните условия за съхранение и използване, тези препарати съдържат консервант, за да се възпрепятства развитието на микроорганизми.

Фармацевтичните форми, подходящи за инжекционно използване, включват стерилни водни разтвори или дисперсии и стерилни прахове за импровизиран препарат от стерилни разтвори или дисперсии за инжектиране. Във всички случаи формата трябва да е стерилна и трябва да е течна до такава степен, че да може лесно да се инжектира. Тя трябва да бъде стабилна при условията на приготвяне и съхранение и трябва да се пази от контаминиращото действие на микроорганизмите, такива като бактерии и гъби. Носителят може да е разтворител или дисперсионна среда, съдържаща например вода, етанол, полиол (например, глицерол, пропилен гликол и течен полиетилен гликол), подходящи техни смеси и растителни масла.

За да се осигури на бозайник, по-специално на човек ефективна доза от съединение от настоящото изобретение, може да се използва всеки един от подходящите начини на прилагане. Например може да се използва орален, ректален, локален, парентерален, офталмологичен, пулмонарен, назален и други подобни начини на приложение. Дозираните форми включват таблетки, хапчета, дисперсии, суспензии, разтвори, капсули, кремове, мехлеми, аерозоли и други подобни. За предпочитане е съединенията със структурна формула I да се прилагат орално.

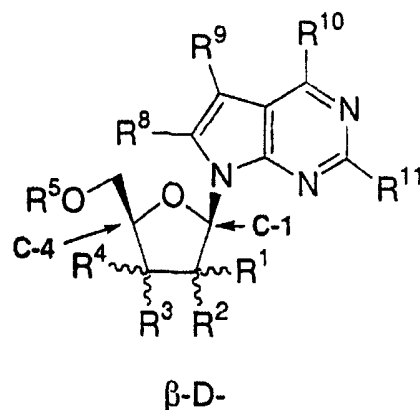
За орално приложение при хора, обхватът на дозата е от 0.01 до 1000 mg/kg телесно тегло, като дозата е разделена на две дози. В един вариант, обхватът на дозата е от 0.1 до 100 mg/kg телесно тегло, като дозата е разделена на две дози. В друг вариант, обхватът на дозата е от 0.5 до 20 mg/kg телесно тегло, като дозата е разделена на две дози. За орално приложение, съставите се осигуряват предимно под формата на таб-

летки или капсули, съдържащи от 1.0 до 1000 mg от активната съставка, по-специално 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 750, 800, 900 и 1000 mg от активната съставка, за да се коригира дозата симптоматично, спрямо лекувания се пациент.

Ефективната доза от използваната активна съставка може да варира в зависимост от използваното специфично съединение, начинът на прилагане, условията за лечение и от степента на болестното състояние, което се лекува. Тази доза може да се установи веднага от специалистите в областта. Този дозов режим може да се коригира така, че да се осигури оптимален терапевтичен отговор.

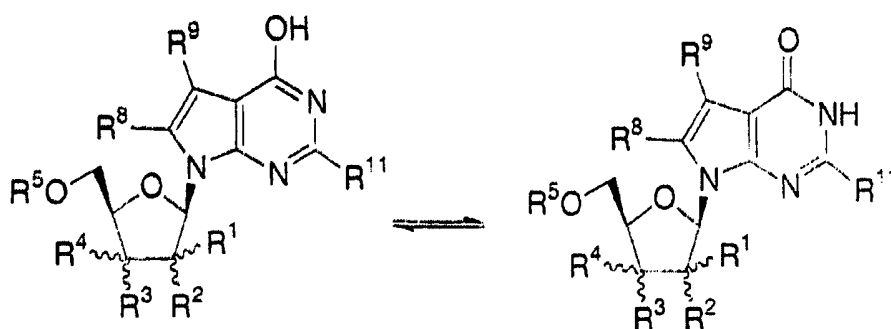
Съединенията от настоящото изобретение съдържат един или повече асиметрични центрове и следователно, могат да се срещат като рацематни и рацемични смеси, единични енантиомери, диастереомерни смеси и индивидуални диастереомери. Настоящото изобретение има за цел да включва нуклеозидни съединения, притежаващи бета-D стереохимична конфигурация на петчленен фуранозен пръстен, както е означено в структурната формула по-долу, което означава, че нуклеозидни съединения, в които заместителите при C-1 и C-4 от петчленния фура-

нозен пръстен, имат бета-стереохимична конфигурация (ориентация "нагоре", както е означено с плътната линия).



Някои от съединенията, описани тук, съдържат олефинови двойни връзки и ако не е посочено нещо друго, означава, че включват както E, така и Z геометрични изомери.

Някои от съединенията, описани тук могат да съществуват като тавтомери, такива като кето-енол тавтомери. Отделните тавтомери, така както и техните смеси са включени в съединенията със структурна формула I. Един пример за кето-енол тавтомери, които са предвидени да бъдат включени в съединенията от настоящото изобретение, е илюстриран по-долу:



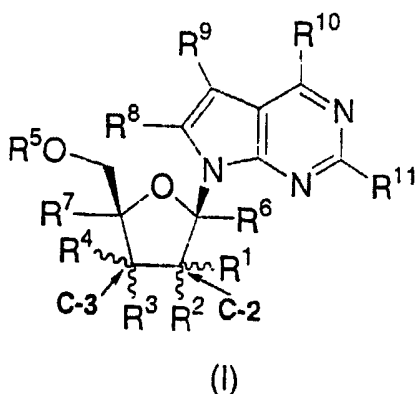
Съединенията със структурна формула I могат да се разделят на техните отделни диастереоизомери, например чрез фракционна кристализация с подходящ разтворител, например метанол или етил ацетат или смес от тях, или чрез хирална хроматография, като се използва оптично активна стационарна фаза.

Съответно, може да се получи всеки един стереоизомер на съединението със структурна формула I, чрез стереоспецифичен синтез, като се използват оптично чисти изходни материали

или реагенти с известна конфигурация.

Стереохимията на заместителите при C-2 и C-3 позиции от фуранозния пръстен на съединенията от настоящото изобретение със структурна формула I, е показана чрез вълнообразни линии, които показват, че заместителите R¹, R², R³ и R⁴ могат да имат или алфа (заместител "надолу") или бета (заместител "нагоре") конфигурация, независимо една от друга. Означението на стереохимията чрез плътна линия както при C-1 и C-4 от фуранозния пръстен

показва, че заместителят има бета конфигурация (заместител "нагоре").



Съединенията от настоящото изобретение могат да се прилагат под формата на фармацевтично приемлива сол. Терминът "фармацевтично приемлива сол", се отнася до соли, приготвени от фармацевтично приемливи нетоксични бази или киселини, включващи неорганични или органични бази и неорганични или органични киселини. Солите на основните съединения включени в термина "фармацевтично приемлива сол", се отнасят до не-токсични соли на съединенията от това изобретение, които обикновено се приготвят чрез взаимодействие на свободна база с подходяща органична или неорганична киселина.

Типични соли на основни съединения от настоящото изобретение включват, но не се ограничават само до, следните: ацетат, бензенсулфонат, бензоат, бикарбонат, бисулфат, битартарат, борат, бромид, камзилат, карбонат, хлорид, клавуланат, цитрат, дихидрохлорид, едетат, едизилат, естолат, езилат, фумарат, глутептат, глюконат, глутамат, гликолиларсанилат, хексилрезорцинат, хидрабамина, хидробромид, хидрохлорид, хидроксинафтоат, йодид, изотионат, лактат, лактобионат, лаурат, малат, малеат, манделат, мезилат, метилбромид, метилнитрат, метилсулфат, мукат, напзилат, нитрат, N-метилглюкамин амониева сол, олеат, оксалат, памоат (ембонат), палмитат, пантотенат, фосфат/дифосфат, полигалактуронат, салицилат, стеарат, сулфат, субацетат, сукцинат, танат, тартарат, теоклат, тозилат, триетилйодид и валерат. Освен това, когато съединенията от изобретението носят кисела група, подходящи фармацевтично приемливи техни соли включват, но не се ограничават само до, соли, получени от

неорганични бази, включващи, алуминиева амониева, калциева, медна, фери, феро, литиева, магнезиева, манганова (III), манганова (II), калиева, натриева, цинкова и други подобни. По-специално предпочитани са амониевите, калциевите, магнезиевите, калиевите и натриевите соли. Солите, получени от фармацевтично приемливи органични не-токсични бази включват соли на първични, вторични и третични амини, циклични амини и основни йонообменни смоли, такива като аргинин, бетаин, кафеин, холин, N,N-дибензилетилендиамин, диетиламин, 2-диетиламиноетанол, 2-диметиламиноетанол, етаноламин, етилендиамин, N-етилморфолин, N-етилпиперидин, глюкамин, глюкозамин, хистидин, хидрабамина, изопропиламин, лизин, метилглюкамин, морфолин, пиперазин, пиперидин, полиаминови смоли, прокаин, пурины, теобромин, триетиламин, триметиламин, трипропиламин, трометамин и други подобни.

Също така, в случай че присъства карбоксилна киселина (-COOH) или алкохолна група в съединенията от настоящото изобретение, могат да се използват фармацевтично приемливи естери на производни на карбоксилна киселина, такива като метил, етил, или пивалоилоксиметил, или ацил производни на алкохоли, такива като ацетат или малеат. Включени са тези естерни и ацилни групи, които са известни от областта на техниката за модифициране на разтворимостта или характеристиките на хидролизата, които се използват като поддържащи освобождаването или като пролекарствени формулировки.

Получаване на нуклеозидни съединения и производни от изобретението

Нуклеозидните съединения и техните производни от настоящото изобретение могат да се приготвят, следвайки синтетичните методологии, добре установени в практиката на нуклеозидната и нуклеотидна химия. Направена е справка със следния текст, за описание на синтетичните методи, използвани за получаване на съединенията от настоящото изобретение: "Chemistry of Nucleosides and Nucleotides," L. B. Townsend, ed., Vols. 1-3, Plenum Press, 1988, който е включен тук изцяло в цитираната литература.

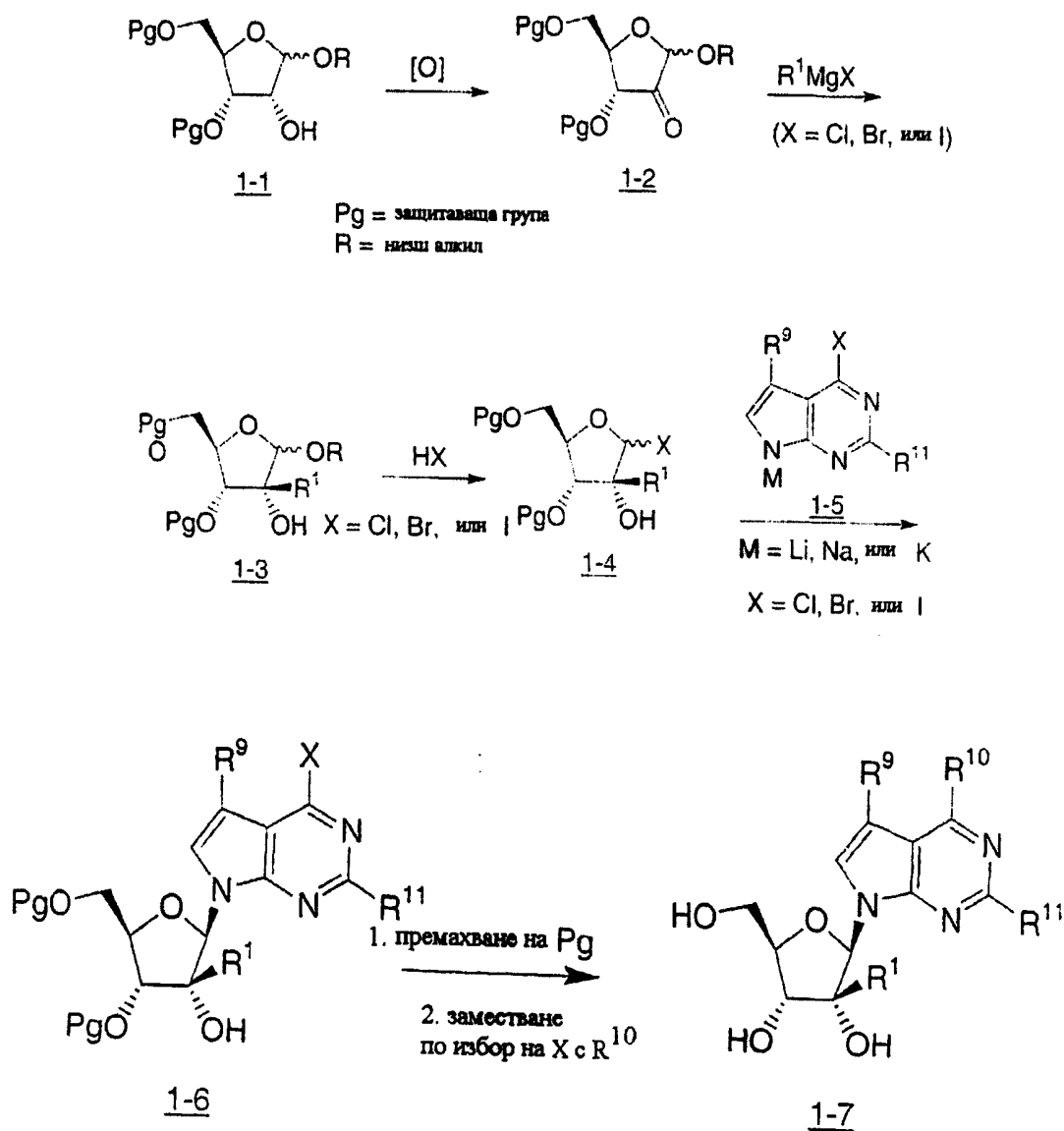
Типичен общ метод за получаване на съединения от настоящото изобретение е показан на Схема 1 по-долу. Тази схема илюстрира синтезът на съединения от настоящото изобретение,

сът структурна формула 1-7, където фуранозния пръстен има бета-D-рибо конфигурация. Изходният материал е 3,5-бис-О-защитен алкил фуранозид, такъв като метил фуранозид, със структурна формула 1-1. След това C-2 хидроксилната група се окислява с подходящо окислително средство, такова като хром триоксид или хроматен реагент, Dess-Martin перийодинан, или чрез Swern окисляване, за да се получи C-2 кетон със структурна формула 1-2. Добавянето на Grignard реагент, такъв като алкил, алкенил или алкинил магнезиев халогенид (например, MeMgBr, EtMgBr, винилMgBr, алилMgBr и етинилMgBr) или на алкил, алкенил или алкинил литий, такъв като MeLi, при тази карбонилна двойна връзка на 1-2 в подходящ органичен разтворител, такъв като тетраhydroфуран, диетил етер и други подобни, позволява да се получи C-2 третичен алкохол със структурна формула 1-3. След това се въвежда една лесно отцепваща се група (като Cl, Br и I) в C-1 (аномерна) позиция на получената фуранозна захар, чрез третиране на фуранозида с формула 1-3 с халалогеноводород в подходящ органичен разтворител, такъв като бромоводород в оцетна киселина, за да се получи междинния фуранозил халид 1-4. C-1 сулфонатът, такъв като метансулфонат (MeSO₂O-), трифлуорометансулфонат (CF₃SO₂O-), или p-толуенсулфонат (-OTs), могат да служат също така като полезна оставаща група в последващата реакция, за да се получи гликозидната (нуклеозидна) връзка. Нуклеозидната връзка се конструира чрез третиране на междинния продукт със структурна формула 1-4, с метална сол (такава като литий, натрий или калий) на подходящо заместен 1H-пироло [2,3-d] пиримидин 1-5, такъв като подходящо заместен 4-хало-1H-пироло [2,3-d] пиримидин, който може да се получи *in situ* чрез третиране с алкален хидрид (такъв като натриев хидрид), с алкална ос-

нова (такава като калиева основа), с алкален карбонат (такъв като калиев карбонат), или с алкален хексаметилдизилазид (такъв като NaHMDS) в подходящ безводен органичен разтворител, такъв като ацетонитрил, тетраhydroфуран, 1-метил-2-пиридинон, или N,N-диметилформамид (DMF). Реакцията на изместване може да се катализира като се използва катализатор за фазов преход, такъв като TDA-1, или триетилбензил-амониев хлорид, в двуфазова система (твърда-течна или течна-течна). След това, защитаващите по избор групи в защитения нуклеозид със структурна формула 1-6 се откъсват, следвайки установените методологии за премахване на защитата, като тези описани в T. W. Greene and P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd ed., John Wiley & Sons, 1999. Въмъкването по избор на amino група в 4-позиция на пироло [2,3-d] пиримидиновото ядро се повлиява чрез третиране на 4-хало междинния продукт 1-6 с подходящия амин, такъв като алкохолен разтвор на амоняк или течен амоняк, за да се получи първичен амин в позицията C-4 (-NH₂), с алкиламин, за да се получи вторичен амин (-NHR), или с диалкиламин, за да се получи третичен амин (-NRR'). Съединението 7H-пироло [2,3-d] пиримидин-4 (3H)он, може да се получи чрез хидролиза на 1-6 с воден разтвор на основа, такава като натриева основа във вода.

Алкохолизата (като метанолиза) на 1-6, дава възможност да се получи C-4 алкоксид (-OR), докато третирането с алкил меркапид, дава възможност да се получи C-4 алкилтио (-SR) производно.

За да се получат желаните съединения от настоящото изобретение, могат да са необходими допълнителни химични манипулации, добре известни на практикуващите специалисти в областта на органичната/медицинска химия.

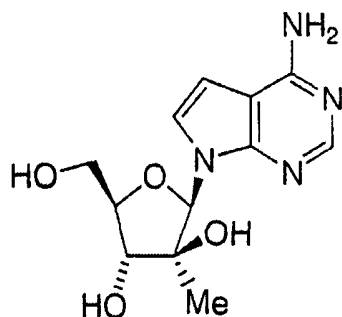
Схема 1

Примерите по-долу осигуряват цитати в публикациите, които съдържат детайли за получаването на крайните съединения или междинните съединения, използвани за получаването на крайните съединения от настоящото изобретение. Нуклеозидните съединения от настоящото изобретение се получават съгласно методите, описани подробно в следните примери. Примерите нямат за цел по какъвто и да е начин да ограничат обхвата на настоящото изобретение и те не трябва да се свързват с това. За специалистите в областта на нуклеозидния и

нуклеотидния синтез ще е ясно, че могат да се използват различни варианти на условията и методите от следващите препаративни методи, за да получат тези и други съединения от настоящото изобретение. Ако не е указано нещо друго, всички температури са в градуси по Целзий.

45 **Примери за изпълнение на изобретението****Пример 1**

4-Амино-7-(2-С-метил-бета-D-арабинофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



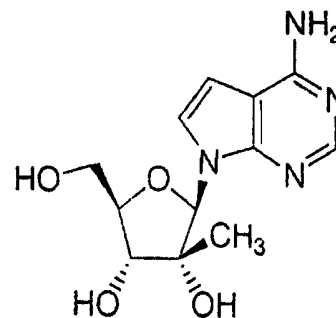
Към хром триоксид (1.57 g, 1.57 mmol) в дихлорометан (DCM) (10 ml) при 0°C, се добавя оцетен анхидрид (145 mg, 1.41 mmol) и след това пиридин (245 mg, 3.10 mmol). Сместа се разбърква в продължение на 15 min и след това се добавя разтвор от 7-[3,5-0-[1,1,3,3-тетракис (1-метилетил)-1,3-дисилоксандиил]-бета-D-рибофуранозил]-7H-пироло [2,3-d] пиримидин-4-амин [за приготвянето виж J. Am. Chem. Soc. 105: 4059 (1983)] (508 mg, 1.00 mmol) в DCM (3 ml). Полученият разтвор се бърка в продължение на 2 h и след това се излива в етил ацетат (10 ml) и впоследствие се филтрува през силика гел, като се използва етил ацетат като елуент. Комбинираните филтрати се изпаряват под вакуум, разтварят се в диетил етер/THF (1: 1) (20 ml), охлажда се до -78°C и на капки се добавя метилмагнезиев бромид (3M, в THF) (3.30 ml, 10 mmol). Сместа се бърка при -78°C в продължение на 10 min, след това се оставя да се темперира до стайна температура (rt) и се гаси чрез добавяне на наситен воден амониев хлорид (10 ml) и се екстрахира с DCM (20 ml). Органичната фаза се изпарява под вакуум и грубият продукт се пречиства върху силика гел, като се използва 5 % метанол в дихлорометан като елуент. Фракциите, съдържащи продукта се обединяват и се изпаряват под вакуум. Полученото масло се разтваря в THF (5 ml) и се добавя тетрабутиламониев флуорид (TBAF) върху силициев диоксид (1.1 mmol/g върху силициев двуокис) (156 mg). Сместа се бърка на стайна температура в продължение на 30 min, филтрува се и се изпарява под вакуум.

Грубият продукт се пречиства върху силикагел, като се използва 10 % метанол в дихлорометан като елуент. Фракциите, съдържащи продукта се събират и се изпаряват под вакуум, за да се получи желаното съединение (49 mg) като безцветна твърда фаза.

¹H NMR (DMSO-d₆) : делта 1.08 (s, 3H), 3.67 (m, 2H), 3.74 (m, 1H), 3.83 (m, 1H), 5.19 (m, 1H), 5.23 (m, 1H), 5.48 (m, 1H), 6.08 (1H, s), 6.50 (m, 1H), 6.93 (bs, 2H), 7.33 (m, 1H), 8.02 (s, 1H).

Пример 2

4-Амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7H-пироло [2,3-d] пиримидин



Етап А. 3,5-Бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-1-О-метил-алфа-D-рибофураноза

Смес от 2-О-ацетил-3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-1-О-метил-алфа-D-рибофураноза [за приготвянето виж: *Helv. Chim. Acta* 78: 486 (1995)] (52.4 g, 0.10 mol) в разтвор на K₂CO₃ в метанол (500 ml, наситен на стайна температура), се бърка на стайна температура в продължение на 45 min и след това се концентрира при понижено налягане. Масленият остатък се суспендира в CH₂Cl₂ (500 ml), измива се с вода (300 ml + 5 x 200 ml) и солев разтвор (200 ml), изсушава се (Na₂SO₄), филтрува се и се концентрира, за да се получи съединението от заглавието (49.0 g) като безцветно масло, което се използва по-нататък без да се пречиства в Етап В по-долу.

¹H NMR (DMSO-d₆): делта 3.28 (s, 3H, OCH₃), 3.53 (d, 2H, J_{5,4} = 4.5 Hz, H-5a, H-5b), 3.72 (dd, 1H, J_{3,4} = 3.6 Hz, J_{3,2} = 6.6 Hz, H-3), 3.99 (ddd, 1H, J_{2,1} = 4.5 Hz, J_{2,OH-2} = 9.6 Hz, H-2), 4.07 (m, 1H, H-4), 4.50 (s, 2H, CH₂Ph), 4.52, 4.60 (2d, 2H, J_{gem} = 13.6 Hz, CH₂Ph), 4.54 (d, 1H, OH-2), 4.75 (d, 1H, H-1), 7.32-7.45, 7.52-7.57 (2m, 10H, 2Ph).

¹³C NMR (DMSO-d₆): делта 55.40, 69.05, 69.74, 71.29, 72.02, 78.41, 81.45, 103.44, 127.83, 127.95, 129.05, 129.28, 131.27, 131.30, 133.22, 133.26, 133.55, 133.67, 135.45, 135.92.

Етап В. 3,5-Бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-1-О-метил-алфа-D-еритро-пентофураноз-2-улоза

Към леденостудена суспензия от Dess-Martin перийодинан (50.0 g, 118 mmol) в безводен CH_2Cl_2 (350 ml) под аргон (Ar), се добавя разтвор от съединението от Етап А на капки (36.2 g, 75 mmol) в безводен CH_2Cl_2 (200 ml), в продължение на 0.5 h. Реакционната смес се бърка при 0°C в продължение на 0.5 h и след това на стайна температура в продължение на 3 дена. Сместа се разрежда с безводен Et_2O (600 ml) и се излива в леденостудена смес от $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (180 g) в наситен воден NaHCO_3 (1400 ml). Фазите се разделят и органичната фаза се измива с наситен воден NaHCO_3 (600 ml), вода (800 ml) и солев разтвор (600 ml), изсушава се (MgSO_4), филтрува се и се изпарява, за да се получи съединението от заглавието (34.2 g), като безцветно масло, което се използва по-нататък без да се пречиства в Етап С по-долу.

^1H NMR (CDCl_3): делта 3.50 (s, 3H, OCH_3), 3.79 (dd, 1H, $J_{5a,5b} = 11.3$ Hz, $J_{5a,4} = 3.5$ Hz, H-5a), 3.94 (dd, 1H, $J_{5b,4} = 2.3$ Hz, H-5b), 4.20 (dd, 1H, $J_{3,1} = 1.3$ Hz, $J_{3,4} = 8.4$ Hz, H-3), 4.37 (ddd, 1H, H-4), 4.58, 4.69 (2d, 2H, $J_{\text{gem}} = 13.0$ Hz, CH_2Ph), 4.87 (d, 1H, H-1), 4.78, 5.03 (2d, 2H, $J_{\text{gem}} = 12.5$ Hz, CH_2Ph), 7.19-7.26, 7.31-7.42 (2m, 10H, 2Ph).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): делта 55.72, 69.41, 69.81, 69.98, 77.49, 78.00, 98.54, 127.99, 128.06, 129.33, 129.38, 131.36, 131.72, 133.61, 133.63, 133.85, 133.97, 134.72, 135.32, 208.21.

Етап С. 3,5-Бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С-метил-1-О-метил-алфа-D-рибофураноза

Към разтвор от MeMgBr в безводен Et_2O (0.48 M, 300 ml), при -55°C се добавя на капки разтвор от съединението от Етап В (17.40 g, 36.2 mmol) в безводен Et_2O (125 ml). Реакционната смес се оставя да се затопли до -30°C и се разбърква в продължение на 7 h при -30°C до -15°C, след това се излива в леденостудена вода (500 ml) и сместа се разбърква интензивно на стайна температура в продължение на 0.5 h. Сместа се филтрува през Celite филтърен слой (10x5 cm), който се измива старателно с Et_2O .

Органичната фаза се изсушава (MgSO_4), филтрува се и се концентрира. Остатъкът се разтваря в хексани (~ 30 ml), нанася се върху силикагел колона (10 x 7 cm, предварително пакутирана с хексани) и се елуира с хексани и хексани/ EtOAc (9/1), за да се получи съединението от заглавието (16.7 g), като безцветен сироп.

^1H NMR (CDCl_3): делта 1.36 (d, 3H, $J_{\text{Me, OH}} = 0.9$ Hz, 2C-Me), 3.33 (q, 1H, OH), 3.41 (d, 1H, $J_{3,4} = 3.3$ Hz), 3.46 (s, 3H, OCH_3), 3.66 (d, 2H, $J_{5,4} = 3.7$ Hz, H-5a, H-5b), 4.18 (привидно q, 1H, H-4), 4.52 (s, 1H, H-1), 4.60 (s, 2H, CH_2Ph), 4.63, 4.81 (2d, 2H, $J_{\text{gem}} = 13.2$ Hz, CH_2Ph), 7.19-7.26, 7.34-7.43 (2m, 10H, 2Ph).

^{13}C NMR (CDCl_3): делта 24.88, 55.45, 69.95, 70.24, 70.88, 77.06, 82.18, 83.01, 107.63, 127.32, 129.36, 130.01, 130.32, 133.68, 133.78, 134.13, 134.18, 134.45, 134.58.

Етап D. 4-Хлоро-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С-метил-бета-D-рибофуранозил]-7H-пироло [2,3-d] пиримидин

Към разтвор от съединението от Етап С (9.42 g, 19 mmol) в безводен дихлорометан (285 ml), при 0°C се добавя на капки HBr (5.7 M в оцетна киселина, 20 ml, 114 mmol). Полученият разтвор се разбърква при 0°C в продължение на 1 h и след това на стайна температура в продължение на 3 h, изпарява се под вакуум и се съизпарява с безводен толуен (3 x 40 ml). Масленият остатък се разтваря в безводен ацетонитрил (50 ml) и се добавя към разтвор от натриева сол от 4-хлоро-1H-пироло [2,3-d] пиримидин в ацетонитрил [получен *in situ* от 4-хлоро-1H-пироло [2,3-d] пиримидин [за приготвянето виж: J. Chem. Soc.: 131 (1960)] (8.76 g, 57 mmol) в безводен ацетонитрил (1000 ml), и NaN (60 % в минерално масло, 2.28 g, 57 mmol), след 4 h интензивно разбъркване на стайна температура]. Комбинираната смес се бърка на стайна температура в продължение на 24 h и след това се изпарява до сухост. Остатъкът се суспендира във вода (250 ml) и се екстрахира с EtOAc (2 x 500 ml).

Комбинираните екстракти се измиват със солев разтвор (300 ml), изсушават се над Na_2SO_4 , филтруват се и се изпаряват. Грубият продукт се пречиства върху силикагел колона (10 cm x 10 cm), като се използва етил ацетат/хексан (1:3 и 1:2) като елуент. Фракциите, съдържащи продукта се комбинират и се изпаряват под вакуум, за да се получи желаният продукт (5.05 g) като безцветна пяна.

^1H NMR (CDCl_3): делта 0.93 (s, 3H, CH_3), 3.09 (s, 1H, OH), 3.78 (dd, 1H, $J_{5',5''} = 10.9$ Hz, $J_{5',4} = 2.5$ Hz, H-5'), 3.99 (dd, 1H, $J_{5'',4} = 2.2$ Hz, H-5''), 4.23-4.34 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.63, 4.70 (2d, 2H, $J_{\text{gem}} = 12.7$ Hz, CH_2Ph), 4.71, 4.80 (2d, 2H, $J_{\text{gem}} = 12.1$ Hz, CH_2Ph), 6.54 (d, 1H, $J_{5,6} = 3.8$ Hz,

H-5), 7.23-7.44 (m, 10H, 2Ph).

^{13}C NMR (CDCl_3): делта 21.31, 69.10, 70.41, 70.77, 79.56, 80.41, 81.05, 91.11, 100.57, 118.21, 127.04, 127.46, 127.57, 129.73, 129.77, 130.57, 130.99, 133.51, 133.99, 134.33, 134.38, 134.74, 135.21, 151.07, 151.15, 152.47.

Етап Е. 4-Хлоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към разтвор от съединението от Етап D (5.42 g, 8.8 mmol) в дихлорометан (175 ml), при -78°C , се добавя на капки борен трихлорид (1M в дихлорометан, 88 ml, 88 mmol). Сместа се бърка при -78°C в продължение на 2.5 h, след това при -30°C до -20°C в продължение на 3 h. Реакцията се гаси чрез добавяне на метанол/ дихлорометан (1:1) (90 ml) и получената смес се бърка при -15°C в продължение на 30 min, след това се неутрализира с воден амоняк при 0°C и се разбърква на стайна температура в продължение на 15 min. Твърдата фаза се филтрува и се измива с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1/1, 250 ml). Комбинираният филтрат се изпарява и остатъкът се пречиства чрез бърза хроматография върху силикагел, като се използва CH_2Cl_2 и $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (99:1, 98:2, 95:5 и 90:10) градиент като елуент, за да се получи желаното съединение (1.73 g), като безцветна пяна, която се превръща в аморфна твърда фаза след третиране с MeCN.

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): делта 0.64 (s, 3H, CH_3), 3.61-3.71 (m, 1H, H-5'), 3.79-3.88 (m, 1H, H-5''), 3.89-4.01 (m, 2H, H-3', H-4'), 5.15-5.23 (m, 3H, 2'-OH, 3'-OH, 5'-OH), 6.24 (s, 1H, H-1'), 6.72 (d, 1H, $J_{5,6} = 3.8$ Hz, H-5), 8.13 (d, 1H, H-6), 8.65 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): делта 20.20, 59.95, 72.29, 79.37, 83.16, 91.53, 100.17, 117.63, 128.86, 151.13, 151.19, 151.45.

Етап F. 4-Амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към съединението от Етап Е (1.54 g, 5.1 mmol) се добавя метанолов разтвор на амоняк (наситен при 0°C ; 150 ml). Сместа се нагрява в автоклав от неръждаема стомана при 85°C в продължение на 14 h, след това се охлажда и се изпарява под вакуум. Грубата смес се пречиства върху силикагел колона с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9/1) като елуент, за да се получи съединението от заглавието като безцветна пяна (0.8 g), която се отделя като аморфна твърда фаза след третиране с

MeCN. Аморфната твърда фаза се рекристализира от метанол/ацетонитрил; т. т. 222°C .

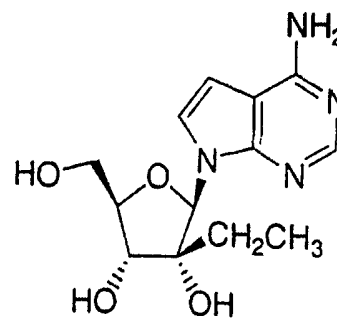
^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) делта 0.62 (s, 3H, CH_3), 3.57-3.67 (m, 1H, H-5'), 3.75-3.97 (m, 3H, H-5'', H-4', H-3'), 5.00 (s, 1H, 2'-OH), 5.04 (d, 1H, $J_{3',\text{OH},3'} = 6.8$ Hz, 3'-OH), 5.06 (t, 1H, $J_{5',\text{OH},5'} = 5.1$ Hz, 5'-OH), 6.11 (s, 1H, H-1'), 6.54 (d, 1H, $J_{5,6} = 3.6$ Hz, H-5), 6.97 (br s, 2H, NH_2), 7.44 (d, 1H, H-6), 8.02 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) делта 20.26, 60.42, 72.72, 79.30, 82.75, 91.20, 100.13, 103.08, 121.96, 150.37, 152.33, 158.15.

LC-MS: Намерено: 279.10 ($\text{M}-\text{H}^+$); изчислено за $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4+\text{H}^+$: 279.11.

Пример 3

4-Амино-7-(2-С-етил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Етап А. 3,5-Бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С-етил-1-О-метил-алфа-D-рибофураноза

Към диетилов етер (300 ml), при -78°C се добавя бавно EtMgBr (3.0 M, 16.6 ml) и след това на капки съединението от Етап В от Пример 2 (4.80 g, 10.0 mmol) в безводен Et_2O (100 ml). Реакционната смес се бърка при -78°C в продължение на 15 min, остава се, за да се затопли до -15°C и се разбърква допълнително в продължение на още 2 h и след това се излива при разбъркване в смес от вода (300 ml) и Et_2O (600 ml). Органичната фаза се отделя, изсушава се (MgSO_4) и се изпарява под вакуум. Грубият продукт се пречиства върху силикагел, като се използва етил ацетат/хексан (1:2) като елуент. Фракциите, съдържащи продукта се събират и се изпаряват под вакуум, за да се получи желаният продукт (3.87 g) като безцветно масло.

Етап В. 4-Хлоро-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С-етил-бета-D-рибофуранозил]-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към разтвор от съединението от Етап А

(1.02 mg, 2.0 mmol) в дихлорометан (40 ml), се добавя на капки HBr (5.7 M в оцетна киселина) (1.75 ml, 10.0 mmol), при 0°C. Полученият разтвор се бърка на стайна температура в продължение на 2 h, изпарява се под вакуум и два пъти се съизпарява от толуен (10 ml). Масленият остатък се разтваря в ацетонитрил (10 ml) и се добавя при интензивно разбъркване към смес от 4-хлоро-1H-пироло [2,3-d] пиримидин (307 mg, 2.0 mmol), калиева основа (337 mg, 6.0 mmol) и трис [2-(2-метоксиетокси) етил] амин (130 mg, 0.4 mmol) в ацетонитрил (10 ml). Получената смес се бърка на стайна температура в продължение на една нощ и след това се излива при разбъркване в смес от наситен амониев хлорид (100 ml) и етил ацетат (100 ml). Органичната фаза се отделя, измива се със солев разтвор (100 ml), изсушава се върху MgSO₄, филтрува се и се изпарява под вакуум. Грубият продукт се пречиства върху силикагел, като се използва етил ацетат/хексан (1:2) като елуент, за да се получи желаният продукт (307 mg) като безцветна пяна.

Етап С. 4-Хлоро-7-(2-С-етил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към разтвор от съединението от Етап В (307 mg, 0.45 mmol) в дихлорометан (8 ml) се добавя боров трихлорид 1M в дихлорометан (4.50 ml, 4.50 mmol) при -78°C. Сместа се бърка при -78°C в продължение на 1 h, след това при -10°C в продължение на 3 h. Реакцията се гаси чрез добавяне на метанол/дихлорометан (1:1) (10 ml), разбърква се при -15°C в продължение на 30 min и се неутрализира чрез добавяне на амониева основа във вода. Сместа се изпарява при понижено налягане и полученото масло се пречиства върху силикагел, като се използва метанол/дихлорометан (1:9) като елуент. Фракциите съдържащи продукта се събират и се изпаряват под вакуум, за да се получи желаният продукт (112 mg), като безцветна пяна.

Етап D. 4-Амино-7-(2-С-етил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към съединението от Етап С (50 mg, 0.16 mmol) се добавя наситен амоняк в метанол (4 ml). Сместа се бърка при 75°C в продължение на 72 h, в затворен контейнер, охлажда се и се изпарява под вакуум. Грубата смес се пречиства върху силикагел, като се използва метанол/дихлорометан (1:9) като елуент. Фракциите, съдържащи продукта се събират и се изпаряват

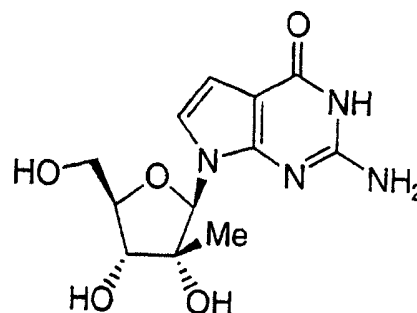
под вакуум, за да се получи желаният продукт (29 mg) като а безцветен прах.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): делта 0.52 (t, 3H), 1.02 (m, 2H), 4.01-3.24 (m, 6H), 5.06 (m, 1H), 6.01 (s, 1H), 6.51 (d, 1H), 6.95 (s br, 2H), 6.70 (d, 1H), 7.99 (s, 1H).

LC-MS: Намерено: 295.2 (M+H⁺); изчислено за C₁₃H₁₈N₄O₄ + H⁺: 295.14.

Пример 4

2-Амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-4(3Н)-он



Етап А. 2-Амино-4-хлоро-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенил-метил)-2-С-метил-бета-D-рибофуранозил]-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към леденостуден разтвор на продукта от Етап С, от Пример 2 (1.27 g, 2.57 mmol) в CH₂Cl₂ (30 ml), се добавя на капки HBr (5.7 M в оцетна киселина; 3 ml). Реакционната смес се бърка на стайна температура в продължение на 2 h, концентрира се при понижено налягане и се съизпарява с толуен (2 x 15 ml). Полученото масло се разтваря в ацетонитрил (MeCN) (15 ml) и се добавя на капки в добре разбъркана смес от 2-амино-4-хлоро-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин [за приготвянето виж, Heterocycles 35: 825 (1993)] (433 mg, 2.57 mmol), KOH (85 %, на прах) (0.51 g, 7.7 mmol), трис-[2-(2-метоксиетокси) етил] амин (165 microl, 0.51 mmol) в ацетонитрил (30 ml). Получената смес се бърка на стайна температура в продължение на 1 h, филтрува се и се изпарява. Остатъкът се пречиства върху силикагел колона, като се използва хексани/EtOAc, 5/1, 3/1 и 2/1, като елуент, за да се получи съединението от заглавието като а безцветна пяна (0.65 g).

Етап В. 2-Амино-4-хлоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към разтвор на продукта от Етап А (630 mg, 1.0 mmol) в CH₂Cl₂ (20 ml) при -78°C, се

добавя бор трихлорид (1M в CH_2Cl_2) (10 ml, 10 mmol). Сместа се бърка при -78°C в продължение на 2 h, а след това при -20°C в продължение на 2.5 h. Реакцията се гаси с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) (10 ml), разбърква се при -20°C в продължение на 0.5 h и се неутрализира при 0°C с воден амоняк. Твърдата фаза се филтрува, измива се с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) и комбинираният филтрат се изпарява под вакуум. Остатъкът се пречиства върху силикагел колона с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 50/1 и 20/1, като елуент, за да се получи съединението от заглавието като а безцветна пяна (250 mg).

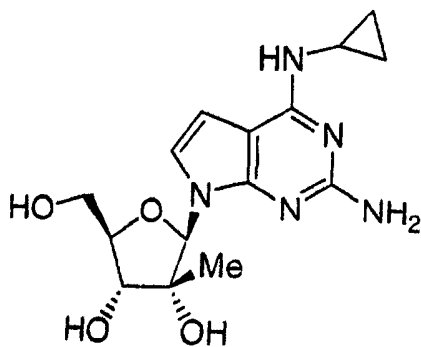
Етап С. 2-Амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-4 (3Н)-он

Смес от продукта от Етап В (90 mg, 0.3 mmol) във водна NaOH (2N, 9 ml), се нагрява под обратен хладник в продължение на 5 h, след това се неутрализира при 0°C с 2 N водна HCl и се изпарява до сухост. Пречистването върху силикагел колона с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 5/1, като елуент, дава възможност да се получи съединението от заглавието, като бяла твърда фаза (70 mg).

^1H NMR (200 MHz, CD_3OD): делта 0.86 (s, 3H), 3.79 (m, 1H), 3.90-4.05 (m, 3H), 6.06 (s, 1H), 6.42 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H).

Пример 5

2-Амино-4-циклопропиламино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



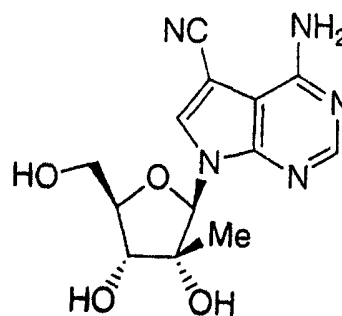
Разтвор от 2-амино-4-хлоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин (Пример 4, Етап В) (21 mg, 0.07 mmol) в циклопропиламин (0.5 ml), се нагрява при 70°C в продължение на два дни, след това се изпарява до маслен остатък и се пречиства върху силикагел колона с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 20/1, като елуент, за да се получи съединението от заглавието като

бяла твърда фаза (17 mg).

^1H NMR (200 MHz, CD_3CN): делта 0.61 (m, 2H), 0.81 (m, 2H), 0.85 (s, 3H), 2.83 (m, 1H), 3.74-3.86 (m, 1H), 3.93-4.03 (m, 2H), 4.11 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.02 (s, 1H), 6.49 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H).

Пример 6

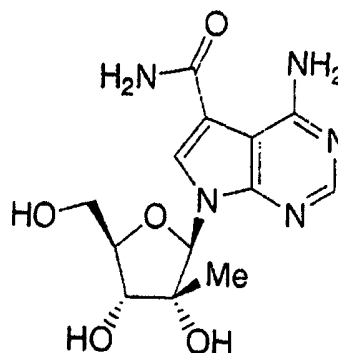
4-Амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-5-карбонитрил



Това съединение се приготвя, като се следват методите, описани от Y. Murai et al. в Heterocycles 33: 391-404 (1992).

Пример 7

4-Амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-5-карбоксамид



Това съединение се приготвя, като се следват методите, описани от Y. Murai et al. в Heterocycles 33: 391-404 (1992).

Пример 8

Общ метод за SATE пролекарствена група

8-Ацил-2-тиоетил (SATE) пронуклеотидите са дискутирани в C. R. Wagner, V. V. Iyer, and E. J. McIntee, "Pronucleotides: Toward the In Vivo Delivery of Antiviral and Anticancer Nucleotides", Med. Res. Rev., 20: 1-35 (2000), която е включена

на изцяло тук в цитираната литература. SATE производни на нуклеозидите са описани също така в U. S. Патент №. 5,770,725; 5,849,905; и 6,020,482, като съдържанието на всеки един от тях, е включено изцяло в цитираната тук литература.

Бис (S-ацетил-2-тиоетил)-N,N-диизопропилфосфорамидит

2-Меркаптоетанол (5 g, 64 mmol) се разваря в CH_2Cl_2 (50 ml). Към този разтвор се добавя триетиламин (7.67 ml, 57.6 mmol), и реакционната смес се охлажда върху ледена баня при 0°C. На капки се добавя оцетен анхидрид (4.54 ml, 48 mmol) в продължение на 10 min и реакционната смес се бърка в продължение на 1 h, при 0°C. След това, реакционната смес се оставя да се темперира до стайна температура в продължение на 2 h. Реакционната смес се разрежда с CH_2Cl_2 (50 ml), измива се с вода (75 ml), 5 % воден NaHCO_3 (75 ml) и солев разтвор (75 ml). Органичната фаза се изсушава върху безводен Na_2SO_4 и се концентрира под вакуум, за да се получи масло. След това маслото се разваря в безводен THF (40 ml) и се добавя безводен триетиламин (7.76 ml). Към тази смес се добавят активирани молекулни сита (4) и се съхраняват на стайна температура в продължение на 10 min. Реакционната смес се охлажда в ледена баня до 0°C и се добавя диизопропилфосфорамид дихлорид (6.47 g, 32.03 mmol). Реакционната смес се бърка при 0°C в продължение на 2 h под инертна атмосфера. Към реакционната смес се добавя хексан (40 ml) и образуваният преципитат се филтрува. Филтратът се концентрира до една четвърт от обема, пречиства се чрез нанасяне върху силикагел колонна хроматография и се елуира с хексан, съдържащ 3 % триетиламин и нарастващо количество от етил ацетат (0 до 7 %), за да се получи съединението от заглавието като масло (2.36 g).

^1H NMR (CDCl_3): делта 1.17 (s, 6H), 1.21 (s, 6H), 2.36 (s, 6H), 3.14 (t, J = 6.44 Hz), 3.51-3.84 (m, 6H);

^{13}C NMR (CDCl_3): делта 24.47, 24.61, 30.48, 42.85, 43.1, 61.88, 62.23, 195.26;

^{31}P NMR (CDCl_3): делта 146.96.

Пример 9

5'-Трифосфат производни

Нуклеозид 5'-трифосфатите от настоящото изобретение се приготвят, като се следват

методите, описани в Chem. Rev. 100: 2047 (2000).

Пример 10

Пречистване и анализ за чистота на 5'-трифосфат производни

Трифосфат производните се пречистват чрез анионообменна (AX) хроматография, като се използва 30 x 100 mm Mono Q колона (Pharmacia) с буферна система от 50 mM Трис, pH 8. Градиентите за елуиране са типични от 40 mM NaCl до 0.8 M NaCl в два колонни обема, при 6.5 ml/min. Подходящите фракции от анионообменната хроматография се събират и се обезсоляват чрез хроматография с обърната фаза (RP), като се използва Luna C18 250 x 21 mm колона (Phenomenex), със скорост на потока от 10 ml/min. Градиентите на елуиране обикновено са от 1 % до 95 % метанол за 14 min, при постоянна концентрация от 5 mM триетиламониев ацетат (TEAA).

Масспектрите на пречистените трифосфати се определят чрез използване на он лайн HPLC масспектрометър Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) MSD 1100. За RP HPLC се използва Phenomenex Luna (C18 (2)), 150 x 2 mm, плюс 30 x 2 mm guard колона, и 3- μm размер на частиците. Прави се линеен градиент от 0 до 50 % (15 min) от ацетонитрил в 20 mM TEAA (триетиламониев ацетат) pH 7, в серии с масспектрална детекция, при режим на отрицателна йонизация. За да се генерира електроспрей се използват азотен газ и пневматичен пулверизатор. Избира се масов обхват от 150-900. Молекулните маси се определят чрез използване на HP Chemstation комплексен анализ.

Чистотата на пречистените трифосфати се определя чрез аналитична RP и AX HPLC. RP HPLC с Phenomenex Luna или Jupiter колона (250 x 4.6 mm), с 5- μm размер на частиците се пуска обикновено с градиент от 2-70 % ацетонитрил, за 15 min в 100 mM TEAA, pH 7. AX HPLC се провежда върху 1.6 x 5 mm Mono Q колона (Pharmacia). Трифосфатите се елуират с градиент от 0 до 0.4 M NaCl, при постоянна концентрация от 50 mM Трис, pH 8. Чистотата на трифосфатите обикновено е > 80 %.

Пример 11

5'-Монофосфат производни

Нуклеозид 5'-монофосфатите от настоящото изобретение се приготвят, като се следват стандартните методи, описани в Tetrahedron Lett. 50:

5065 (1967).

Пример 12

Масспектрална характеристика на 5'-трифосфат производните

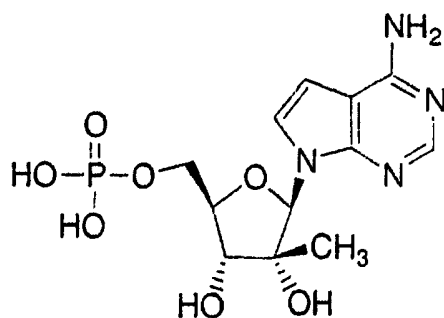
Масспектрите на 5'-трифосфатите на съединенията от настоящото изобретение се опре-

делят както е описано в Пример 10. В следващата таблица са изчислени експерименталните маси на представените 5'-трифосфати, приготвени съгласно методите, описани в Пример 9. Примерните номера съответстват на изходното съединение на 5'-трифосфата.

Пример	Изчислено	Намерено
1	520.0	519.9
2	520.0	520.0
3	534.0	534.0
4	536.0	536.0

Пример 13

[4-Амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d]-пиримидин]-5'-монофосфат

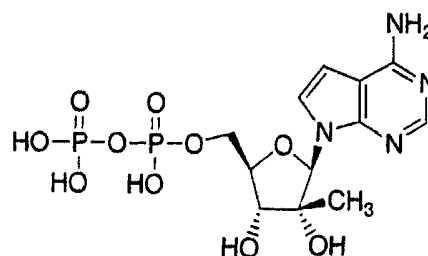


Към съединението от Етап F от Пример 2 (14 mg, 0.05 mmol) (изсушено чрез съизпаряване с пиридин и няколко пъти с толуен), се добавя триметил фосфат (0.5 ml). Сместа се бърка в продължение на една нощ в запечатан контейнер. След това тя се охлажда до 0°C и при разбъркване се добавя фосфорен оксихлорид (0.0070 ml, 0.075 mmol). Сместа се разбърква в продължение на 3 h при 0°C, след това реакцията се гаси чрез добавяне на тетраетиламониев бикарбонат (TEAB) (1M) (0.5 ml) и вода (5 ml). Реакционната смес се пречиства и се анализира съгласно метода описан в Пример 10.

Масспектър с електронно разпръскване (ES-MS): Намерено: 359.2 (M-H⁺), изчислено за C₁₂H₁₇N₄O₇P - H⁺: 359.1.

Пример 14

[4-Амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d]-пиримидин]-5'-дифосфат

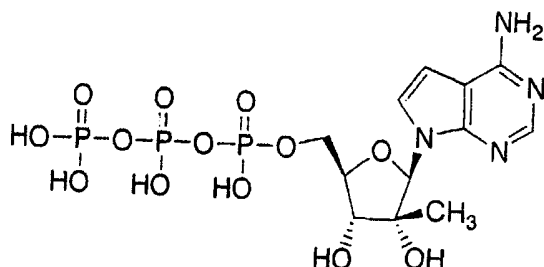


Към съединението от Етап F от Пример 2 (56 mg, 0.20 mmol) (изсушено чрез съизпаряване с пиридин и няколко пъти с толуен), се добавя триметил фосфат (съхраняван върху сита) (1.0 ml). Сместа се бърка в продължение на една нощ в запечатан контейнер. След това тя се охлажда до 0°C и при разбъркване се добавя фосфорен оксихлорид (0.023 ml, 0.25 mmol). Сместа се разбърква в продължение на 2 h при 0°C, след това се добавя трибутиламин (0.238 ml, 1.00 mmol) и трибутиламониев фосфат (получен от фосфорна киселина и трибутиламин в пиридин, последвано от повторено азеотропно изпаряване с пиридин и ацетонитрил) (1.0 mmol в 3.30 ml ацетонитрил). Сместа се бърка допълнително в продължение на още 30 min при 0°C, след това запечатаният контейнер се отваря и реакцията се гаси чрез добавяне на TEAB (1M) (1.0 ml) и вода (5 ml). Реакционната смес се пречиства и се анализира съгласно метода описан в Пример 10.

ES-MS: Намерено: 439.0 (M-H⁺), изчислено за C₁₂H₁₈N₄O₁₀P₂-H⁺: 439.04.

Пример 15

[4-Амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d]-пиримидин]-5'-трифосфат

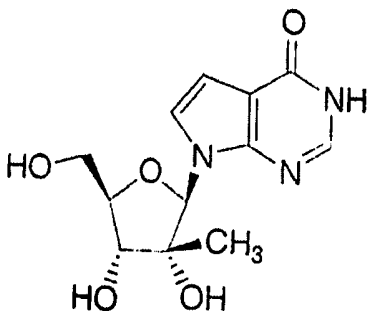


Към съединението от Етап F от Пример 2 (20 mg, 0.07 mmol) (изсушено чрез съизпаряване с пиридин и няколко пъти с толуен), се добавя триметил фосфат (съхраняван върху сита) (0.4 ml). Сместа се бърка в продължение на една нощ в запечатан контейнер. След това тя се охлажда до 0°C и при разбъркване се добавя фосфорен оксихлорид (0.0070 ml, 0.075 mmol). Сместа се разбърква в продължение на 3 h при 0°C, след това се добавя трибутиламин (0.083 ml, 0.35 mmol), трибутиламониев фосфат (127 mg, 0.35 mmol) и ацетонитрил (съхраняван върху сита) (0.25 ml). Сместа се бърка допълнително в продължение на още 30 min при 0°C, след това запечатаният контейнер се отваря и реакцията се гаси чрез добавяне на TEAB (1M) (0.5 ml) и вода (5 ml). Реакционната смес се пречиства и се анализира съгласно метода, описан в Пример 10.

ES-MS: Намерено: 519.0 (M-H⁺), изчислено за C₁₂H₁₉N₄O₁₃P₃ - H⁺: 519.01.

Пример 16

7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-4(3H)-он



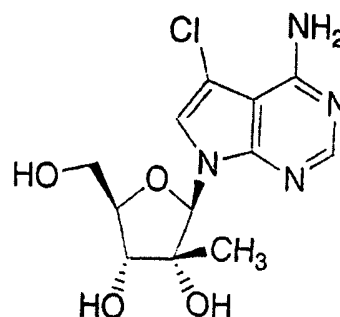
Към съединението от Етап E от Пример 2 (59 mg, 0.18 mmol), се добавя натриева основа

във вода (1M). Сместа се нагрява под обратен хладник в продължение на 1 h, охлажда се, неутрализира се с HCl във вода (2M) и се изпарява под вакуум. Остатъкът се пречиства върху силикагел, като се използва дихлорометан/метанол (4:1) като елуент. Фракциите съдържащи продукта се събират и изпаряват под вакуум, за да се получи желаният продукт (53 mg), като безцветно масло.

¹H NMR (CD₃CN): делта 0.70 (s, 3H), 3.34-4.15 (припокриване m, 7H), 6.16 (s, 1H), 6.57 (d, 3.6 Hz, 1H), 7.37 (d, 3.6 Hz, 1H), 8.83 (s, 1H).

Пример 17

4-Амино-5-хлоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Към предварително охладен разтвор (0°C) от съединението от Етап F от Пример 2 (140 mg, 0.50 mmol) в DMF (2.5 ml), се добавя на капки N-хлоросукцинимид (0.075 g, 0.55 mmol) в DMF (0.5 ml). Разтворът се бърка на стайна температура в продължение на 1 h и реакцията се гаси чрез добавяне на метанол (4 ml) и се изпарява под вакуум.

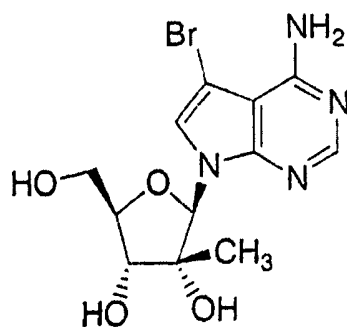
Грубият продукт се пречиства върху силикагел, като се използва метанол/дихлорометан (1:9) като елуент. Фракциите, съдържащи продукта се събират и се изпаряват под вакуум, за да се получи желаният продукт (55 mg) като безцветна твърда фаза.

¹H NMR (CD₃CN): делта 0.80 (s, 3H), 3.65-4.14 (припокриване m, 7H), 5.97 (s br, 2H), 6.17 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 8.16 (s, 1H).

ES-MS: Намерено: 315.0 (M+H⁺), изчислено за C₁₂H₁₅ClN₄O₄ + H⁺: 315.09.

Пример 18

4-Амино-5-бромо-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



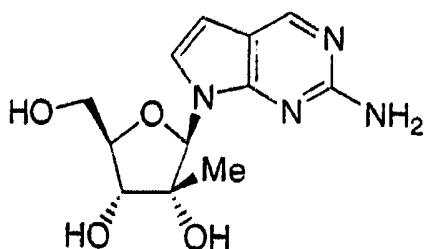
Към предварително охладен разтвор (0°C) от съединението от Етап F от Пример 2 (28 mg, 0.10 mmol) в DMF (0.5 ml), се добавя на капки N-бромосукцинимид (0.018 g, 0.10 mmol) в DMF (0.5 ml). Разтворът се бърка при 0°C в продължение на 20 min, а след това на стайна температура в продължение на 10 min. Реакцията се гаси чрез добавяне на метанол (4 ml) и се изпарява под вакуум. Грубият продукт се пречиства върху силикагел, като се използва метанол/дихлорометан (1:9) като елуент. Фракциите, съдържащи продукта се събират и изпаряват под вакуум, за да се получи желаният продукт (13.0 mg) като безцветна твърда фаза.

¹H NMR (CD₃CN): делта 0.69 (s, 3H), 3.46-4.00 (припокриване m, 7H), 5.83 (s br, 2H), 6.06 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 8.05 (s, 1H).

ES-MS: Намерено: 359.1 (M+H⁺), изчислено за C₁₂H₁₅BrN₄O₄ + H⁺: 359.04.

Пример 19

2-Амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Смес от 2-амино-4-хлоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин (Пример 4, Етап В) (20 mg, 0.07 mmol) в EtOH (1.0 ml), пиридин (0.1 ml) и 10 % Pd/C (6 mg) под H₂ (атмосферно налягане), се разбърква в продължение на една нощ, на стайна температура. Сместа се филтрува през Celite филтър, който е измит старателно с EtOH. Комбинираният филтрат се изпарява и се пречиства върху силикагел колона с CH₂Cl₂/MeOH, 20/1 и 10/1 като елуент, за да се получи съединени-

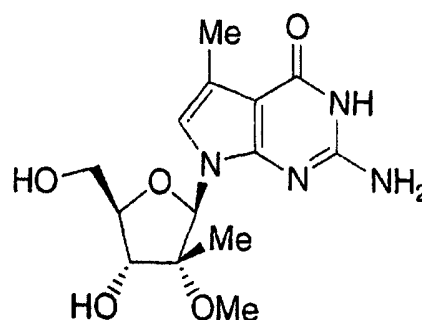
ето от заглавието като бяла твърда фаза (16 mg).

¹H NMR (200 MHz, CD₃OD): делта 0.86 (s, 3H, 2'C-Me), 3.82 (dd, J_{5',4'} = 3.6 Hz, J_{5,5'} = 12.7 Hz, 1H, H-5'), 3.94-4.03 (m, 2H, H-5', H-4'), 4.10 (d, J_{3',4'} = 8.8 Hz, 1H, H-3'), 6.02 (s, 1H, H-1'), 6.41 (d, J_{5,6} = 3.8 Hz, 1H, H-5), 7.39 (d, 1H, H-6), 8.43 (s, 1H, H-4).

ES MS: 281.4 (MH⁺).

Пример 20

2-Амино-5-метил-7-(2-С,2-О-Диметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-4(3H)-он



Етап А: 2-Амино-4-хлоро-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенил-метил)-2-С-метил-бета-D-рибофуранозил]-5-метил-7Н-пироло[2,3-d]пиримидин

Към леденостуден разтвор от продукта от Етап С от Пример 2 (1.57 g, 3.16 mmol) в CH₂Cl₂ (50 ml), се добавя на капки HBr (5.7 M в оцетна киселина; 3.3 ml). Реакционната смес се бърка при 0°C в продължение на 1 h и след това на стайна температура в продължение на 2 h, концентрира се под вакуум и се съизпарява с толуен (2 x 20 ml). Полученото масло се разтваря в MeCN (20 ml) и на капки се добавя към разтвор от натриева сол от 2-амино-4-хлоро-5-метил-1Н-пироло [2,3-d] пиримидин в ацетонитрил [получен in situ от 2-амино-4-хлоро-5-метил-1Н-пироло [2,3-d] пиримидин [за приготвянето виж, Liebigs Ann. Chem. 1984: 708-721] (1.13 g, 6.2 mmol) в безводен ацетонитрил (150 ml) и NaN (60 % в минерално масло, 248 mg, 6.2 mmol), след интензивно разбъркване в продължение на 2 h на стайна температура]. Комбинираната смес се бърка на стайна температура в продължение на 24 h и след това се изпарява до сухост. Остатъкът се суспендира във вода (100 ml) и се екстрахира с EtOAc (300 + 150 ml). Комбинираните екстракти се измиват със солев разтвор (100 ml), изсушават се върху Na₂SO₄, филтруват се

и се изпаряват. Грубият продукт се пречиства върху силикагел колона (5x7 cm), като се използва етил ацетат/хексан (0 до 30 % EtOAc в 5 % стъпаловиден градиент) като елуент. Фракциите, съдържащи продукта се комбинират и се изпаряват под вакуум, за да се получи желаният продукт (0.96 g), като а безцветна пяна.

Етап В. 2-Амино-4-хлоро-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С, 2-О-диметил-бета-D-рибофуранозил]-5-метил-7-пироло [2,3-d] пиримидин

Към леденостудена смес от продукта от Етап А (475 mg, 0.7 mmol) в THF (7 ml), се добавя NaH (60 % в минерално масло, 29 mg) и се бърка се при 0°C в продължение на 0.5 h. След това се добавя MeI (48 microl) и реакционната смес се бърка на стайна температура в продължение на 24 h. Реакцията се гаси с MeOH и сместа се изпарява. Грубият продукт се пречиства върху силикагел колона (5 x 3.5 cm), като се използва хексан/етил ацетат (9/1, 7/1, 5/1 и 3/1) като елуент. Фракциите, съдържащи продукта се събират и се изпаряват, за да се получи желаното съединение (200 mg), като а безцветна пяна.

Етап С. 2-Амино-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С, 2-О-диметил-бета-D-рибофуранозил]-5-метил-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-4(3Н)-он

Смес от продукта от Етап В (200 mg, 0.3 mmol) в 1,4-диоксан (15 ml) и NaOH във вода (2N, 15 ml), се нагрява в бутилка под налягане в продължение на една нощ при 135°C. След това сместа се охлажда до 0°C, неутрализира се с 2N HCl във вода и се изпарява до сухост. Грубият продукт се суспендира в MeOH, филтрува се и твърдата фаза се измива внимателно с MeOH. Комбинираният филтрат се концентрира и остатъкът се пречиства върху силикагел колона (5x5 cm), като се използва CH₂Cl₂/MeOH (40/1, 30/1 и 20/1) като елуент, за да се получи желаното съединение (150 mg), като безцветна пяна.

Етап D. 2-Амино-5-метил-7-(2-С,2-О-диметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-4(3Н)-он

Смес от продукта от Етап С (64 mg, 0.1 mmol) в MeOH (5 ml) и Et₃N (0.2 ml) и 10 % Pd/C (24 mg) се хидрират чрез Parr апарат за хидриране, при 50 psi, на стайна температура, в продължение на 1.5 дни, след това се филтрува през Celite филтърен слой, който е измит стара-

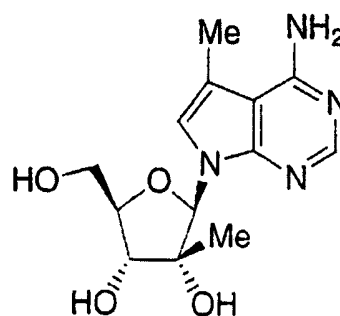
телно с MeOH. Комбинираният филтрат се изпарява и остатъкът се пречиства през силикагел колона (3x4 cm) с CH₂Cl₂/MeOH (30/1, 20/1), като елуент, за да се получи 2-амино-5-метил-7-(5-О-бензил-2-С, 2-О-диметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-4(3Н)-он. След това, съединението (37 mg) се хидрира в EtOH (2 ml) с 10 % Pd/C и под атмосферно налягане от водород. След разбъркване в продължение на 2 дена, на стайна температура, реакционната смес се филтрува през Celite филтър, филтратът се изпарява и грубият продукт се пречиства върху силикагел колона (1x7 cm) с CH₂Cl₂/MeOH (30/1, 20/1 и 10/1) като елуент, за да се получи съединението от заглавието (12 mg) след замразяване-изсушаване.

¹H NMR (200 MHz, CD₃OD): делта 0.81 (s, 3H, 2'-C-Me), 2.16 (d, J_{H-6'} C5-Me = 1-3 Hz, 3H, C5-Me), 3.41 (s, 3H, 2'-OMe), 3.67 (dd, J_{5',4'} = 3.4 Hz, J_{5',5''} = 12.6 Hz, 1H, H-5'), 3.81-3.91 (m, 3H, H-5'', H-4', H-3'), 6.10 (s, 1H, H-1'), 6.66 (d, 1H, H-6).

ES MS: 323.3 (M-H)⁺.

Пример 21

4-Амино-5-метил-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Етап А. 4-Хлоро-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С-метил-бета-D-рибофуранозил]-5-метил-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към леденостуден разтвор на продукта от Етап С от Пример 2 (1.06 g, 2.1 mmol) в CH₂Cl₂ (30 ml), на капки се добавя HBr (5.7 M в оцетна киселина; 2.2 ml). Реакционната смес се бърка при 0°C, в продължение на 1 h и след това на стайна температура в продължение на 2 h, концентрира се под вакуум и се съизпарява с толуен (2x15 ml). Полученото масло се разтваря в MeCN (10 ml) и се добавя на капки в разтвор от натриева сол, от 4-хлоро-5-метил-1Н-пироло [2,3-d] пиримидин в ацетонитрил [получен in situ от 4-хлоро-5-метил-1Н-пироло [2,3-d] пирими-

дин [за получаването виж, J. Med. Chem. 33: 1984 (1990)] (0.62 g, 3.7 mmol) в безводен ацетонитрил (70 ml) и NaH (60 % в минерално масло, 148 mg, 3.7 mmol), след интензивно разбъркване в продължение на 2 h, на стайна температура]. Комбинираната смес се бърка на стайна температура в продължение на 24 h и след това се изпарява до сухост. Остатъкът се суспендира във вода (100 ml) и се екстрахира с EtOAc (250 + 100 ml). Комбинираните екстракти се измиват със солев разтвор (50 ml), изсушават се над Na_2SO_4 , филтруват се и се изпаряват. Грубият продукт се пречиства върху силикагел колона (5 x 5 cm), като се използва хексан/етил ацетат (9/1, 5/1, 3/1) градиент като елуент. Фракциите, съдържащи продукта се комбинират и се изпаряват под вакуум, за да се получи желаният продукт (0.87 g) като безцветна пяна.

Етап В. 4-Хлоро-5-метил-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към разтвор от съединението от Етап А (0.87 g, 0.9 mmol) в дихлорометан (30 ml) при -78°C, се добавя на капки боров трихлорид (1M в дихлорометан, 9.0 ml, 9.0 mmol). Сместа се бърка при -78°C в продължение на 2.5 h, след това при -30°C до -20°C, в продължение на 3 h. Реакцията се гаси чрез добавяне на метанол/дихлорометан (1:1) (9 ml) и получената смес се бърка при -15°C в продължение на 30 min, след това се неутрализира с воден амониак при 0°C и се бърка на стайна температура в продължение на 15 min.

Твърдата фаза се филтрува и се измива с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1/1, 50 ml). Комбинираният филтрат се изпарява и остатъкът се пречиства върху силикагел колона (5x5 cm), като се използва CH_2Cl_2 и $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (40/1 и 30/1) градиент, като елуент, за да се получи желаното съединение (0.22 g) като безцветна пяна.

Етап С. 4-Амино-5-метил-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към съединението от Етап В (0.2 g, 0.64 mmol), се добавя амониак в метанол (наситен при 0°C; 40 ml). Сместа се нагрява в автоклав от неръждаема стомана, при 100°C в продължение на 14 h, след това се охлажда и се изпарява под вакуум. Грубата смес се пречиства върху силикагел колона (5 x 5 cm), с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (50/1, 50

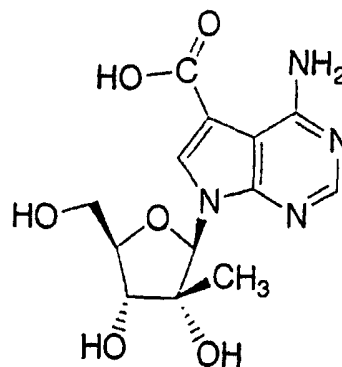
30/1, 20/1) градиент, като елуент, за да се получи съединението от заглавието като бяла твърда фаза (0.12 g).

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): делта 0.60 (s, 3H, 2'-C-Me), 2.26 (s, 3H, 5C-Me), 3.52-3.61 (m, 1H, H-5'), 3.70-3.88 (m, 3H, H-5'', H-4', H-3'), 5.00 (s, 1H, 2'-OH), 4.91-4.99 (m, 3H, 2'-OH, 3'-OH, 5'-OH), 6.04 (s, 1H, H-1'), 6.48 (br s, 2H, NH_2), 7.12 (s, 1H, H-6), 7.94 (s, 1H, H-2).

ES MS: 295.2 (MH)⁺.

Пример 22

4-Амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-5-карбоксилна киселина



Съединението от Пример 6 (0.035 g, 0.11 mmol) се разтваря в смес от воден амониак (4 ml, 30 wt %) и се насища с амониак в метанол (2 ml) и се добавя разтвор от H_2O_2 във вода (2 ml, 35 wt %). Реакционната смес се бърка на стайна температура в продължение на 18 h. Разтворителят се отстранява при понижено налягане и полученият остатък се пречиства, като се използва HPLC колона с обръната фаза (Altech Altima C-18, 10 x 299 mm, A = вода, B = ацетонитрил, 10 до 60 % B за 50 min, поток 2 ml/min), за да се получи съединението от заглавието (0.015 g, 41 %) като бяла твърда фаза.

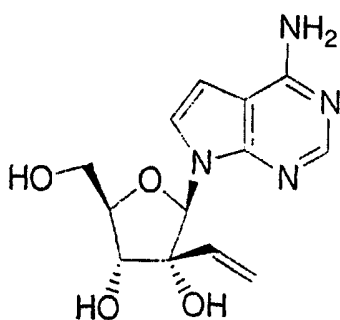
^1H NMR (CD_3OD): делта 0.85 (s, 3H, Me), 3.61 (m, 1H), 3.82 (m, 1H) 3.99-4.86 (m, 2H), 6.26 (s, 1H), 8.10 (s, 2H) 8.22 (s, 1H);

^{13}C NMR (CD_3OD): 20.13, 61.37, 73.79, 80.42, 84.01, 93.00, 102.66, 112.07, 130.07, 151.40, 152.74, 159.12, 169.30.

HRMS (FAB) изчислено за $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_6^+$ 325.1148, намерено 325.1143.

Пример 23

4-Амино-7-(2-С-винил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Етап А. 3,5-Бис-О-(2,4-дихлорофенил-метил)-2-С-винил-1-О-метил-алфа-D-рибофураноза

Цериев хлорид хептахидрат (50 g, 134.2 mmol), се раздробява ситно в предварително нагрятото хаванче и се прехвърля в облодънна колба, снабдена с механична бъркалка. Колбата се нагрява под висок вакуум в продължение на една нощ, при 160°C. Вакуумът се освобождава под аргон и колбата се охлажда до стайна температура.

През тръбичка в колбата се вкарва безводен THF (300 ml). Получената суспензия се бърка на стайна температура в продължение на 4 h и след това се охлажда до -78°C. Добавя се винилмагнезиев бромид (1M в THF, 120 ml, 120 mmol) и се бърка непрекъснато при -78°C в продължение на 2 h. Към тази суспензия се добавя на капки разтвор от 3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-1-О-метил-алфа-D-еритро-пентофураноза-2-улоза (14 g, 30 mmol) [от Пример 2, Етап В] в безводен THF (100 ml), при постоянно разбъркване. Реакционната смес се бърка при -78°C в продължение на 4 h. Реакцията се гаси с разтвор от наситен амониев хлорид и се оставя да се темперира до стайна температура. Сместа се филтрува през celite филтърнен слой и остатъкът се измива с Et₂O (2 x 500 ml). Органичната фаза се отделя и водната фаза се екстрахира с Et₂O (2 x 200 ml). Комбинираните органични фази се изсушават над безводен Na₂SO₄ и се концентрират до вискозно жълто масло. Маслото се пречиства като се използва бърза хроматография (SiO₂, 10 % EtOAc в хексани). Съединението от заглавието (6.7 g, 13.2 mmol) се получава като бледожълто масло.

Етап В. 4-Хлоро-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С-винил-бета-D-рибофуранозил]-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към разтвор от съединението от Етап А

(6.4 g, 12.6 mmol) в безводен дихлорометан (150 ml), при -20°C се добавя на капки HBr (30 % разтвор в AcOH, 20 ml, 75.6 mmol). Полученият разтвор се бърка между -10°C и 0°C в продължение на 4 h, изпарява се под вакуум и се съизпарява с безводен толуен (3 x 40 ml). Масленият остатък се разтваря в безводен ацетонитрил (100 ml) и се добавя към разтвор от натриева сол от 4-хлоро-1Н-пироло [2,3-d] пиримидин (5.8 g, 37.8 mmol) в ацетонитрил (получен *in situ* както е описано в Пример 2) при -20°C. Получената смес се оставя да се темперира до стайна температура и се бърка на стайна температура в продължение на 24 h. След това сместа се изпарява до сухост, разтваря се във вода и се екстрахира с EtOAc (2 x 300 ml). Комбинираните екстракти се изсушават над Na₂SO₄, филтруват се и се изпаряват. Грубата смес се пречиства като се използва бърза хроматография (SiO₂, 10 % EtOAc в хексани) и съединението от заглавието (1.75 g) се изолира като бяла пяна.

Етап С. 4-Амино-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С-винил-бета-D-рибофуранозил]-7Н-пироло[2,3-d] пиримидин

Съединението от Етап В (80 mg) се разтваря в минимално количество от 1,4-диоксан и се поставя в автоклав от неръждаема стомана. Автоклава се охлажда до -78°C и се добавя течен амоняк. Автоклава се запечатва и се нагрява при 90°C в продължение на 24 h. Амонякът се остава да се изпари и остатъкът се концентрира до бяла твърда фаза, която се използва в следващия етап, без да се пречиства по-нататък.

Етап D. 4-Амино-7-(2-С-винил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към разтвор от съединението от Етап С (60 mg) в дихлорометан при -78°C, се добавя на капки бор трихлорид (1 M в дихлорометан). Сместа се бърка се при -78°C в продължение на 2.5 h, след това при -30°C до -20°C в продължение на 3 h. Реакцията се гаси чрез добавяне на метанол/дихлорометан (1:1) и получената смес се бърка при -15°C в продължение на 0.5 h, след това се неутрализира с воден амоняк при 0°C и се бърка при стайна температура в продължение на 15 min. Твърдата фаза се филтрува и се измива с метанол/дихлорометан (1:1). Комбинираният филтрат се изпарява и остатъкът се пречиства като се използва бърза хроматография (SiO₂, 10 % метанол в EtOAc, съдържащ

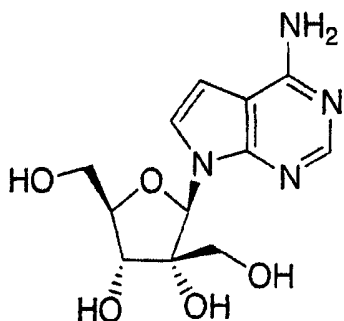
0.1 % триетиламин). Фракциите, съдържащи продукта се изпаряват, за да се получи съединението от заглавието като бяла твърда фаза (10 mg).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6): делта 3.6 (m, 1H, H-5'), 3.8 (m, 1H, H-5''), 3.9 (m d, 1H, H-4'), 4.3 (t, 1H, H-3'), 4.8-5.3 (m, 6H, $\text{CH}=\text{CH}_2$, 2'-OH, 3'-OH, 5'-OH), 6.12 (s, 1H, H-1'), 6.59 (d, 1H, H-5), 7.1 (br s, 1H, NH₂), 7.43 (d, 1H, H-6), 8.01 (s, 1H, H-2).

ES-MS: Намерено: 291.1 ($\text{M}+\text{H}^+$); изчислено за $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4 - \text{H}$: 291.2.

Пример 24

4-Амино-7-(2-С-хидроксиметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Етап А. 4-Хлоро-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С-хидроксиметил-бета-D-рибофуранозил]-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към разтвор от съединението от Пример 23, Етап В (300 mg, 0.48 mmol) в 1,4-диоксан (5 ml), се добавя N-метилморфолин-N-оксид (300 mg, 2.56 mmol) и осмиев четириооксид (4 % разтвор във вода, 0.3 ml). Сместа се бърка на тъмно в продължение на 14 h. Преципитатът се отстранява чрез филтруване през celite филтър, разрежда се с вода (3 x) и се екстрахира с EtOAc. EtOAc фазата се изсушава над Na_2SO_4 и се концентрира под вакуум. Масленият остатък се разтваря в дихлорометан (5 ml) и се разбърква над NaIO_4 върху силикагел (3 g, 10 % NaIO_4) в продължение на 12 h. Силикагелът се отстранява чрез филтруване и остатъкът се изпарява и се разтваря в абсолютен етанол (5 ml). Разтворът се охлажда в ледена баня и на малки порции се добавя натриев борохидрид (300 mg, 8 mmol). Получената смес се разбърква на стайна температура в продължение на 4 h и след това се разрежда с EtOAc. Органичната фаза се измива с вода (2 x 20 ml), солев разтвор (20 ml) и се изсушава над Na_2SO_4 . Разтворителят се изпарява и остатъкът се пречиства като се използва бърза хроматография (SiO_2 , 2:1 хексани/EtOAc), за да се получи съединени-

ето от заглавието (160 mg, 0.25 mmol) като бели люспи.

Етап В. 4-Амино-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С-хидроксиметил-бета-D-рибофуранозил]-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Съединението от Етап А (150 mg, 0.23 mmol), се разтваря в минимално количество от 1,4-диоксан (10 ml) и се поставя в автоклав от неръждаема стомана. Автоклавът се охлажда до -78°C и се добавя течен амоняк. Автоклавът се запечатва и се нагрява при 90°C в продължение на 24 h. Остава се амонякът да се изпари и остатъкът се концентрира до бяла твърда фаза, която се използва в следващия етап без да се пречиства по-нататък.

Етап С. 4-Амино-7-(2-С-хидроксиметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

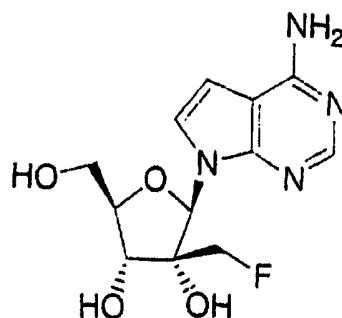
Съединението от Етап В (120 mg, 0.2 mmol) се разтваря в 1:1 метанол/дихлорометан, добавя се 10 % Pd-C и суспензията се бърка под H_2 атмосфера, в продължение на 12 h. Катализаторът се отстранява чрез филтруване през celite филтър и се измива с обилни количества от метанол. Комбинираният филтрат се изпарява под вакуум и остатъкът се пречиства като се използва бърза хроматография (SiO_2 , 10 % метанол в EtOAc, съдържащ 0.1 % триетиламин), за да се получи съединението от заглавието (50 mg) като бял прах.

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): делта 3.12 (d, 1H, CH_2'), 3.33 (d, 1H, CH_2''), 3.82 (m, 1H, H-5'), 3.99-4.1 (m, 2H, H-4', H-5''), 4.3 (d, 1H, H-3'), 6.2 (s, 1H, H-1'), 6.58 (d, 1H, H-5), 7.45 (d, 1H, H-6), 8.05 (s, 1H, H-2).

LC-MS: Намерено: 297.2 ($\text{M}+\text{H}^+$); изчислено за $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5 + \text{H}^+$: 297.3.

Пример 25

4-Амино-7-(2-С-флуорометил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Етап А. 4-Хлоро-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С-флуорометил-бета-D-рибофуранозил]-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към разтвор от съединението от Пример 24, Етап А (63 mg, 0.1 mmol) в безводен дихлорометан (5 ml) под аргон, се добавя 4-диметиламинопиридин (DMAP) (2 mg, 0.015 mmol) и триетиламин (62 μ mol, 0.45 mmol). Разтворът се охлажда в ледена баня и се добавя р-толуенсулфонил хлорид (30 mg, 0.15 mmol). Реакционната смес се бърка на стайна температура в продължение на една нощ, измива се с NaHCO_3 (2 x 10 ml), вода (10 ml), солев разтвор (10 ml), изсушава се над Na_2SO_4 и се концентрира до розова твърда фаза под вакуум. Твърдата фаза се разтваря в безводен THF (5 ml) и се охлажда в леденостудена баня. Добавя се тетрабутиламониев флуорид (1M разтвор в THF, 1 ml, 1 mmol) и сместа се бърка на стайна температура, в продължение на 4 h. Разтворителят се отстранява под вакуум, остатъкът се разтваря в дихлорометан и се измива с NaHCO_3 (2 x 10 ml), вода (10 ml) и солев разтвор (10 ml). Фазата от дихлорометан се изсушава над безводен Na_2SO_4 , концентрира се под вакуум и се пречиства като се използва бърза хроматография (SiO_2 , 2:1 хексани/ EtOAc), за да се получи съединението от заглавието (20 mg) като бяла твърда фаза.

Етап В. 4-Амино-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С-флуорометил-бета-D-

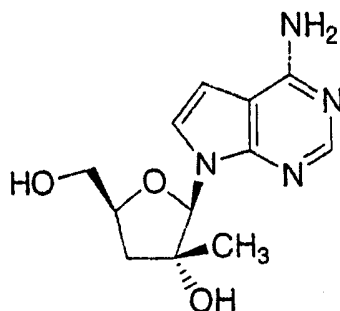
рибофуранозил]-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Съединението от Етап А (18 mg, 0.03 mmol) се разтваря в минимално количество от 1,4-диоксан и се поставя в автоклав от неръждаема стомана. Автоклавет се охлажда до -78°C и се добавя течен амоняк. Автоклавет се запечатва и се нагрява при 90°C в продължение на 24 h. Остава се амонякът да се изпари и остатъкът се концентрира до бяла твърда фаза, която по-нататък се използва в следващия етап без да се пречиства.

Етап С. 4-Амино-7-(2-С-флуорометил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Съединението от Етап В (16 mg) се разтваря в 1:1 метанол/дихлорометан, добавя се 10 % Pd-C и суспензията се бърка под H_2 атмосфера, в продължение на 12 h. Катализаторът се отстранява чрез филтруване през celite филтър и се измива с обилни количества от метанол. Комбинираният филтрат се изпарява под вакуум и остатъкът се пречиства, като се използва бърза хроматография (SiO_2 , 10 % метанол в EtOAc , съдържащ 0.1 % триетиламин), за да се получи съединението от заглавието (8 mg) като бял прах.

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): делта 3.6-3.7 (m, 1H, H-5'), 3.8-4.3 (m, 5H, H-5'', H-4', H-3', CH_2), 5.12 (t, 1H, 5'-OH), 5.35 (d, 1H, 3'-OH), 5.48 (s, 1H, 2'-OH), 6.21 (s, 1H, H-1'), 6.52 (d, 1H, H-5), 6.98 (br s, 2H, NH_2), 7.44 (d, 1H, H-6), 8.02 (s, 1H, H-2).

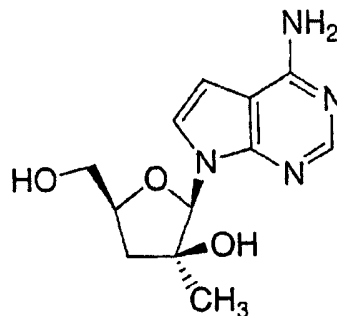


^{19}F NMR ($\text{DMSO}-d_6$): делта -230. 2 (t).

ES-MS: Намерено: 299.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), изчислено за $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{FN}_4\text{O}_4 + \text{H}^+$: 299.27.

Примери 26 и 27

4-Амино-7-(3-дезоксид-2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин и 4-амино-7-(3-дезоксид-2-С-метил-бета-D-арабинофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Етап А. 7-[2,5-бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)-бета-D-рибофуранозил]-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин и 7-[3,5-бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)-бета-D-рибофуранозил]-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

При разбъркване към разтвор от туберцидин (5.0 g, 18.7 mmol) в смес от пиридин (7.5 ml) и DMF (18.5 ml), се добавя сребърен нитрат (6.36

g, 38.8 mmol).

Тази смес се бърка на стайна температура в продължение на 2 h. Тя се охлажда в леденостудена баня и се добавя THF (37.4 ml) и трет-бутилдиметилсилил хлорид (5.6 g, 37 mmol) и сместа се бърка на стайна температура в продължение на 2 h. След това сместа се филтрува през филтър от celite и се измива с THF. Филтратът и промивните води се разреждат с етер, съдържащ малко количество от хлороформ. Органичната фаза се измива последователно с натриев бикарбонат и вода (3 x 50 ml), изсушава се над безводен натриев сулфат и се концентрира. Пиридинът се отстранява чрез съизпаряване с толуен и остатъкът се пречиства, като се използва бърза хроматография върху силикагел, като се използва 5-7 % MeOH в CH_2Cl_2 като елуент; добив 3.0 g.

Етап В. 7-[2,5-бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)-бета-D-рибофуранозил]-4-[ди-(4-метоксифенил)фенилметил] аминок-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин и 7-[3,5-бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)-бета-D-рибофуранозил]-4-[ди-(4-метоксифенил)фенилметил]амино-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към разтвор от смес от съединенията от Етап А (3.0 g, 6.0 mmol) в безводен пиридин (30 ml), се добавя 4,4'-диметокситритил хлорид (2.8 g, 8.2 mmol) и реакционната смес се бърка на стайна температура в продължение на една нощ. След това сместа се стрива на прах с воден пиридин и се екстрахира с етер. Органичната фаза се измива с вода, изсушава се върху безводен натриев сулфат и се концентрира до жълта пяна (5.6 g). Остатъкът се пречиства, като се използва бърза хроматография върху силикагел, чрез използване на 20-25 % EtOAc в хексани като елуент. Подходящите фракции се събират и се концентрират, за да се получи 2',5'-бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)- и 3',5'-бис-О-(трет-бутилдиметилсилил) защитени нуклеозиди, като безцветни пани (2.2 g и 1.0 g, респективно).

Етап С. 7-[2,5-бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)-3-О-тозил-бета-D-рибофуранозил]-4-[ди-(4-метоксифенил) фенилметил] аминок-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към леденостуден разтвор от 2',5'-бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)-защитен нуклеозид от Етап В (2.0 g, 2.5 mmol) в пиридин (22 ml), се добавя р-толуенсулфонил хлорид (1.9 g, 9.8 mmol). Реакционната смес се бърка на стайна тем-

пература в продължение на четири дена. След това тя се стрива с воден пиридин (50 %, 10 ml) и се екстрахира с етер (3 x 50 ml), съдържащ малко количество от CH_2Cl_2 (10 ml).

Органичната фаза се измива с натриев бикарбонат и вода (3 x 30 ml). Органичната фаза се изсушава над безводен Na_2SO_4 и се концентрира. Пиридинът се отстранява чрез съизпаряване с толуен (3 x 25 ml). Масленият остатък се филтрува през филтърнен слой от силикагел, като се използва хексан:етил ацетат (70:30) като елуент; добив 1.4 g.

Етап D. 4-[ди-(4-метоксифенил)фенилметил]амино-7-[3-О-тозил-бета-D-рибофуранозил]-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Разтвор от съединението от Етап С (1.0 g, 1.1 mmol) и THF (10 ml) се разбъркват с тетрабутиламониев флуорид (1M разтвор в THF, 2.5 ml), в продължение на 0.5 h. Сместа се охлажда и се разрежда с етер (50 ml). Разтворът се измива с вода (3 x 50 ml), изсушава се над безводен Na_2SO_4 , и се концентрира до масло. Остатъкът се пречиства чрез преминаване през филтърнен слой от силикагел, като се използва хексан:етил ацетат (1:1) като елуент; добив 780 mg.

Етап Е. 4-Амино-7-(3-дезоксид-2-С-метилбета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d]-пиримидин и 4-амино-7-(3-дезоксид-2-С-метилбета-D-арабинофуранозил)-7Н-пироло-[2,3-d] пиримидин

Разтвор от CH_3MgI (3.0 M разтвор в етер, 3.0 ml) в безводен толуен (3.75 ml), се охлажда в леденостудена баня. Към него се добавя разтвор от съединението от Етап D (500 mg, 0.8 mmol) в безводен толуен (3.7 ml). Получената смес се бърка на стайна температура в продължение на 3.5 h. Тя се охлажда и се третира с воден NH_4Cl разтвор и се екстрахира с етер (50 ml, съдържащ 10 ml от CH_2Cl_2). Органичната фаза се отделя и се измива със солев разтвор (2 x 30 ml) и вода (2 x 25 ml), изсушава се над безводен Na_2SO_4 и се концентрира до масло, което се пречиства, като се използва бърза хроматография върху силикагел, чрез използване на 4 % MeOH в CH_2Cl_2 , за да се получи 2-С-алфа-метил съединението (149 mg) и 2-С-бета-метил съединението (34 mg). Тези производни се третират поотделно с 80 % оцетна киселина и реакционната смес се бърка на стайна температура в продължение на 2.5 h. Оцетната киселина се

отстранява като се повтаря съизпаряването с етанол и толуен. Остатъкът се разделя на части между хлороформ и вода. Водната фаза се измива с хлороформ и се концентрира. Изпареният остатък се пречиства върху силикагел като се използва 5-10 % MeOH в CH₂Cl₂ като елуент, за да се получат желаните съединения като бели твърди фази.

4-Амино-7-(3-дезоксид-2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин (9.0 mg):

¹H NMR (DMSO-d₆): делта 0.74 (s, 3H, CH₃), 1.77 (dd, 1H, H-3'), 2.08 (t, 1H, H-3''), 3.59 (m, 1H, H-5'), 3.73 (m, 1H, H-5''), 4.15 (m, 1H, H-4'), 5.02 (t, 1H, OH-5'), 5.33 (s, 1H, OH-2'), 6.00 (s, 1H, H-1'), 6.54 (d, 1H, H-7), 6.95 (br s, 2H, NH₂), 7.47 (d, 1H, H-8), 8.00 (s, 1H, H-2); ES-MS: 263.1 [M-H].

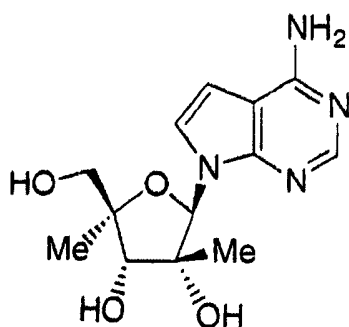
4-Амино-7-(3-дезоксид-2-С-метил-бета-D-арабинофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин (15 mg):

¹H NMR (DMSO-d₆): делта 1.23 (s, 3H, CH₃), 2.08 (ddd, 2H, H-3' и 3''), 3.57 (m, 2H, H-5' и 5''), 4.06 (m, 1H, H-4), 5.10 (s, 1H, OH-2'), 5.24 (t, 1H, OH-5'), 6.01 (s, 1H, H-1'), 6.49 (d, 1H, H-7), 6.89 (br s, 2H, NH₂), 7.35 (d, 1H, H-8), 8.01 (s, 1H, H-2).

ES-MS: 265.2 [M+H].

Пример 28

4-Амино-7-(2,4-С-диметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Етап А. 5-Дезокси-1,2-О-изопропилиден-D-ксилофураноза

1,2-О-Изопропилиден-D-ксилофураноза (38.4 g, 0.2 mol), 4-диметиламинопиридин (5 g), триетиламин (55.7 ml, 0.4 mol) се разтварят в дихлорометан (300 ml). p-Толуенсулфонил хлорид (38.13 g, 0.2 mol) се добавя и реакционната смес се бърка на стайна температура в продължение на 2 h. След това реакционната смес се

излива в наситен воден натриев бикарбонат (500 ml) и двете фазите се разделят. Органичната фаза се измива с воден разтвор на лимонена киселина (20 %, 200 ml), изсушава се (Na₂SO₄) и се изпарява, за да се получи твърда фаза (70.0 g). Твърдата фаза се разтваря в сух THF (300 ml) и се добавя на порции LiAlH₄ (16.0 g, 0.42 mol) в продължение на 30 min. Сместа се бърка на стайна температура в продължение на 15 min. На капки се добавя етил ацетат (100 ml) в продължение на 30 min и сместа се филтрува през пласт от силикагел. Филтратът се концентрира и полученото масло се пуска на хроматография върху силикагел (EtOAc/хексан 1/4), за да се получи продукта като твърда фаза (32.5 g).

Етап В. 3,5-Бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-1-О-метил-4-метил-алфа-D-рибофураноза

Хромов оксид (50 g, 0.5 mol), оцетен анхидрид (50 ml, 0.53 mol) и пиридин (100 ml, 1.24 mol) се добавят към дихлорометан (1 l) в леденостудена баня и сместа се разбърква в продължение на 15 min. Добавя се 5-дезоксид-1,2-О-изопропилиден-D-ксилофураноза (32 g, 0.18 mol) в дихлорометан (200 ml), и сместа се бърка при същата температура в продължение на 30 min. Реакционният разтвор се разрежда с етил ацетат (1 l) и се филтрува през слой от силикагел. Филтратът се концентрира, за да се получи жълто масло. Маслото се разтваря в 1,4-диоксан (1 l) и формалдехид (37 %, 200 ml). Разтворът се охлажда до 0°C и се добавя КОН в твърдо състояние (50 g). Сместа се бърка на стайна температура в продължение на една нощ и след това се екстрахира с етил ацетат (6 x 200 ml). След концентриране, остатъкът се пречиства чрез хроматография върху силикагел (EtOAc), за да се получи продукта като масло (1.5 g). Маслото се разтваря в 1-метил-2-пиролидинон (20 ml) и се добавя 2,4-дихлорофенилметил хлорид (4 g, 20.5 mmol) и NaH (60 %, 0.8 g). Сместа се бърка в продължение на една нощ и се разрежда с толуен (100 ml). След това сместа се измива с наситен воден натриев бикарбонат (3 x 50 ml), изсушава се (Na₂SO₄) и се изпарява.

Остатъкът се разтваря в метанол (50 ml) и се добавя HCl в диоксан (4 M, 2 ml). Разтворът се бърка в продължение на една нощ и се изпарява. Остатъкът се пуска на хроматография върху силикагел (EtOAc/хексан: 1/4), за да се

получи желаният продукт като масло (2.01 g).

Етап С. 3,5-Бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2,4-ди-С-метил-1-О-метил-алфа-D-рибофураноза

Продуктът (2.0 g, 4.0 mmol) от Етап В и Dess-Martin перийодинан (2.0 g) в дихлорометан (30 ml), се разбъркват в продължение на една нощ, на стайна температура и след това се концентрират при понижено налягане. Остатъкът се стрива на прах с етер (50 ml) и се филтрува. Филтратът се измива с разтвор от $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.5 g) в наситен разтвор от воден натриев бикарбонат (50 ml), изсушава се (MgSO_4), филтрува се и се изпарява. Остатъкът се разтваря в безводен Et_2O (20 ml) и се добавя на капки към разтвор от MeMgBr в Et_2O (3 M, 10 ml), при -78°C . Реакционната смес се затопля до -30°C и се бърка при -30°C до -15°C в продължение на 5 h, след това се излива в наситен воден амониев хлорид (50 ml). Двете фази се разделят и органичната фаза се изсушава (MgSO_4), филтрува се и се концентрира. Остатъкът се пуска на хроматография върху силикагел (EtOAc /хексан: 1/9), за да се получи съединението от заглавието като сироп (1.40 g).

Етап D. 4-Хлоро-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2,4-ди-С-метил-бета-D-рибофуранозил]-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към съединението от Етап С (0.70 g, 1.3 mmol), се добавя HBr (5.7 M в оцетна киселина, 2 ml). Полученият разтвор се бърка на стайна температура в продължение на 1 h, изпарява се под вакуум и се съизпарява с безводен толуен (3 x 10 ml).

Смесват се 4-хлоро-1Н-пироло [2,3-d] пиримидин (0.5 g, 3.3 mmol) и прахообразна KOH (85 %, 150 mg, 2.3 mmol) в 1-метил-2-пиридинон (5 ml) в продължение на 30 min и сместа се съизпарява с толуен (10 ml). Полученият разтвор се излива в по-горния бромо захарен остатък и сместа се бърка в продължение на една нощ.

Сместа се разрежда с толуен (50 ml), измива се с вода (3 x 50 ml) и се концентрира при понижено налягане. Остатъкът се пуска на хроматография върху силикагел, като се елуира с EtOAc /хексан (15/85), за да се получи твърда фаза (270 mg).

Етап E. 4-Амино-7-(2,4-С-диметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Съединението от Етап D (270 mg) се разтваря в диоксан (2 ml) и се добавя течен амоняк (20 g) в автоклав от неръждаема стомана. Сместа се нагрива при 100°C в продължение на 15, след това се охлажда и се изпарява. Остатъкът се пречиства чрез хроматография върху силикагел (EtOAc), за да се получи твърда фаза (200 mg). Твърдата фаза (150 mg) и Pd/C (10 %, 150 mg) в метанол (20 ml), се разклащат под H_2 (30 psi), в продължение на 3 h, филтруват се и се изпаряват. Остатъкът се пуска на хроматография върху силикагел ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$: 1/9), за да се получи желаният продукт като твърда фаза (35 mg).

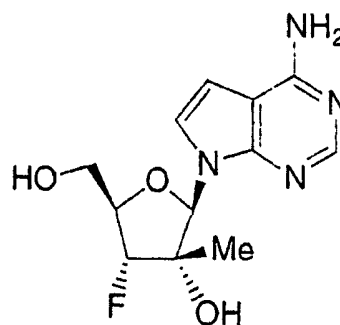
^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): делта 0.65 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 3.43 (m, 2H), 4.06 (d, 1H, $J = 6.3$ Hz), 4.87 (s, 1H), 5.26 (br, 1H), 5.08 (d, 1H, $J = 6.3$ Hz), 5.25 (t, 1H, $J = 3.0$ Hz), 6.17 (s, 1H), 6.54 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz), 6.97 (s, br, 2H), 7.54 (d, 1H, $J = 3.4$ Hz), 8.02 (s, 1H).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): делта 18.19, 21.32, 65.38, 73.00, 79.33, 84.80, 90.66, 99.09, 102.41, 121.90, 149.58, 151.48, 157.38.

LC-MS: Намерено: 295.1 ($\text{M}+\text{H}^+$); изчислено за $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4 + \text{H}^+$: 295.1.

Пример 29

4-Амино-7-(3-дезоксидезокси-3-флуоро-2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Етап A. 3-Дезокси-3-флуоро-1-О-метил-5-О-толуоил-алфа-D-рибофураноза

1,2-О-Изопропилиден-D-ксилофураноза (9.0 g, 50 mol) и p-толуоил хлорид (7.0 ml, 50 mmol) в пиридин (50 ml), се разбъркват в продължение на 30 min. Добавя се вода (10 ml) и сместа се концентрира при понижено налягане. Остатъкът се разтваря в толуен (500 ml) и разтворът се измива с вода (200 ml) и наситен воден натриев бикарбонат (200 ml). Двете фазите се разделят и органичната фаза се изпарява.

Остатъкът се разтваря в метанол (100 ml) и се добавя HCl в диоксан (4 M, 10 ml). Сместа се бърка на стайна температура в продължение на една нощ и след това се изпарява при понижено налягане. Полученото масло се пречиства чрез хроматография върху силикагел (EtOAc/хексан: 1/1), за да се получи масло (10.1 g). Маслото се разтваря в дихлорометан (100 ml) и се добавя диетиламиносерен трифлуорид (DAST) (5.7 ml). Сместа се бърка в продължение на една нощ и след това се излива в разтвор от наситен воден натриев бикарбонат (100 ml). Сместа се екстрахира с толуен (2 x 50 ml) и комбинираните органични фази се концентрират. Остатъкът се пуска на хроматография върху силикагел (EtOAc/хексан: 15/85), за да се получи съединението от заглавието като масло (1.50 g).

Етап В. 3-Дезокси-3-флуоро-2-С-метил-1-О-метил-5-О-толуоил-алфа-D-рибофураноза

Продуктът от Етап А (1.0 g, 3.5 mmol) и Dess-Martin перийодинан (2.5 g) в дихлорометан (20 ml), се разбъркват в продължение на една нощ, на стайна температура и след това се концентрират при понижено налягане. Остатъкът се стрива на прах с диетилов етер (50 ml) и се филтрува. Филтратът се измива с разтвор от $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (12.5 g) в наситен разтвор от воден натриев бикарбонат (100 ml), изсушава се (MgSO_4), филтрува се и се изпарява. Остатъкът се разтваря в безводен THF (50 ml). Добавя се TiCl_4 (3 ml) и метил магнезиев бромид в етилов етер (3 M, 10 ml) при -78°C и сместа се бърка при -50°C до -30°C в продължение на 2 h. Сместа се излива в наситен воден разтвор от натриев бикарбонат (100 ml) и се филтрува през Celite филтър. Филтратът се екстрахира с толуен (100 ml) и се изпарява. Остатъкът се пуска на хроматография върху силикагел (EtOAc/хексан: 15/85), за да се получи съединението от заглавието като масло (150 mg).

Етап С. 4-Амино-7-(3-дезокси-3-флуоро-2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Продуктът от Етап В (150 mg, 0.5 mmol) се разтваря в HBr (30 %) в оцетна киселина (2 ml). След 1 h, сместа се изпарява при понижено налягане и се съизпарява с толуен (10 ml). Смесват се 4-хлоро-1Н-пироло [2,3-d] пиримидин (0.5 g, 3.3 mmol) и прахообразна KOH (85 %, 150 mg, 2.3 mmol) в DMF (3 ml), в продъл-

жение на 30 min и сместа се съизпарява с толуен (2 ml). Полученият разтвор се излива в погорния бромо захар и сместа се бърка в продължение на една нощ. Сместа се разрежда с толуен (50 ml), измива се с вода (3 x 50 ml) и се концентрира при понижено налягане. Остатъкът се пуска на хроматография върху силикагел (EtOAc/хексан: 15/85), за да се получи масло (60 mg). Маслото се разтваря в диоксан (2 ml) и се добавя течен амониак (20 g) в автоклав от неръждаема стомана. Сместа се нагрява при 85°C в продължение на 18 h, след това се охлажда и се изпарява. Остатъкът се пуска на хроматография върху силикагел (метанол/дихлорометан: 1/9), за да се получи съединението от заглавието като твърда фаза (29 mg).

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): делта 0.81 (s, 3H), 3.75 (m, 2H), 4.16 (m, 1H), 5.09 (dd, 1H, $J = 53.2, 7.8$ Hz), 5.26 (br, 1H), 5.77 (s, 1H), 6.15 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz), 6.59 (d, 1H, $J = 3.4$ Hz), 7.02 (s br, 2H), 7.39 (d, 1H, $J = 3.4$ Hz), 8.06 (s, 1H).

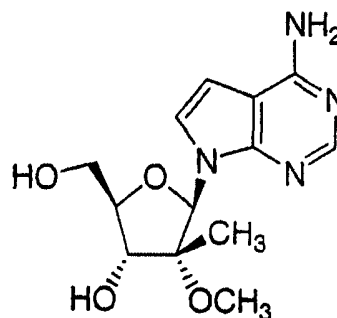
^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 19.40, 59.56, 77.24, 79.29, 90.15, 91.92, 99.88, 102.39, 121.17, 149.80, 151.77, 157.47.

^{19}F NMR ($\text{DMSO}-d_6$): делта 14.66 (m).

ES-MS: Намерено: 283.1 ($\text{M}+\text{H}^+$); изчислено за $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{FN}_4\text{O}_3 + \text{H}^+$: 283.1.

Пример 30

4-Амино-7-(2-С, 2-О-диметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Етап А. 4-хлоро-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С, 2-О-диметил-бета-D-рибофуранозил]-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към предварително изстуден (0°C) разтвор от съединението от Пример 2, Етап D (618 mg, 1.0 mmol) в THF (8 ml) се добавя метил йодид (709 mg, 5.0 mmol) и NaH (60 % в минерално масло) (44 mg, 1.1 mmol). Получената смес се бърка в продължение на една нощ на стайна температура и след това при разбъркване

се излива в смес от наситен воден амониев хлорид (50 ml) и дихлорометан (50 ml). Органичната фаза се измива с вода (50 ml), изсушава се (MgSO_4) и се изпарява под вакуум. Полученият груб продукт се пречиства върху силикагел, като се използва етил ацетат/хексан като елуент. Фракциите, съдържащи продукта се събират и се изпаряват под вакуум, за да се получи желаният продукт (735 mg) като безцветна пяна.

Етап В. 4-амино-7-[3,5-бис-О-(2,4-дихлорофенилметил)-2-С, 2-О-диметил-бета-D-рибофуранозил]-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към съединението от Етап А (735 mg, 1.16 mmol), се добавя амоняк в метанол (наситен при 0°C) (20 ml). Сместа се нагрява в автоклав от неръждаема стомана при 80°C, в продължение на една нощ, след това се охлажда и съдържанието се изпарява под вакуум. Грубата смес се пречиства върху силикагел, като се използва етил ацетат/хексан като елуент. Фракциите, съдържащи продукта се събират и се изпаряват под вакуум, за да се получи желаният продукт (504 mg) като безцветна пяна.

Етап С. 4-амино-7-(2-С, 2-О-диметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Смес от продукта от Етап С (64 mg, 0.1 mmol), MeOH (5 ml), Et_3N (0.2 ml) и 10 % Pd/C (61 mg) се хидрират в Рагг апарат за хидриране при 50 psi на стайна температура, в продължение на една нощ. Сместа се филтрува през celite, изпарява се под вакуум и се филтрува през слой от силикагел, като се използва 2 % метанол в дихлорометан като елуент. Събира се желаният продукт и се изпарява под вакуум. Съединението се разтваря отново в метанол (10 ml) и се добавя 10 % Pd/C (61 mg). Сместа се хидрира в Рагг апарат за хидриране при 55 psi на стайна температура в продължение на две седмици. Сместа се филтрува през celite, изпарява се под вакуум и се пречиства върху силикагел, като се използва 10 % метанол в дихлорометан като елуент. Фракциите, съдържащи продукта се събират и се изпаряват под вакуум, за да се получи желаният продукт (110 mg) като а безцветна пяна.

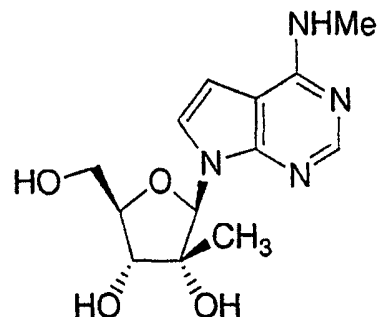
^1H NMR (DMSO-d_6): делта 0.68 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 3.52-3.99 (припокриване m, 4H), 4.92 (d, 1H), 5.07 (t, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.55 (d, 1H), 7.00 (s br, 2H), 7.46 (d, 1H), 8.05 (s, 1H).

LC-MS: Намерено: 293.1 (M-H^+); изчислено

за $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4\text{-H}^+$: 293.12.

Пример 31

4-Метиламино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



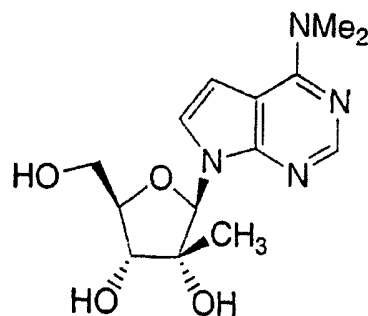
Съединението от Етап Е, от Пример 2 (200 mg, 0.67 mmol) се добавя към метиламин (5 ml, кондензиран в малък автоклав от неръждаема стомана) и се загрева при 85°C в продължение на 48 h, след това се охлажда и се изпарява под вакуум. Грубата смес се пречиства върху силикагел с етанол като елуент, за да се получи съединението от заглавието, което се отделя като аморфна твърда фаза, след третиране с MeCN. Аморфната твърда фаза се разтваря във вода и се лиофилизира, за да се получи безцветен прах (144 mg).

^1H NMR (DMSO-d_6): делта 0.63 (s, 3H, CH_3), 3.32 (s, 3H, N CH_3), 3.58-3.67 (m, 1H, H-5'), 3.79-3.39 (m, 3H, H-5'', H-4', H-3'), 5.03 (s, 1H, 2'-OH), 5.04-5.11 (1H, 3'-OH, 1H, 5'-OH), 6.14 (s, 1H, H-1'), 6.58 (d, 1H, $J_{5,6} = 3.6$ Hz, H-5), 7.46 (d, 1H, H-6), 7.70 (br s, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, H-2).

LC-MS: Намерено: 295.1 (M-H^+); изчислено за $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4 + \text{H}^+$: 294.3.

Пример 32

4-Диметиламино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Съединението от Етап Е, от Пример 2 (200 mg, 0.67 mmol) се добавя към диметиламин (5 ml, кондензиран в малък автоклав от неръжда-

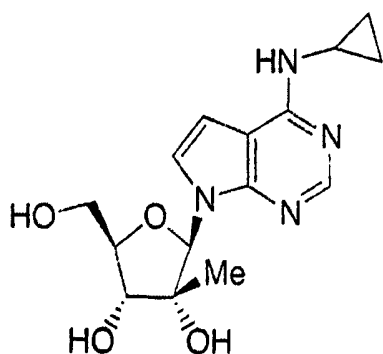
ема стомана) и се нагрява при 85°C в продължение на 48 h, след това се охлажда и се изпарява под вакуум. Грубата смес се пречиства върху силикагел с етанол като елуент, за да се получи съединението от заглавието, което се отделя като аморфна твърда фаза, след третиране с MeCN. Аморфната твърда фаза се разтваря във вода и се лиофилизира, за да се получи безцветен прах (164 mg).

¹H NMR (DMSO-d₆): делта 0.64 (s, 3H, CH₃), 3.29 (s, 3H, N CH₃), 3.32 (s, 3H, N CH₃), 3.60-3.66 (m, 1H, H-5'), 3.77-3.97 (m, 3H, H-5'', H-4', H-3'), 5.04 (s, 1H, 2'-OH), 5.06-5.11 (1H, 3'-OH, 1H, 5'-OH), 6.21 (s, 1H, H-1'), 6.69 (d, 1H, J_{5,6} = 3.6 Hz, H-5), 7.55 (d, 1H, H-6), 8.13 (s, 1H, H-2).

LC-MS: Намерено: 309.3 (M-H⁺); изчислено за C₁₄H₂₀N₄O₄+H⁺: 308.33.

Пример 33

4-Циклопропиламино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Съединението от Етап Е, от Пример 2 (200 mg, 0.67 mmol) се добавя към циклопропиламин (5 ml, кондензиран в малък автоклав от неръждаема стомана) и се нагрява при 85°C в продължение на 48 h, след това се охлажда и се изпарява под вакуум. Грубата смес се пречиства върху силикагел с етанол като елуент, за да се получи съединението от заглавието, което се отделя като аморфна твърда фаза, след третиране с MeCN. Аморфната твърда фаза се разтваря във вода и се лиофилизира, за да се получи безцветен прах (148 mg).

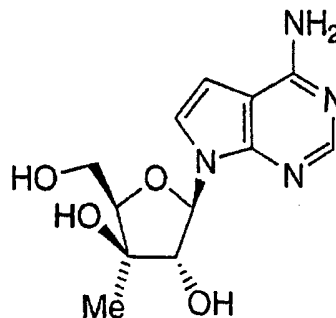
¹H NMR (DMSO-d₆): делта 0.51-0.58 (m, 2H), 0.64 (s, 3H, CH₃), 0.74-0.076 (m, 2H), 3.62-3.67 (m, 1H, H-5'), 3.79-3.82 (m, 3H, H-5'', 3.92-3.96 (m, H-4', H-3'), 5.03 (s, 1H, 2'-OH), 5.05-5.10 (1H, 3'-OH, 1H, 5'-OH), 6.15 (s, 1H, H-1'), 7.48 (d, 1H, J_{5,6} = 3.6 Hz, H-5), 7.59 (d, 1H, H-6),

8.13 (s, 1H, H-2).

LC-MS: Намерено: 321.1 (M-H⁺); изчислено за C₁₅H₂₀N₄O₄+H⁺: 320.3.

Пример 34

4-Амино-7-(3-С-метил-бета-D-ксилофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Етап А. 7-[2,5-Бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)-бета-D-рибофуранозил]-4-[(4-метоксифенил)дифенилметил] амино-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин и 7-[3,5-бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)-бета-D-рибофуранозил]-4-[(4-метоксифенил)дифенилметил]амино-7Н-пироло[2,3-d]пиримидин

Към разтвор на смес от съединенията от Етап А от Примери 26 и 27 (0.32 g, 0.65 mmol) в безводен пиридин (6 ml), се добавя монометокситритил хлорид (0.30 g, 0.98 mmol) и реакционната смес се бърка на стайна температура в продължение на една нощ. След това сместа се концентрира и остатъкът се разделя между CH₂Cl₂ (70 ml) и вода (20 ml). Органичната фаза се измива с вода и солев разтвор, изсушава се (Na₂SO₄) и се концентрира. Остатъкът се пречиства върху силикагел колона, като се използва 5-13 % EtOAc в хексани като елуент. Подходящите фракции се събират и се концентрират, за да се получи 2',5'-бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)- и 3',5'-бис-О-(трет-бутилдиметилсилил) защитени нуклеозиди като безцветни пени (343 mg и 84 mg, съответно).

Етап В. 7-[2,5-Бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)-бета-D-еритропентофураноз-3-улозил]-4-[(4-метоксифенил)дифенилметил]амино-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

При разбъркване, към суспензия от хромов триоксид (91 mg, 0.91 mmol) в CH₂Cl₂ (4 ml) при 0°C, се добавя пиридин (147 microl, 1.82 mmol) и след това оцетен анхидрид (86 microl, 0.91 mmol). Сместа се бърка на стайна температура в продължение на 0.5 h. След това се доба-

вя 2',5'-бис-О-(трет-бутилдиметилсилил) защитен нуклеозид от етап А (343 mg, 0.45 mmol) в CH_2Cl_2 (2.5 ml) и сместа се бърка на стайна температура в продължение на 2 h. След това сместа се излива в леденостуден EtOAc (10 ml) и се филтрува през къса колона със силикагел, като се използва EtOAc като елуент. Филтрагът се изпарява и остатъкът се пречиства върху силикагел колона с хексани и хексани/EtOAc (7/1) като елуент, за да се получи съединението от заглавието (180 mg).

Етап С. 7-[2,5-Бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)-3-С-метил-бета-D-рибофуранозил]-4-[(4-метоксифенил) дифенилметил] аминок-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин и 7-[2,5-Бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)-3-С-метил-бета-D-ксилофуранозил]-4-[(4-метоксифенил)дифенилметил] аминок-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към смес от MeMgBr (3.0 М разтвор в етер; 0.17 ml, 0.5 mmol) в безводни хексани (1.5 ml), на стайна температура, се добавя на капки разтвор от съединението от Етап В (78 mg, 0.1 mmol) в безводни хексани (0.5 ml). След разбъркване в продължение на 2 h, на стайна температура, реакционната смес се излива в леденостудена вода (10 ml) и се разрежда с EtOAc (20 ml), след това се филтрува през филтър Celite, който след това се измива внимателно с EtOAc. Фазите се разделят и органичната фаза се измива със солев разтвор, изсушава се (Na_2SO_4) и се концентрира. Остатъкът се пречиства върху силикагел колона, като се използва 8 до 25 % EtOAc в хексани като елуент, за да се получи 3-С-метил ксило- (60 mg) и 3-С-метил рибо-изомер (20 mg).

Етап D. 4-Амино-7-(3-С-метил-бета-D-ксилофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към леденостуден разтвор от 3-С-метил ксило изомер от Етап С (60 mg, 0.08 mmol) в THF (2 ml), се добавя TBAF (1 М в THF; 0.32 ml, 0.32 mmol). Реакционната смес се бърка на стайна температура в продължение на 5 h, след това се разрежда с CH_2Cl_2 (50 ml), измива се с вода (3 x 15 ml), изсушава се и се изпарява. Остатъкът се разтваря в диоксан (0.3 ml) и се добавя 80 % оцетна киселина (3 ml). Реакционната смес се бърка на стайна температура в продължение на 1 ден и след това се изпарява. Остатъкът се съизпарява с диоксан, разтваря се във вода (50 ml) и се измива с CH_2Cl_2 (2 x 10 ml). Водната фаза се концентрира и след това се изсушава чрез замразяване. Остатъкът се пречиства върху си-

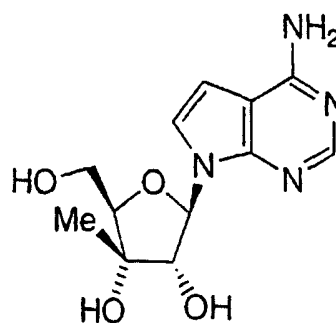
ликагел колона с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20/1 и 10/1) като елуент, за да се получи съединението от заглавието като бяло пухкаво съединение, след изсушаване чрез замразяване (10 mg).

$^1\text{H NMR}$ (CD_3CN): делта 1.28 (s, 3H, CH_3), 3.56 (br s, 1H, OH), 3.78 (m, 3H, H-4', H-5', H-5''), 4.10 (br s, 1H, OH), 4.44 (d, 1H, $J_{2,1'} = 3.9$ Hz, H-2'), 5.58 (d, 1H, H-1'), 5.85 (br s, 2H, NH_2), 6.15 (br s, 1H, OH), 6.48 (d, 1H, $J_{5,6} = 3.7$ Hz, H-5), 7.23 (d, 1H, H-6), 8.11 (s, 1H, H-2).

ES-MS: 281 $[\text{MH}]^+$.

Пример 35

4-Амино-7-(3-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



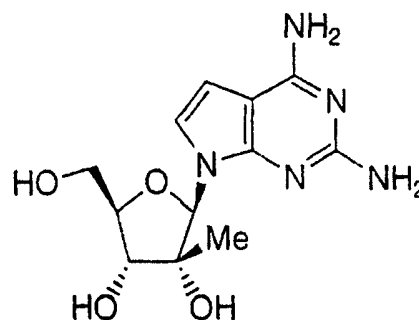
На рибоизомера (20 mg) от Етап С, от Пример 32 се премахва защитата, като се използва методът, описан в Етап D, от Пример 32, за да се получи съединението от заглавието (4 mg).

$^1\text{H NMR}$ (CD_3CN): делта 1.43 (s, 3H, CH_3), 3.28 (br s, 1H, OH), 3.58 (m, 2H, H-5', H5''), 3.99 (m, 1H, H-4'), 4.10 (br s, 1H, OH), 4.62 (d, 1H, $J_{2,1'} = 8.1$ Hz, H-2'), 5.69 (d, 1H, H-1'), 5.88 (br s, 3H, OH, NH_2), 6.45 (br s, 1H, OH), 6.51 (d, 1H, $J_{5,6} = 3.7$ Hz, H-5), 7.19 (d, 1H, H-6), 8.12 (s, 1H, H-2).

ES-MS: 281 $[\text{MH}]^+$.

Пример 36

2,4-Диамино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Смес от продукта от Етап В, от Пример 4 (24 mg) във воден амониак (30 %, 10 ml), се заг-

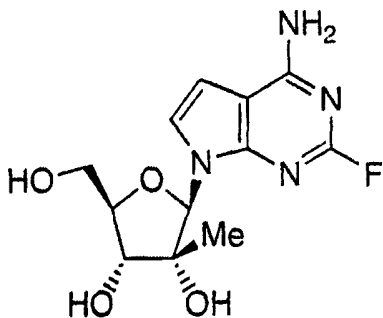
рява в автоклав от неръждаема стомана при 100°C, в продължение на една нощ, след това се охлажда и се изпарява. Остатъкът се пречиства върху силикагел колона с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10/1 и 5/1) като елуент, за да се получи съединението от заглавието (15 mg).

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): делта 0.68 (s, 3H, CH_3), 3.48-3.58 (m, 1H, H-5'), 3.68-3.73 (m, 2H, H-5'', H-4'), 3.84 (m, 1H, H-3'), 4.72 (s, 1H, 2'-OH), 4.97-5.03 (m, 2H, 3'-OH, 5'-OH), 5.45 (br s, 2H, NH_2), 6.00 (s, 1H, H-1'), 6.28 (d, 1H, J = 3.7 Hz, H-5), 6.44 (br s, 2H, NH_2), 6.92 (d, 1H J = 3.7 Hz, H-6).

ES MS: 294.1 ($\text{M}-\text{H}^+$).

Пример 37

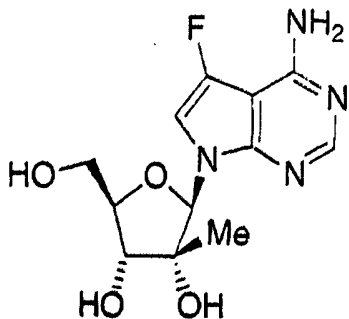
4-Амино-2-флуоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Към разтвор от HF/пиридин (70 %, 2 ml), разреден с пиридин (1 ml), при -30°C, се добавя съединението от Пример 36 (60 mg, 0.2 mmol) в 0.5 ml пиридин, последвано от трет-бутил нитрит (36 μmol , 0.3 mmol). Бъркането продължава в продължение на 5 min при -25°C. След това разтворът се излива в леденостудена вода (5 ml), неутрализира се с 2 N NaOH във вода и се изпарява до сухост. Остатъкът се пречиства върху силикагел колона с $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20/1 и 10/1), като елуент, за да се получи съединението от заглавието.

Пример 38

4-Амино-5-флуоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин



Етап А. 4-Ацетиламино-7-(2,3,5-три-О-ацетил-2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към разтвор от съединението от етап F, от

Пример 2 (280 mg, 1.00 mmol) в пиридин, се добавя оцетен анхидрид (613 mg, 6.0 mmol). Полученият разтвор се бърка в продължение на една нощ, на стайна температура, изпарява се под вакуум и получената груба смес се пречиства върху силикагел, като се използва етил ацетат/хексан като елуент. Фракциите, съдържащи желаният продукт се събират и се изпаряват под вакуум, за да се получи желаният продукт.

Етап В. 4-Ацетиламино-5-бromo-7-(2,3,5-три-О-ацетил-2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към предварително охладен (0°C) разтвор от съединението от Етап А (460 mg, 1.00 mmol) в DMF, се добавя N-бромосукцинимид (178 mg, 1.0 mmol) в DMF. Полученият разтвор се бърка при 0°C в продължение на 30 min, след това на стайна температура допълнително в продължение на още 30 min. Реакцията се гаси чрез добавяне на метанол и се изпарява под вакуум. Получената груба смес се пречиства върху силикагел, като се използва етил ацетат/хексан като елуент. Фракциите, съдържащи желаният продукт се събират и се изпаряват под вакуум, за да се получи желаният продукт.

Етап С. 4-Амино-5-флуоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин

Към предварително изстуден (-78°C) разтвор от съединението от Етап В (529 mg, 1.00 mmol) в THF, се добавя бутил литий (2M в хексани) (0.5 ml, 1.00 mmol). Полученият разтвор се бърка се при -78°C в продължение на 30 min и след това се гаси с N-флуоробензенсулфонимид (315 mg, 1.00 mmol) в THF. Полученият разтвор се оставя много бавно да се темперира до стайна температура и след това се излива при разбъркване в смес от наситен воден амониев хлорид и дихлорометан. Органичната фаза се изпарява под вакуум и се третира с амониева основа при 55°C, в затворен контейнер в продължение на една нощ. Получената груба смес се пречиства върху силикагел, като се използва дихлорометан/метанол като елуент. Фракциите, съдържащи желаният продукт се събират и се изпаряват под вакуум, за да се получи желаният

продукт.

Биологични методи

Методите, използвани за да се оцени потискането на HCV NS5B полимеразата и HCV репликацията, са описани по-долу.

Ефективността на съединенията от настоящото изобретение като инхибитори на HCV NS5B РНК-зависимата РНК полимераза (RdRp), се измерва чрез следният метод.

А. Метод за потискане на HCV NS5B полимераза:

Този метод се използва, за да се измери способността на нуклеозидните производни от настоящото изобретение да потискат ензимната активност на РНК-зависимата РНК полимераза (NS5B), на хепатит С вируса (HCV), върху хетеромерна РНК матрица.

Метод:

Буферни условия при метода: (50 microl - общо/реакция)

20 mM Трис, pH 7.5

50 microM EDTA

5 mM DTT

2 mM MgCl₂

80 mM KCl

0.4 U/microl RNAsin (Promega, стокът е 40 единици/microl)

0.75 microg t500 (500-нд РНК, направена чрез използване на T7 при транскрипцията, със секвенция от NS2/3 областта от генома на хепатит С)

1.6 microg пречистена NS5B от хепатит С (форма, при която в С-края липсват 21 аминокиселини)

1 microM A, C, U, GTP (Нуклеозид трифосфатна смес) [алфа-³²P]-GTP или [алфа-³³P]-GTP

Съединенията се анализират при различни концентрации, до 100 microM крайна концентрация.

Приготвя се подходящ обем от реакционния буфер, включващ ензим и матрица t500. Нуклеозидните производни от настоящото изобретение се накапват в 96-ямкова плака. Приготвя се смес от нуклеозид трифосфати (NTP's), включваща радиоактивно белязан GTP и се накапва в ямките на 96-ямковата плака. Реакцията се иницира чрез добавяне на реакционен разтвор от ензим-матрица и се остава да протича на стайна температура в продължение на 1-2 h.

Реакцията се спира чрез добавяне на 20 microl 0.5 M EDTA, pH 8.0. Включени са и реакции с празна проба, при които се добавя разтвор за спиране на реакцията към NTPs, преди добавянето на реакционния буфер.

50 microl от изгасената реакционна смес се нанася върху DE81 филтърни дискчета (Whatman) и се оставя да изсъхне в продължение на 30 min. Филтрите се измиват с 0.3 M амониев формат, pH 8 (150 ml/измиване, докато срм в 1 ml от промивката е по-малко от 100, обикновено 6 измивания). Филтрите се преброяват в 5-ml сцинтилационна течност, в сцинтилационен брояч.

Процентът на потискане се изчислява съгласно следното уравнение: % инхибиране = $[1 - (\text{срм в анализираната реакция} - \text{срм в празната проба}) / (\text{срм в контролната реакция} - \text{срм в празната проба})] \times 100$.

Представените съединения анализирани чрез метода за HCV NS5B полимераза, показват IC_{50's} по-малка от 100 микромолярна.

В. Метод за потискане на HCV РНК репликация:

Съединенията от настоящото изобретение се оценяват също така за способността им да повлияват репликацията на хепатит С вирусната РНК в култивирани хепатомни клетки (HuH7), съдържащи субгеномен HCV репликон. Подробностите за метода са описани по-долу. Този метод с използване на репликаона е модификация на този, описан от V. Lohmann, F. Korner, J.-O. Koch, U. Herian, L. Theilmann, и R. Bartenschlager, "Replication of a Sub-genomic Hepatitis C Virus RNAs in Hepatoma Cell Line", Science 285: 110 (1999).

Протокол:

Методът е in situ рибонуклеазна протекция, базиращ се на Scintillation Proximity метод върху плака (SPA). 10,000-40,000 клетки се засяват в 100-200 microl среда, съдържаща 0.8 mg/ml G418 в 96-ямкови cytostar плаки (Amersham).

Съединенията се добавят към клетките в различни концентрации, до 100 microM в 1 % DMSO, при време от 0 до 18 h и след това се култивират в продължение на 24-96 h. Клетките се фиксират (20 min, 10 % формалин), пермеабilizират се (20 min, 0.25 % Triton X-100/PBS) и се хибридизират (в продължение на една нощ,

при 50°C) с едноверижна ³³P РНК сонда, комплиментарна на (+) веригата на NS5B (или на други гени), съдържащи се в РНК вирусния геном. Клетките се измиват, третират се с РНКаза, измиват се, нагряват се до 65°C и се преброяват в Тор-Count. Потискането на репликацията се отчита като намаляване на броя на импулсите за минута (срм).

Човешки NuH-7 хепатомни клетки, които са избрани да съдържат субгеномен репликационен, имат цитоплазматична РНК, съставена от HCV 5' нетранслираща се област (NTR), селективен маркер за неомизин, EMCV IRES (вътрешно рибозомално място) и от HCV неструктурни белтъци NS3 до NS5B, последвана от 3' NTR.

Представените съединения анализирани в метода за репликация показват EC₅₀'s по-малка от 100 микромолярна.

Нуклеозидните производни от настоящото изобретение се оценяват също така и за клетъчна токсичност и антивирусна специфичност чрез counter/противоположно/screens, описани по-долу.

С. Радиоактивен скрининг:

Способността на нуклеозидните производни от настоящото изобретение да потискат човешка ДНК полимеразата, се измерва чрез следните анализи.

а. Потискане на човешка ДНК полимеразата алфа и бета:

Условия за реакцията:

50 microl реакционен обем

Компоненти на реакционния буфер:

20 mM Трис-НСl, рН 7.5

200 microg/ml говежди серумен албумин

100 mM KCl

2 mM бета-меркаптоетанол

10 mM MgCl₂

1.6 microM dA, dG, dC, dTTP

алфа-³³P-dATP

Ензим и матрица:

0.05 mg/ml ДНК матрица от сперма на риба с празнини

0.01 U/microl DNA полимеразата алфа или бета

Приготвяне на ДНК матрица от сперма на риба с празни места:

Добавете 5 microl 1M MgCl₂ към 500 microl активирана спермална ДНК от риба (USB 70076);

Нагрейте до 37°C и добавете 30 microl от

65 U/microl от екзонуклеаза III (GibcoBRL 18013-011);

Инкубирайте 5 min при 37°C;

Спрете реакцията чрез нагряване до 65°C в продължение на 10 min;

Нанесете 50-100 microl аликвоти върху Bio-spin 6 хроматографски колонки (Bio-Rad 732-6002), уравновесени с 20 mM Трис-НСl, рН 7.5;

Елуирайте чрез центрофугиране при 1,000 x g за 4 min;

Съберете елуатът и измерете абсорбцията при 260 nm, за да определите концентрацията.

ДНК матрицата се разрежда в подходящ обем от 20 mM Трис-НСl, рН 7.5 и ензимът се разрежда в подходящ обем от 20 mM Трис-НСl, съдържащ 2 mM бета-меркаптоетанол и 100 mM KCl. Матрицата и ензимът се накапват в микро-епруветки за центрофугиране или в 96-ямкова плака. Правят се също така реакции с празна проба, изключващи ензима и контролни реакции изключващи съединението за анализ, като се използват респективно, буфер за разреждане на ензима и разтворител на съединението за анализ. Реакцията се иницира с реакционен буфер с компонентите, които са изброени по-долу. Реакционната смес се инкубира в продължение на 1 h при 37°C. Реакцията се спира чрез добавяне на 20 microl 0.5 M EDTA. 50 microl от реакционна смес, след спиране на реакцията се нанася върху Whatman DE81 филтърни дискчета и се изсушават. Филтърните дискчета се измиват няколко пъти със 150 ml 0.3 M амониев формат, рН 8, докато 1 ml от промивката е < 100 срм. Дискчетата се измиват два пъти със 150 ml абсолютен етанол и еднократно със 150 ml безводен етер, изсушават се и се преброяват в 5 ml сцинтилационна течност.

Процентът на потискане се изчислява съгласно следното уравнение: % инхибиране = [1 - (срм в анализираната реакция - срм в празната проба) / (срм в контролната реакция - срм в празната проба)] x 100.

б. Потискане на човешка ДНК полимеразата гама:

Възможността за потискане на човешка ДНК полимеразата гама се измерва в реакции, които включват 0.5 ng/microl ензим; 10 microM dATP, dGTP, dCTP и TTP; 2 microCi/реакция [³³P]-dATP и 0.4 microg/microl активирана ДНК от сперма на риба (закупена от US Biochemical)

в буфер, съдържащ 20 mM Трис pH 8, 2 mM бета-меркаптоетанол, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂ и 0.1 microg/microl BSA. Реакцията продължава в продължение на 1 h при 37°C и се гаси чрез добавяне на 0.5 M EDTA, до крайна концентрация от 142 mM. Количеството на образувания продукт се определя чрез анионно обменно филтърно свързване и сцинтилационно преброяване. Съединенията се анализират до 50 microM.

Процентът на потискане се изчислява съгласно следното уравнение: % инхибиране = $[1 - (\text{срт в анализираната реакция} - \text{срт в празната проба}) / (\text{срт в контролната реакция} - \text{срт в празната проба})] \times 100$.

Способността на нуклеозидните производни от настоящото изобретение да потискат HIV инфекцията и разпространението на HIV се измерва чрез следните методи.

с. Метод за HIV инфекция

Анализите се извършват с вариант на HeLa Magi клетки, експресиращи както CXCR4, така и CCR5, избрани с нисък фон за бета-галактозидазна (бета-gal) експресия. Клетките се инфектират в продължение на 48 h и количеството на бета-gal продукция от интегрирания HIV-1 LTR промотор се определя чрез хемилуминесцентен субстрат (Galactolight Plus, Tropix, Bedford, MA). Инхибиторите се титруват (двойно) в двукратни серийни разреждания, като се започва от 100 microM; процентът на потискане за всяка концентрация се изчислява по отношение на инфекцията в контролите.

d. Потискане на разпространението на HIV

Способността на съединенията от настоящото изобретение да потискат разпространението на вируса на човешката имунна недостатъчност (HIV), се измерва чрез метода, описан в US Патент № 5,413,999 (Май 9, 1995) и J. P. Vccia, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 4096-4100 (1994), които са включени изцяло тук в справката.

Нуклеозидните производни от настоящото изобретение се скринират също така за цитотоксичност срещу култивирани хепатомни (HuH-7) клетки, съдържащи субгеномен HCV Репликон, въз основа на MTS клетъчен метод, както е описано в метода по-долу. Клетъчната линия HuH-7 е описана от H. Nakabayashi, et al., Cancer Res., 42: 3858 (1982).

е. Метод за цитотоксичност:

Клетъчните култури се приготвят в подхо-

дяща среда с концентрации приблизително от 1.5×10^5 клетки/ml за суспензионни култури, при 3-дневна инкубация и 5.0×10^4 клетки/ml, за адхерентни култури, при 3-дневна инкубация. 99 microl от клетъчната култура се пренася в 96-ямкова за тъканно култивиране плака и се добавя 1 microl от 100-кратната крайна концентрация от съединението за анализ в DMSO. Плаките се инкубират при 37°C и 5 % CO₂ за определен период от време. След периода на инкубация, към всяка ямка се добавя 20 microl от CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay реагент (MTS) (Promega) и плаките се инкубират при 37°C и 5 % CO₂ за допълнителен период от време до 3 h. Плаките се клатят, за да стане добро смесване и чрез апарат за отчитане на абсорбцията в плаките, се отчита абсорбцията при 490 nm. Прави се стандартна крива на клетките от суспензионната култура с известен брой клетки, непосредствено преди добавянето на MTS реагента. Метаболитно активните клетки редуцират MTS до формазан. Абсорбцията на формазана е при 490 nm. Абсорбцията при 490 nm в присъствие на съединението се сравнява с абсорбцията на клетките без да е добавено което и да е съединение.

Справка: Cory, A. H. et al., "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture", Cancer Commun. 3: 207 (1991).

Използвани са следните методи, за да се измери активността на съединенията от настоящото изобретение срещу други РНК-зависими РНК вируси:

а. Определяне на in vitro антивирусната активност на съединенията срещу риновирус (Анализ за потискане на цитопатичен ефект):

Условията за метода са описани в статията на Sidwell и Huffman, "Use of disposable microtissue culture plates for antiviral and interferon induction studies", Appl. Microbiol. 22: 797-801 (1971).

Вируси:

Използва се риновирус тип 2 (RV-2), щам HGP, с KB клетки и среда (0.1% NaHCO₃, без антибиотици), както се съобщава в справката на Sidwell и Huffman. Вирусът получен от ATCC, е от секрет на гърлото на възрастен мъж със средно остро фиброзно заболяване на горния респираторен тракт.

Риновирусът тип 9 (RV-9), шам 211 и риновирусът тип 14 (RV-14), шам Tow, са получени също така от American Type Culture Collection (ATCC) в Rockville, MD. RV-9 е от промивка на човешко гърло, а RV-14 е от секрет от гърло на млад човек с респираторно заболяване на горните дихателни пътища. И двата вируса са използвани с HeLa Ohio-1 клетки (Dr. Fred Hayden, Univ. of VA), които са човешки цервикални епителни ракови клетки. Като среда за растеж се използва MEM (Eagle's minimum essential medium) с 5 % фетален говежди серум (FBS) и 0.1 % NaHCO_3 .

Средата за антивирусен анализ и за трите типа вируси е MEM с 5 % FBS, 0.1 % NaHCO_3 , 50 microg гентамицин/ml и 10 mM MgCl_2 .

Най-високата концентрация, използвана за анализ на съединенията от настоящото изобретение е 2000 microg/ml. Вирусът се добавя към плаката за анализ приблизително 5 min след съединението за анализ. Пускат се също така и съответните контроли. Плаките за анализ се инкубират при влажност на въздуха и 5 % CO_2 при 37°C. Цитотоксичността се контролира микроскопски в контролните клетки за морфологични промени. Регресивният анализ на данните от CPE вируса и данните за токсичен контрол, дават ED50 (50 % ефективна доза) и CC50 (50 % цитотоксична концентрация). Индексът на селективност (SI) се изчислява чрез формулата: $SI = CC50 - ED50$.

b. Определяне на *in vitro* антивирусната активност на съединенията срещу Dengue, Banzі и Yellow fever (Анализ за потискане на CPE)

Подробностите за анализа са дадени в справката на Sidwell и Huffman по-горе.

Вируси:

Dengue вирус тип 2, New Guinea шам, е получен от Центъра за контрол на заболяванията. Използвани са две клетъчни линии от бъбрек на африканска зелена маймуна за култивиране на вируса (Vero) и за провеждането на антивирусен анализ (MA-104). И двата вируса, Yellow fever вируса предизвикващ треска, шам 17D, получен от инфектиран мозък на мишка, така и Banzі вируса, шам H 336, изолиран от серум на момче с фибрилна треска от Южна Африка, са получени от ATCC. Vero клетките се използват и с двата вируса и за анализа.

Клетки и среда:

MA-104 клетките (BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD) и Vero клетките (ATCC), се използват със среда 199 с 5 % FBS и 0.1 % NaHCO_3 и без антибиотици.

Средата за анализ на dengue, yellow fever и Banzі вирусите е MEM, 2 % FBS, 0.18 % NaHCO_3 и 50 microg гентамицин/ml.

Антивирусният анализ на съединенията от настоящото изобретение се провежда съгласно справката на Sidwell и Huffman и по подобен начин както по-горе за риновирусния антивирусен анализ. Отчетен е адекватен цитопатичен ефект (CPE), постигнат след 5-6 дни за всеки от тези вируси.

c. Определяне на *in vitro* антивирусната активност на съединенията срещу West Nile вируса (Анализ за потискане на CPE)

Подробностите за анализа са дадени в справката на Sidwell и Huffman, цитирана по-горе. West Nile вирус, New York, изолиран от мозък на крава, е получен от Центъра за контрол на заболяванията. Отглеждат се Vero клетки и се използват както е описано по-горе. Средата за анализ е MEM, 1 % FBS, 0.1 % NaHCO_3 и 50 microg гентамицин/ml.

Антивирусният анализ на съединенията от настоящото изобретение се провежда съгласно методите на Sidwell и Huffman, които са подобни на тези, използвани за анализа на риновирусната активност. Отчетен е адекватен цитопатичен ефект (CPE) след 5-6 дни.

d. Определяне на *in vitro* антивирусната активност на съединенията срещу rhino, yellow fever, dengue, Banzі и West Nile вирусите (Анализ за поемане на Neutral Red)

След провеждане на анализа за потискане на CPE по-горе, се използва допълнителен метод за цитопатична детекция, който е описан в "Microtiter Assay for Interferon: Microspectrophotometric Quantitation of Cytopathic Effect", Appl. Environ. Microbiol. 31: 35-38 (1976). Използва се Model EL309 микроплаков апарат (Bio-Tek Instruments Inc.), за да се отчете анализа в плаката. ED50's и CD50's се изчисляват както по-горе.

Пример за фармацевтична формулировка

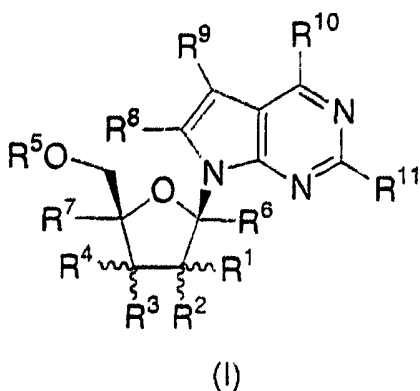
Като специфичен вариант на орален състав на съединение от настоящото изобретение, 50 mg от съединението от Пример 1 или Пример 2 се формулира с достатъчно фино разпделе-

на лактоза, за да се осигури общо количество от 580 до 590 mg, за да се запълни твърда желатинова капсула с размер 0.

Тъй като изобретението е описано и илюстрирано по отношение на неговите специфични варианти, за специалистите в областта ще е ясно, че могат да се направят различни промени, модификации и замествания, без да се отклоняват от духа и обхвата на изобретението. Например, могат да се прилагат ефективни дози, които са различни от предпочитаните дози съобщени тук по-горе, вследствие на различния отговор на човека, който се лекува от тежка HCV инфекция. По подобен начин, наблюдавания фармакологичен отговор може да варира в зависимост от избраното специфично активно съединение или в зависимост от това, дали присъстват фармацевтични носители, така като и от вида на формулировката и начина, който се използва за прилагането ѝ, като такива очаквани вариации и различия в резултатите са предвидени съгласно целите и практиката на настоящото изобретение. Следователно планирано е изобретението да бъде лимитирано само от обхвата на претенциите, които следват и тези претенции могат да се интерпретират толкова широко, колкото е приемливо.

Патентни претенции

1. Съединение със структурна формула I:



или фармацевтично приемлива негова сол; където R^1 е C_{2-4} алкенил, C_{2-4} алкинил, или C_{1-4} алкил, където алкилът не е заместен или е заместен с хидрокси, amino, C_{1-4} алкокси, C_{1-4} алкилтио, или с един до три флуорни атома;

R^2 е водород, флуор, хидрокси, меркапто, C_{1-4} алкокси, или C_{1-4} алкил; или R^1 и R^2 заедно с

въглеродния атом, към който те са прикрепени образуват от 3- до 6-членна наситена моноциклическа пръстеновидна система, съдържаща по избор хетероатом, избран от O, S и NC_{0-4} алкил;

R^3 и R^4 всеки един от тях е независимо избран от групата, съставена от водород, циано, азидо, халоген, хидрокси, меркапто, amino, C_{1-4} алкокси, C_{2-4} алкенил, C_{2-4} алкинил и C_{1-4} алкил, където алкилът не е заместен или е заместен с хидрокси, amino, C_{1-4} алкокси, C_{1-4} алкилтио, или с един до три флуорни атома;

R^5 е водород, C_{1-10} алкилкарбонил, $P_3O_9H_4$, $P_2O_6H_3$, или $P(O)R^{13}R^{14}$;

R^6 и R^7 всеки един от тях независимо е водород, метил, хидроксиметил или флуорометил;

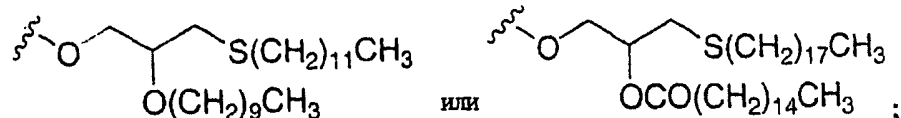
R^8 е водород, C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкинил, халоген, циано, карбокси, C_{1-4} алкилоксикарбонил, азидо, amino, C_{1-4} алкиламино, ди (C_{1-4} алкил) amino, хидрокси, C_{1-6} алкокси, C_{1-6} алкилтио, C_{1-6} алкилсулфонил, (C_{1-4} алкил) $_{0-2}$ аминометил, или C_{4-6} циклохетероалкил, незаместен или заместен с една до две групи, независимо избрани от халоген, хидрокси, amino, C_{1-4} алкил и C_{1-4} алкокси;

R^9 е водород, циано, нитро, C_{1-3} алкил, $NHCONH_2$, $CONR^{12}R^{12}$, $CSNR^{12}R^{12}$, $COOR^{12}$, $C(=NH)NH_2$, хидрокси, C_{1-3} алкокси, amino, C_{1-4} алкиламино, ди (C_{1-4} алкил) amino, халоген, (1,3-оксазол-2-ил), (1,3-тиазол-2-ил), или (имидазол-2-ил); където алкилът не е заместен или е заместен с една до три групи, независимо избрани от халоген, amino, хидрокси, карбокси и C_{1-3} алкокси;

R^{10} и R^{11} всеки един от тях независимо е водород, хидрокси, халоген, C_{1-4} алкокси, amino, C_{1-4} алкиламино, ди (C_{1-4} алкил) amino, C_{3-6} циклоалкиламино, ди (C_{3-6} циклоалкил) amino, или C_{4-6} циклохетероалкил, незаместен или заместен с една до две групи, независимо избрани от халоген, хидрокси, amino, C_{1-4} алкил и C_{1-4} алкокси;

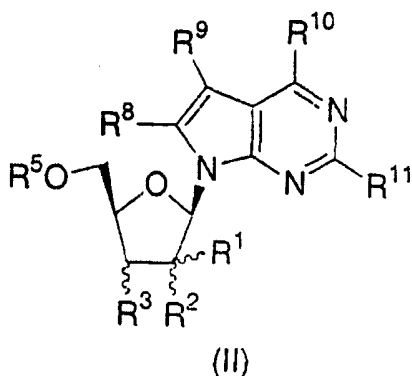
всеки R^{12} е независимо водород или C_{1-6} алкил; и

R^{13} и R^{14} всеки един от тях независимо е хидрокси, $OCH_2CH_2SC(=O)C_{1-4}$ алкил, $OCH_2O(C=O)OC_{1-4}$ алкил, $NHCHMeCO_2Me$, $OCH(C_{1-4} алкил) O(C=O) C_{1-4}$ алкил,



при условие че когато R^1 е бета-метил, а R^4 е водород или R^4 е бета-метил, а R^1 е водород, R^2 и R^3 са алфа-хидрокси, R^{10} е amino, а R^5 , R^6 , R^7 , R^8 и R^{11} са водород, тогава R^9 не е циано или CONH_2 .

2. Съединение съгласно претенция 1 със структурна формула II:



или фармацевтично приемлива негова сол; където R^1 е C_{1-3} алкил, където алкилът по избор е заместен с хидрокси, amino, C_{1-3} алкокси, C_{1-3} алкилтио, или с един до три флуорни атома; R^2 е хидрокси, флуоро или C_{1-4} алкокси; R^3 е водород, халоген, хидрокси, amino или C_{1-4} алкокси;

R^5 е водород, $\text{P}_3\text{O}_9\text{H}_4$, $\text{P}_2\text{O}_6\text{H}_3$, или PO_3H_2 ; R^8 е водород, amino или C_{1-4} алкиламино; R^9 е водород, циано, метил, халоген или CONH_2 ; и

R^{10} и R^{11} всеки един от тях независимо е водород, халоген, хидрокси, amino, C_{1-4} алкиламино, ди (C_{1-4} алкил) amino, или C_{3-6} циклоалкиламино;

при условие, че когато R^1 е бета-метил, R^2 и R^3 са алфа-хидрокси, R^{10} е amino, а R^5 , R^8 и R^{11} са водород, тогава R^9 не е циано или CONH_2 .

3. Съединение съгласно претенция 2, където:

R^1 е метил, флуорометил, хидроксиметил, дифлуорометил, трифлуорометил или аминометил;

R^2 е хидрокси, флуоро или метокси;

R^3 е водород, флуоро, хидрокси, amino или метокси;

R^5 е водород или $\text{P}_3\text{O}_9\text{H}_4$;

R^8 е водород или amino;

R^9 е водород, циано, метил, халоген или CONH_2 ; и

R^{10} и R^{11} всеки един от тях независимо е водород, флуоро, хидрокси или amino;

при условие че когато R^1 е бета-метил, R^2 и R^3 са алфа-хидрокси, R^{10} е amino, а R^5 , R^8 и R^{11} са водород, тогава R^9 не е циано или CONH_2 .

4. Съединение съгласно претенция 1, избрано от групата, съставена от:

4-амино-7-(2-С-метил-бета-D-арабинофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(2-С-метил-бета-D-

рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-метиламино-7-(2-С-метил-бета-D-

рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-диметиламино-7-(2-С-метил-бета-D-

рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-циклопропиламино-7-(2-С-метил-бета-

D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пирими-

дин,

4-амино-7-(2-С-винил-бета-D-рибофура-

нозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(2-С-хидроксиметил-бета-D-

рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(2-С-флуорометил-бета-D-

рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-5-метил-7-(2-С-метил-бета-D-

рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофура-

нозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-5-карбок-

силна киселина,

4-амино-5-бромо-7-(2-С-метил-бета-D-

рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-5-хлоро-7-(2-С-метил-бета-D-

рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-5-флуоро-7-(2-С-метил-бета-D-

рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

2,4-диамино-7-(2-С-метил-бета-D-рибо-

фуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

2-амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

2-амино-4-циклопропиламино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин, 5

2-амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-4 (3Н)-он,

4-амино-7-(2-С-етил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин, 10

4-амино-7-(2-С,2-О-диметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-4 (3Н)-он, 15

2-амино-5-метил-7-(2-С,2-О-диметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин-4 (3Н)-он,

4-амино-7-(3-дезоксид-2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин, 20

4-амино-7-(3-дезоксид-2-С-метил-бета-D-арабинофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-2-флуоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин, 25

4-амино-7-(3-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(3-С-метил-бета-D-ксилофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(2,4-ди-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин, и 30

4-амино-7-(3-дезоксид-3-флуоро-2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин; и

съответните 5'-трифосфати; 35

или фармацевтично приемлива тяхна сол.

5. Съединение съгласно претенция 4, избрано от групата, съставена от:

4-амино-7-(2-С-метил-бета-D-арабинофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин, 40

4-амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-7-(2-С-флуорометил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-5-метил-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин, 45

4-амино-5-бромо-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин,

4-амино-5-хлоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин, 50

4-амино-5-флуоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин, и

4-амино-7-(2-С,2-О-диметил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин, и съответните 5'-трифосфати;

или фармацевтично приемлива тяхна сол.

6. Съединение съгласно претенция 5, което е 4-амино-7-(2-С-метил-бета-D-арабинофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин или фармацевтично приемлива негова сол.

7. Съединение съгласно претенция 5, което е 4-амино-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин или фармацевтично приемлива негова сол.

8. Съединение съгласно претенция 5, което е 4-амино-7-(2-С-флуорометил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин; или фармацевтично приемлива негова сол.

9. Съединение съгласно претенция 5, което е 4-амино-5-хлоро-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин; или фармацевтично приемлива негова сол.

10. Съединение съгласно претенция 5, което е 4-амино-5-бромо-7-(2-С-метил-бета-D-рибофуранозил)-7Н-пироло [2,3-d] пиримидин; или фармацевтично приемлива негова сол.

11. Фармацевтичен състав, характеризиращ се с това, че включва съединение съгласно претенция 1 и фармацевтично приемлив носител.

12. Фармацевтичен състав съгласно претенция 11, характеризиращ се с това, че споменатата РНК-зависима вирусна РНК полимераза е HCV NS5B полимераза, споменатата РНК-зависима вирусна РНК репликация е HCV репликация и споменатата РНК-зависима вирусна РНК инфекция е HCV инфекция.

13. Използване на съединение съгласно претенция 1, за получаване на лекарствен препарат, за потискане на РНК-зависимата вирусна РНК полимераза, и/или за потискане на РНК-зависимата вирусна РНК репликация, включващо прилагане на ефективно количество от съединение на бозайник, нуждаещ се от такова потискане.

14. Използване съгласно претенция 13, където споменатата РНК-зависима вирусна РНК полимераза е HCV NS5B полимераза и споменатата РНК-зависима вирусна РНК репликация е HCV вирусна репликация.

15. Използване на съединение съгласно претенция 1, за получаване на лекарствен препарат, за лечение на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция, включващо прилагане на ефективно количество от съединение на бозайник, нуждаещ се от такова лечение.

16. Използване съгласно претенция 15, където споменатата РНК-зависима вирусна РНК инфекция е HCV инфекция.

17. Използване съгласно претенция 16 в комбинация с терапевтично ефективно количество от друго средство, активно срещу HCV.

18. Използване съгласно претенция 17, където споменатото средство, активно срещу HCV е рибавирин; левовирин; тимозин алфа-1; инхибитор на NS3 серинова протеаза; инхибитор на инозин монофосфат дехидрогеназата; интерферон-алфа или PEG-свързан интерферон-алфа, са-

мостоятелно или в комбинация с рибавирин или левовирин.

19. Използване съгласно претенция 18, където споменатото средство, активно срещу HCV е интерферон-алфа или полиетиленгликол-свързан интерферон-алфа, самостоятелно или в комбинация с рибавирин.

20. Използване на съединение съгласно претенция 1 за потискане на РНК-зависимата вирусна РНК полимераза или за потискане на РНК-зависимата вирусна РНК репликация в бозайник.

21. Използване на съединение съгласно претенция 1 за лечение на РНК-зависимата вирусна РНК инфекция в бозайник.

22. Използване съгласно претенция 21, където споменатата РНК-зависима вирусна РНК инфекция е хепатит С инфекция.