

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

90340

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 20.06.72 (P. 156139)

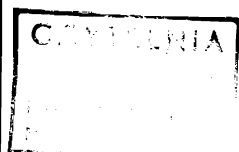
Pierwszeństwo: 31.03.72 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 01.01.74

Opis patentowy opublikowano: 15.12.1977

MKP C07d 51/50
C07d 107/00

Int. Cl². C07H 19/00



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: I.C.N. Pharmaceuticals Inc. — Irvine,
Kalifornia (Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania nowych 3-podstawionych 1,2,4-triazolonukleozydów

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania nowych 3-podstawionych 1,2,4-triazolonukleozydów charakteryzujących się aktywnością przeciwwirusową jak i przeciwnowotworową.

Nowe 3 podstawione 1,2,4-triazolonukleozydy przedstawia wzór 1.

Dotychczas znanymi dwoma antybiotykami nukleozydowymi o pięcioczłonowych pierścieniach heterocyklicznych są showdomycyna i pirazomycyna, określone niżej podanymi wzorami 3 i 4. Spośród dotychczas poznanych syntetycznych nukleozydowych środków przeciwwirusowych szczególne znaczenie mają 5-jodo-2'-dezoksyurydyna (5-IDU), 9-β-D-arabino-furanozyloadenina (Ara-A) oraz 1-β-D-arabino-furazy-nolocytozyna (Ara-C). Z tych substancji dostępna jest tylko 5-IDU (w roztworze 0,1% w szczególności jako środek przeciwwirusowy. Wadą tego związku jest jego słaba rozpuszczalność i silna toksyczność, powodująca konieczność stosowania tego związku w niekorzystnie dużych rozcieńczeniach.

Alonsi i inni w „J. Heterocyclic Chem.” 7, 1269—72 (1970) opisują wytwarzanie 1-(β-D-rybofuranazylo)-4-karboksamido-1,2,3-triazolu, nie wspominają jednak o jakiejkolwiek jego aktywności biologicznej. Witkowski i Robins w artykule pod tytułem „Synteza chemiczna nukleozydów 1,2,4-triazolowych, pochodnych urydyny, 2'-dezoksyurydyny, tymidyny i cytydyny” (J. Org.Chem. 35, 2635—41), (1970), proponują różne analogi 1,2,4-triazolonukleozydowe, jako substancje odpowiednie do wykonywania testów biologicznych, przy czym jednak nie wspominają o żadnych działaniach specjalnych tych związków. Dalsze badania wykazały, że spośród podanych analogów tylko 5-bromo-3-nitro-1-(2,3,5-trój-O-acetylo-β-D-rybofuranazylo)-1,2,4-triazol wykazuje niewielką aktywność przeciwwirusową, przy czym przyjmuje się że aktywność tę należy przypisać jedynie cytotoksyczności tego związku.

Sposób według wynalazku polega na tym, że 3-podstawiony-1-(0-acylozablokowany-β-D-rybofuranazylo)-1,2,4-triazol o wzorze 2, w którym każdy podstawnik Ac oznacza grupę acylową, Y oznacza grupę cyjanową,

poddaje się reakcji z amoniakiem a następnie usuwa blokujące grupy acylowe przez zmydlenie. Stosuje się związki wyjściowe o grupach hydroksylowych zablokowanych resztami acylowymi.

Związki według wynalazku wykazują aktywność przeciwwirusową, w postaci nie zacylowanej czyli „odblokowanej” wykazują znacznie większą rozpuszczalność w wodzie niż dotychczas znane nukleozydowe środki przeciwwirusowe. Szczególnie korzystny jest nowy 1-(β -D-rybofuranozylo-1,2,4-triazolo-3-karboksamido-nukleozyd, który charakteryzuje się bardzo szerokim zakresem skuteczności przeciwwirusowej oraz przeciwiguzowej.

Ester metylowy kwasu 1,2,4-triazolo-3-karboksylowego oraz 3-cyjanotriazol mogą służyć, jako produkty wyjściowe do syntezy 1,2,4-triazolonukleozydów według wynalazku. Pierwszy z wymienionych związków można wytwarzać za pomocą utleniania 3-metylo-1,2,4-triazolu i następującą potem estryfikację otrzymanego kwasu metodą Cipensa i Grinsteina (porównaj „Latvijas PSR Zinatnu Akad Vestis”. Kim. Ser. (1965) (2) 204–08, porównaj C.A. 63, 13243, 1965). 3-cyano-1,2,4-triazol wytwarza się w drodze wielostopniowej syntezy podanej przez Cipensa i innych (loc. cit.). Związek ten można otrzymywać w sposób jeszcze bardziej korzystny stosując reakcję addycji między dwucyjanem a hydrazyną, przy czym powstaje hydrazyd kwasu 1-cyanoforminidowego oraz następującą potem cyklizację w ortomrówczenie trójetylowym katalizowaną przez kwas. Zgodnie z jednym z wariantów otrzymuje się z wydajnością ilościową pochodną trójmetylosililową estru metylowego kwasu 1,2,4-triazolo-3-karboksylowego w reakcji z heksametylo-dwusilazanem pod chłodnicą zwrotną, a następnie wprowadza się ją w reakcję z odpowiednim O acylowanym (zacylowanym przy tlenie) halogenkiem cukru, przy czym powstaje na przykład mieszanina złożona z estrów metylowych O-benzoilowanych kwasów 1- β -D-rybofuranozylo-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego oraz 5 karboksylowego zgodnie ze schematem 1 reakcji. W schemacie tym symbol Bz oznacza grupę benzoilową. Ester metylowy kwasu 3-karboksylowego izoluje się za pomocą krystalizacji cząstkowej, albo korzystnie metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Odbenzoilowanie i aminoliza dają amid kwasu 1-(β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3 karboksylowego.

Najlepsza metoda syntezy polega na stapianiu w obecności kwasowego katalizatora odpowiednio podstawionego triazolu z cukrem zablokowanym acylami przy atomach tlenu (w tym przypadku z 1-O-acetylo-2,3,5-trój-O-trójbenzoilo- β -D-rybofuranozą), po czym następuje odblokowanie i aminoliza, jak to wynika ze schematu 2 reakcji.

Albo też do stapiania stosować 2-cyano-1,2,4-triazol po czym powstały 3-cyano-1-(2,3,5-trój-O-acetylo- β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazol przeprowadzać w aktywny 3-karboksamido nukleozyd za pomocą reakcji z nad-tlenkiem wodoru w obecności wodnego roztworu amoniaku. Jednakże wydajność jest mniejsza niż w przypadku stapiania z estrem metylowym kwasu 1,2,4-triazolo karboksylowego.

Pomimo, że wynalazek opisano ze szczególnym uwzględnieniem zablokowania grupami acetylowymi lub benzoilowymi grup hydroksylowych w pozycjach 2', 3' i 5 reszty cukrowej, to jednak zaznacza się, że do zabezpieczenia tych grup hydroksylowych przed reakcjami ubocznymi, na przykład przed dehydratacją (podczas syntezy substancji czynnych, stanowiących przedmiot wynalazku) można stosować wszelkie odpowiednie acyle Sutherland i inni w „Biochim. et. Biophys. Acta” str. 148 107 (1967) podają, że zacylowanie cyklicznych nukleotydów wywiera korzystny wpływ na transport komórkowy. Wolne grupy hydroksylowe reszty cukrowej nukleotydów i nukleozydów według wynalazku można zacylować inaczej w celu zwiększenia rozpuszczalności w lipidach albo na przykład wprowadzać grupy alkilo albo alkarylosulfonylowe na przykład tozylowe, mezylowe, brozylowe, nizylowe itd..

Pomimo, że jako grupę opuszczającą pozycję 1' wyżej wspomnianego reagenta cukrowego podano acetyl albo w przypadku sililowania – chlorowiec, to jednak należy zaznaczyć, że można zastosować każdą resztę zdolną do zastąpienia i odszczepienia w postaci produktu ubocznego.

Pomimo, że w powyższej części opisu w celach wyjaśnienia wynalazku posłużono się grupami β -D-rybofuranozylową i ksylofuranozylową to jednak należy zaznaczyć, że wynalazek przewiduje również zastosowanie innych reszt cukrowych, na przykład 2'-dezoksy- β -D-rybofuranozylu, 2'-dezoksy α -D-rybofuranozylu i β -D-arabinofuranozylu. W przypadku 2'-dezoksytriazolonukleozydów cukrami wyjściowymi mogą być 2'-dezoksytriazolonukleozydów cukrami wyjściowymi mogą być 2 dezoksy-1,3,5-trój-O acetylo-D-rybofuranoza albo 1-O-acetylo-2-dezoksy-3,5-dwu-O-(p-toluilo)-D-rybofuranoza. Tę ostatnią otrzymuje się działając na chlorek 2-dezoksy-3,5-dwu-O-(p-toluilo)-D-rybofuranozylu octanem rtęci II w czterohydrofuranie.

Arabinozylotriazolo-nukleozydy wytwarza się metodą sililowania, przy czym stosuje się chlorek 2,3,5-trój-O-benzoilo-D-arabinofuranozylu.

Wobec stwierdzonej aktywności biologicznej rybofuranozylotriazoli według wynalazku prawdopodobna wydaje się również aktywność odpowiednio podstawionych arabinofuranozylotriazoli, zwłaszcza ze względu na znaczną aktywność przeciwwirusową związku „Ara-A” i związku „Ara-C”. Podobnie znana aktywność przeciwwirusowa 5-jodo-2'-dezoksyurydyny pozwala przewidywać aktywność biologiczną odpowiednich 2'-dezoksy- β -D-

-rybofuranozylotriazoli, skoro poznano aktywność rybofuranozylotriazoli według niniejszego wynalazku, zwłaszcza przeciw wirusom zawierającym DNA, jak wirusy typu 1 Herpes i typu 2 Herpes. Jednakże dla związków tych w badaniach wobec wirusów według niżej podanego przykładu XVI nie stwierdzono wcale aktywności przeciwwirusowej, co należy oczywiście przypisać niezdolności enzymów zawartych w hodowli tkankowej do fosforylowania wolnych nukleozydów, których reszty cukrowe nie zawierają w pozycji 2 atomów tlenu w położeniu trans. Dlatego też te nukleozydy należałoby przed podaniem syntetycznie ufosforylować do przypuszczalnie aktywnej postaci 5'-fosforanu. Ewentualnie postępowania można 5'-fosforan przed podaniem scyklizować, przy czym zachodzące in viwo odszczepienie daje aktywny metabolit 5'-fosforanowy. Fosforylacja odbywa się zasadniczo jak wyżej opisano i prowadzi do wytworzenia rybotydów.

Podane poniżej przykłady służą do wyjaśniania niniejszego wynalazku. Części i procenty o ile nie wskazano inaczej, oznaczają części i procenty wagowe. Temperaturę podano w stopniach Celsjusza. Wszystkie zabiegi odparowywania wykonywano w wyparnikach rotacyjnych pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 35°C.

P r z y k ł a d I. Ester metylowy kwasu 1-(2,3,5-trój-0-benzoilo-B-β'-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego i ester metylowy kwasu 1-(2,3,5,0-benzoilo β-D-rybofuranozylo)-1,2,4 triazolo 5-karboksylowego (Metoda sililowania).

(A) Wytwarzanie estru metylowego kwasu N-(trójmetylosililo)-1,2,4-triazolo 3-karboksylowego. Zawiesinę 14,0 g (110 mM) estru metylowego kwasu 1,2,4-triazolo 3-karboksylowego i 100 ml sześciometylodwusilazanu, stosując mieszanie, utrzymuje się we wrzeniu pod chłodnicą zwrotną dopóty, aż przestanie się wydzielać wolny amoniak (około 2 godzin). Nadmiar sześciometylodwusilazanu usuwa się pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się przy tym 20,6 g (100%) N-trójmetylosililowej pochodnej estru metylowego kwasu 1,2,4-triazolo-3-karboksylowego.

(B) Rybozylowanie halogenkiem cukru. Roztwór, zawierający 20,6 g (110 mM) estru metylowego kwasu N-trójmetylosililo)-1,2,4-triazolo 3-karboksylowego i 52,5 g (100 milimoli) bromku 2,3,5- trój-0-benzoilo-D-rybofuranozylowego w 300 ml bezwodnego acetonitrylu, utrzymuje się w ciągu 3 dni w temperaturze 25°C. Usuwa się rozpuszczalnik, a pozostałość przekształca z etanolu. Po ponownym przekształceniu tego materiału z mieszaniny etanolu z octanem etylowym, jak również po chromatografii kolumnowej przesączów na żelu krzemionkowym za pomocą chloroformu otrzymuje się czysty ester metylowy kwasu 1-(2,3,5-trój-0-benzoilo-β-D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego w ilości 25,1 g (44,0%) o temperaturze topnienia 137-139°C.

Analiza: Dla $C_{30}H_{25}N_3O$

obliczono:	C 63,04	H 4,41	N 7,35
znaleziono:	C 62,91	H 4,17	N 7,10

Składnik przesuwający się szybciej w kolumnie żelu krzemionkowego przykryształizowuje się z etanolu otrzymując 13,2 g (23%) estru metylowego kwasu 1-(2,3,5-trój-0-benzoilo β-D-rybofuranozylo)1,2,4-triazolo 5-karboksylowego o temperaturze topnienia 122°-124°C.

Analiza:

Znaleziono:	C 63,20	H 4,35	N 7,12
-------------	---------	--------	--------

P r z y k ł a d II. Ester metylowy kwasu 1-(2,3,5-trój-0-benzoilo-β-D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego. Mieszaninę złożoną z 12,7 g (100 mM) estru metylowego kwasu 1,2,4-triazolo-3-karboksylowego i z 55,4 g (110mmM) 1-0-acetylo-2,3,5-trój-0-benzoilo β-D-rybofuranozy ogrzewa się w łaźni olejowej utrzymywanej w temperaturze 160-165°C. Po stopieniu cukru, mieszając, dodaje się 400 mg fosforanu bis(p-nitrofenylowego), po czym mieszaninę pod zmniejszonym ciśnieniem ogrzewa się do temperatury 160-165°C w ciągu 15-20 minut. Po przekształceniu pozostałości z mieszaniny octanu etylowego z etanolem otrzymuje się 42,5 g (74,5%) produktu o temperaturze topnienia 137-139°C.

P r z y k ł a d III. Ester metylowy kwasu 1-(2,3,5-trój-0-acetylo β-D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego. Mieszaninę 12,7 g (0,10 M) estru metylowego kwasu 1,2,4 triazolo-3 karboksylowego z 31,8 g (0,10 M) 1,2,3,5-cztero-0-acetylo-β-D-rybofuranozy ogrzewa się w łaźni olejowej utrzymywanej w temperaturze 160-165°C aż do stopnienia cukru. Następnie dodaje się 250 g fosforanu bis-p-nitrofenylowego i mieszając ogrzewa się dalej jeszcze w ciągu 15-20 minut. Pozostałość rozpuszcza się w gorącym benzenie. Roztwór filtruje się. Do przesączu dodaje się cykloheksanu, otrzymując 30,0 g (77,8%) produktu krystalicznego o temperaturze topnienia 107-109°C.

Analiza: dla $C_{15}H_{19}N_3O_9$

Obliczono:	C 46,75	H 4,97	N 10,91
Znaleziono:	C 46,88	H 5,03	N 10,64

Przykład IV. Ester metylowy kwasu 1-(β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksyłowego. Roztwór 25,0 g (43,9 mM) estru metylowego kwasu 1-(2,3,5-trój-O-benzoilo- β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksyłowego i 400 mg roztworu metylenu sodowego w metanolu (200 ml) utrzymuje się w stanie wrzenia w ciągu 45 minut pod chłodnicą zwrotną. Roztwór zobojętnia się preparatem Bio-Rad AG 50 X 2(H) i filtruje. Następnie przesącz zagęszcza się do konsystencji syropu. Po przekrystalizowaniu tego syropu z mieszaniny metanolu z octanem etylowym otrzymuje się 8,0 g (70,5%) produktu o temperaturze topnienia 117–119°C.

Analiza: dla $C_9H_{13}N_3O_6$

obliczono: C 41,70 H 5,06 N 16,21

znaleziono: C 41,57 H 5,13 N 16,16

Przykład V. (A) Amid kwasu 1-(β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksyłowego. Metoda 1. Roztwór 16,0 g (28,0 mM) estru metylowego kwasu 1-(2,3,5-trój-O-benzoilo- β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksyłowego w 300 ml metanolu uprzednio nasyconego w temperaturze 0°C bezwodnym amoniakiem, utrzymuje się w ciągu 3 dni w temperaturze 25°C. Następnie usuwa się rozpuszczalnik i przekrystalizowuje produkt z etanolu. Otrzymuje się przy tym 6,7 g (98%) substancji o temperaturze topnienia 174–176°C. Dzięki przekrystalizowaniu tego produktu z rozwodnionego etanolu otrzymuje się drugą krystaliczną formę tego nukleozydu o temperaturze topnienia 166–168°C.

Analiza: Dla $C_8H_{12}N_4O_5$

Obliczono: C 39,34 H 4,95 N 22,94

Znaleziono: C 39,08 H 5,10 N 22,67

(B) Amid kwasu 1-(β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksyłowego (Metoda 22). Roztwór 10,0 g (26,0 mM) estru metylowego kwasu 1-(2,3,5-trój-O-actylo- β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksyłowego w 70 ml metanolu, uprzednio nasyconego w temperaturze 0°C bezwodnym amoniakiem, utrzymuje się w ciągu 18 godzin w zamkniętej kolbie wysokoprężnej w temperaturze 25°C. Produkt przekrystalizowuje się z etanolu, otrzymując 5,70 g (90,0% amidu) kwasu 1-(β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksyłowego.

(C) Amid kwasu 1-(β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksyłowego. (Metoda 3). Mieszaninę złożoną z 705 mg (2,0 mM) 3-cyjano-1-(2,3,5-trój-O-acetylo- β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolu, 20 ml 28% wodnego roztworu amoniaku i 3,0 ml 30% nadtlenku wodoru, stosując mieszanie, utrzymuje się w ciągu 6 godzin w temperaturze 25°C. Następnie dodaje się dalszą 3,0-mililitrową porcję 30% nadtlenku wodoru, po czym miesza się dalej w ciągu 12 godzin w temperaturze 25°C. Nadmiar nadtlenku wodoru rozkłada się za pomocą czerni platynowej. Roztwór filtruje się i przesącz odparowuje do sucha. Pozostałość rozpuszcza się w metanolu i do roztworu dodaje 5,0 g żelu krzemionkowego, po czym usuwa się rozpuszczalnik. Mieszaninę, zawierającą żel krzemionkowy wprowadza się na kolumnę załadowaną żelazem krzemionkowym. Elucja mieszaninę octanu etylowego z metanolem (1 : 1) prowadzi do otrzymania 250 mg (51,2%) amidu kwasu 1-(β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksyłowego.

Przykład VI. Sól amonowa 1-(β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksamido-5'-fosforanu. Roztwór 259 mg (1,00 mM) estru metylowego kwasu 1-(β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksyłowego 3,0 ml fosforanu trójmetylowego i 0,20 ml tlenochloru fosforu miesza się w ciągu 1,5 godziny w temperaturze 0°C. Następnie dodaje się wody z lodem, po czym otrzymany roztwór zobojętnia się wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego. Wyciąga się roztwór chloroformem oziębia fazą wodną do temperatury 0°C i nasycza amoniakiem. Roztwór trzyma się 16 godzin w temperaturze 25°C i filtruje. Przesącz odparowuje się do małej objętości. Dodanie etanolu powoduje strącanie się osadu, który rozpuszcza się w wodzie i wprowadza na kolumnę załadowaną preparatem Bio-Rad AG50-X2(NH₄) (20 ml). Po zagęszczeniu frakcji zawierających nukleotydy, otrzymuje się sól amonową 1-(β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksamido-5'-fosforanu w ilości 190 mg (55,0%).

Analiza: dla $C_6H_{16}N_5O_8P \cdot H_2O$:

Obliczono: C 26,74 H 5,05 N 19,50

Znaleziono: C 26,78 H 5,23 N 19,68

Przykład VII. Amid kwasu 1-(β -D-ksylofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksyłowego. Mieszaninę złożoną z 12,7 g (40,0 mM) cztero-O-acetylo-D-ksylofuranozy, 5,08 g (40,0 mM) estru metylowego kwasu 1,2,4-triazolo-3-karboksyłowego i 50 mg fosforanu bis-p-nitrofenyloвого ogrzewa się w ciągu 20 minut w łaźni olejowej utrzymywanej w temperaturze 160–165°C. Pozostałość oziębia się i rozpuszcza w chloroformie. Surowy produkt oczyszcza się za pomocą chromatografii na żelu krzemionkowym przy użyciu mieszaniny chloroformu z acetonem (20 : 1). Część (2,0 g) oczyszczonego estru metylowego kwasu 1-(2,3,5-trój-O-actylo- β -D-ksylofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksyłowego traktuje się w ciągu 16 godzin w temperaturze 25°C metano-

lem, który uprzednio nasycono amoniakiem gazowym. Usuwa się rozpuszczalnik. Pozostałość przekrystalizowuje się z rozcieńczonego etanolu, otrzymując przy tym 0,70 g produktu o temperaturze topnienia 194–196,5°C.

Analiza: dla $C_8H_{12}N_4O_5$

Obliczono: C 39,34 H 4,95 N 22,94

Znaleziono: C 39,18 H 4,82 N 22,97

Przykład VIII. Amid kwasu 1-(2,3,5-trój-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego. Rozwór 488 g (2,00 mM) amidu kwasu 1-(β-D-rybofuranozyl)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego w 10,0 ml pirydyny, zawierającej 1,0 ml bezwodnika octowego, trzyma się w ciągu 22 godzin w temperaturze 0–5°C. Następnie dodaje się 1,0 ml etanolu, po czym miesza roztwór w ciągu 2 godzin w temperaturze pokojowej. Odparowuje rozpuszczalnik, a do pozostałości dodaje wody. Mieszaninę ekstrahuje się chlorkiem metylenu (trzy porcjami po 20 ml każda). Następnie warstwę wodną wyciąga się wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego i wodą. Fazę organiczną suszy się siarczanem magnezu, filtruje i odparowuje przesącz do konsystencji syropu, który wprowadza się na kolumnę żelu krzemionkowego. Produkt eluuje się mieszaniną chloroformu z metanolem (19 : 1) i otrzymuje czysty produkt w postaci bezpostaciowej substancji stałej w ilości 560 mg (75,6%).

Analiza dla $C_{14}H_{18}N_4O_8$

Obliczono: C 45,40 H 4,90 N 15,13

Znaleziono: C 45,36 H 4,66 N 14,90

Jeżeli amid kwasu 1-(2,3,5-trój-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego podawać doustnie 2 razy dziennie w ciągu 9 dni w dawkach po 125 i 250 mg (kg) doba myszkom zakażonym wirusem Influenza A₂ (Jap. 305), to liczba zwierząt przeżywających, jak również średni czas przeżycia zwierząt potraktowanych wyraźnie wzrastają w porównaniu z odpowiednimi wynikami otrzymanymi na zwierzętach kontrolnych.

Przykład IX. Amid kwasu 1-β-D-arabinofuranozyl)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego. Roztwór zawierający w 100 ml bezwodnego chlorku metylenu 4,12 g (22,0 mM) estru metylowego kwasu N-trój-metylosililo)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego i 8,78 g (20,0 mM) chlorku 2,3,5-trój-O-benzoilo-D-arabinofuranozylu, utrzymuje się w ciągu 48 godzin w temperaturze 25°C. Roztwór odparowuje się do sucha, pozostałość rozpuszcza w chlorku metylenu, po czym przemywa się roztwór wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego i wodą. Roztwór w chlorku metylenu suszy się siarczanem magnezowym i filtruje po czym przesącz zagęszcza się do konsystencji syropu, który następnie wprowadza się na kolumnę żelu krzemionkowego napełnioną benzenem. Eluowanie kolumny mieszaniną benzenu z eterem (7 : 3) daje 1,9 g syropowatego produktu. Produkt ten traktuje się mililitrami metanolu, nasyconego w temperaturze 0°C bezwodnym amoniakiem. Zabieg ten prowadzi się w ciągu 48 godzin w kolbie wysokoprężnej w temperaturze 25°C. Następnie usuwa się rozpuszczalnik. Pozostałość poddaje się krystalizacji chlorku metylenu z cykloheksanem. Otrzymuje się przy tym 1,3 g (12,6%) amidu kwasu 1-(2,3,5-trój-O-benzoilo-β-D-arabinofuranozyl)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego o temperaturze topnienia 100–102°C.

Analiza dla $C_{29}H_{30}N_4O_5$

Obliczono: C 67,69 H 5,88 N 10,89

Znaleziono: C 67,82 H 5,70 N 10,94

Zawiesinę czerni palladowej w 20 ml metanolu przygotowuje się za pomocą redukcji wodorem 300 mg chlorku palladu. Do zawiesiny dodaje się roztwór 600 mg kwasu 1-(2,3,5-trój-O-benzoilo-β-D-arabinofuranozyl)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego w 25 ml metanolu. Tę mieszaninę wstrząsa się w aparacie do wodorowania pod ciśnieniem 1,7 kg/cm² w ciągu 2 godzin w temperaturze 20°C. Odsącza się katalizator, roztwór przepuszcza się przez kolumnę napełnioną Amberlitem IR45 (OH) (15 ml). Usuwa się rozpuszczalnik, po czym przekrystalizowuje się pozostałość z etanolu. Otrzymuje się przy tym 250 mg (88,5%) produktu o temperaturze topnienia 189–191°C.

Analiza dla $C_8H_{12}N_4O_5$

Obliczono: C 39,34 H 4,95 N 22,94

Znaleziono: C 39,25 H 4,86 N 23,09

Przykład X. (A) 1-O-acetylo-2-dezoksy-3,5-dwu-O-p-toluilo-D-rybofuranaza. Mieszaninę, złożoną z 15,6 g (40,0 mM) chlorku 2-dezoksy-3,5-dwu-O-p-toluilo-D-rybofuranozylu. 12,7 g (40,0 mM) octanu rtęci II i 200 ml tetrahydrofuranu poddaje się mieszanemu w ciągu 10 godzin w temperaturze 25°C. Następnie usuwa się rozpuszczalnik, po czym do pozostałości dodaje się chloroformu. Mieszaninę ekstrahuje się 30% wodnym roztworem jodku potasowego (cztery porcje po 60 ml) i wodą. Fazę organiczną suszy się siarczanem magnezu, filtruje i zagęszcza do konsystencji syropu (16,0 g 97,0%). Po przekrystalizowaniu części tego produktu z mieszaniny cykloheksanu z benzenem otrzymuje się substancję czystą o temperaturze topnienia 88–91°C.

Analiza dla $C_{23}H_{24}O_7$

obliczono: C 66,98 H 5,87

Znaleziono: C 67,23 H 5,97

(B) Ester metylowy kwasu 1-(2-dezoksy-3,5-dwu-0-p-toluilo- α -D-rybofuranozylu)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego i ester metylowy kwasu 1-(2-dezoksy-3,5-dwu-0-p-toluilo- β -D-rybofuranozylu)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego. Mieszaninę złożoną z 4,54 g (11,0 mM) 1-O-acetylo-2-dezoksy 3,5-dwu-0-p-toluilo-D-rybofuranozy 1,27 g (10,0 mM) estru metylowego kwasu 1,2,4-triazolo-3-karboksylowego i 10 mg fosforanu-bis-p-nitrofenyloвого, stosując mieszanie, ogrzewa się w ciągu 10–15 minut pod zmniejszonym ciśnieniem w łaźni olejowej o temperaturze 150°C. Pozostałość rozpuszcza się w chlorku metylenu, roztwór filtruje się i następnie przemycwa wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego i wodą. Fazę organiczną suszy się ponad siarczanem magnezu, filtruje i zagęszcza na syrop. Chromatografia kolumnowa tej mieszaniny anomerów na żelu krzemionkowym daje anomer α , który przekrystalizowuje się z mieszaniny cykloheksanu z chlorkiem metylenu, otrzymując 780 mg produktu czystego o temperaturze topnienia 94–95°C.

Analiza dla $C_{25}H_{25}N_3O_7$

Obliczono: C 62,62 H 5,26 N 8,76

Znaleziono: C 62,44 H 5,16 N 8,64

Kolejne frakcje eluatu z kolumny żelu krzemionkowego zawierają mieszanin anomerów α i β . Frakcje te łączy się i oczyszcza dalej metodą chromatografii na żelu krzemionkowym przy użyciu chloroformu. Otrzymuje się przy tym anomer β w postaci syropu.

(C) Amid kwasu 1-(2-dezoksy- β -D-rybofuranozylu)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego. Roztwór 650 mg (1,35 milimola estru metylowego kwasu 1-(2-dezoksy-3,5-dwu-0-p-toluilo- β -D-rybofuranozylu)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego w 20 ml metanolu, uprzednio nasyconego w temperaturze 0°C bezwodnym amoniakiem, utrzymuje się w temperaturze 25°C w ciągu 3 dni w zamkniętej butli wysokoprężnej. Następnie usuwa się rozpuszczalnik i chromatografuje pozostałość na kolumnie żelu krzemionkowego i przy eluowaniu za pomocą mieszaniny octanu etylowego z metanolem (9 : 1). Otrzymuje się 250 mg (80,8%) amidu kwasu 1-(2-dezoksy- β -D-rybofuranozylu)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego, jako bezpostaciową substancję stałą.

Analiza dla $C_8H_{12}N_4O_4$

Obliczono: C 42,10 H 3,30 N 24,55

Znaleziono: C 41,86 H 5,12 N 24,49

(D) Amid kwasu 1-(2-dezoksy- α -D-rybofuranozylu)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego. Roztwór 780 g (1,63 mM) estru metylowego kwasu 1-(2-dezoksy-3,5-dwu-0-p-toluilo- α -D-rybofuranozylu)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego się zamkniętej kolbie wysokoprężnej w temperaturze 25°C w ciągu 3 dni. Następnie usuwa się rozpuszczalnik, a surowy produkt chromatografuje się na kolumnie żelu krzemionkowego. Elucja mieszaniną octanu etylowego i metanolu (9 : 1) daje amid kwasu 1-(2-dezoksy- α -D-rybofuranozylu)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego w ilości 350 mg (94,4%), jako produkt bezpostaciowy.

Analiza dla $C_8H_{12}N_4O_4$

Obliczono: C 42,10 H 5,30 N 24,55

Znaleziono: C 41,88 H 5,48 N 24,29

Chcąc tę samą metodę zastosować do przekształcenia poszczególnych anomerycznych estrów metylowych w odpowiadające im amidykwasów karboksylowych, można mieszaninę anomerycznych estrów metylowych, otrzymaną według punktu (B) poddać reakcji z amoniakiem przy czym powstaje mieszanina α i β -anomerów karboksamidów.

Przykład XI. Środki przeciwwirusowe według wynalazku poddaje się badaniu ich na aktywność wobec wielkich i małych wirusów zarówno zawierających DNA i jak zawierających RNA metodą oceny wirusów (metoda VR) Sidwella i in. (Appl. Microbiol. 22, 797 (1971). V.R. > 1,0 oznacza definitywną aktywność przeciwwirusową. V.R. < 0,5–0,9 oznacza mierną aktywność przeciwwirusową a V.R. 0,5 oznacza że stwierdzono zaledwie nieznaczna albo, że nie stwierdzono dostrzegalnej aktywności przeciwwirusowej. W poniższym zestawieniu wyników dla porównania podano wartości dla znanych środków przeciwwirusowych otrzymane za pomocą prób na pojedynczej warstwie komórek KB albo RK13 hodowanych na płytkach ze sztucznego tworzywa Microtest II (Falcon Plastics). Spośród wirusów użytych do wykonania prób typ 1 Herpes Labialis powoduje (zimne stany zapalne) Herpes-koratitis i Herpes Encephalitis. Typ 2 Herpes powoduje Herpes genitalis, rozpowszechnioną i zaraźliwą postać schodzenia narządów rodnych. Mycoma powoduje śmierć królików domowych i dzikich, poprzedzoną schorzeniem dróg oddechowych i silną opuchliną. Pseudorabies powoduje zaraźliwe porażenie rdzenia przedłużonego znane również u bydła, owiec, świń, psów i nurków, jako choroba „mad itch”. Wirus Parainfluenzy powoduje słabe zaatakowanie górnych dróg oddechowych u człowieka, zwłaszcza u małych dzieci, ma łączność z zapaleniem spojówek u bydła. Vaccinia jest niezjadliwą postacią

wirusa ospy i jest stosowana do szczepień ochronnych przeciw ospie. Stosowanie jej jest często związane z niepożądanymi działaniami ubocznymi. Ehino-Typ 13 jest jednym z wielu wirusów, powodujących zwykłe przeziębienie.

Wyżej podany związek 1 badano na królikach i chomikach. W dawkach nietoksycznych stwierdzono wyraźną aktywność przeciw Keratitis (Anti-HSV-Keratitislvtät). Związek ten przeciwdziała wyraźnie rozwojowi zmian występujących na zakażonych HSV ogonkach myszek, jeśli zostanie podany domięscowo w miejscu zakażenia. Związek ten badano również wobec wirusa Influenzy 12, Influenzy B i Parainfluenzy 1, przy czym stwierdzono bardzo wysoką jego aktywność przeciwwirusową. Jak wynika z tablicy 1 związek ten wykazuje znacznie szerszy zakres aktywności przeciwwirusowej, niż IDU, Ara-A, albo Ara-C. Oprócz wyżej wskazanej aktywności przeciwwirusowej amid kwasu 1-(β -D-rybofuranozylo)-1,4-triazolo-3-karboksylowego hamuje wzrost bakterii *Pseudomonas aeruginosa* oraz grzybków *Candida albicans* i *Cryptococcus digluents*.

Wszystkie związki od 1 do 6 wykazują niską cytotoksyczność i są rozpuszczalne w środowiskach wodnych.

Amid kwasu 1-(β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego wykazuje jeszcze interesującą aktywność przeciweguzową. Trzem grupom myszek C 57 Blk (6) po 6 myszek w każdej grupie) podano podskórnie Adenocarcinoma 755. Dwie grupy otrzymywały ten związek (100 mg/kg X 7 dni i 200 mg/kg X 7 dni) dootrzewnowo, podczas gdy trzecia grupa, służąca jako kontrolna, otrzymywała tylko roztwór soli. 16-dnia tak potraktowane zwierzęta wykazały 18% wzgl. 63 zahamowanie guza w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. W podobnych doświadczeniach myszkom DBA (2 zaszczepiono komórki Leukemii L-1210 (1×10^5 komórek na 1 zwierzę). Stwierdzono wzrost przeżywalności o 31% w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi po potraktowaniu tym związkiem (250 mg/kg X 7 dni). Jeżeli podawać ten związek w dawkach (250 mg/kg X 14 dni), to stwierdza się przeżycie 80% zwierząt (myszek), którym wszczepiono Ascites carsinema Ehrlicha. Dalej stwierdzono aktywność in vivo przeciwko Hepatoma-Novikoff.

Dalej stwierdzono, że sam amid kwasu 1,2,4-triazolo-3-karboksylowego wykazuje wyraźną aktywność przeciwwirusową. Zbadanie tego związku wyżej opisaną metodą daje dlań następujące wartości VR: wobec Herpes Typ 1 — 0,6, 1,0, Vaccinia — 0,8 i Parainfluenza 0,6, 0,6. Związek ten badany wobec wirusów Adano- i Rhino- typów 13 wykazuje odpowiednie następujące wartości przeciwwirusowe: 0,0, wzgl. 0,3.

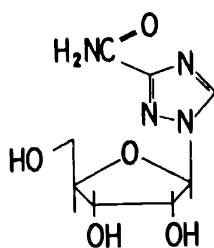
Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania nowych 3-podstawionych 1,2,4-triazolonukleozydów o wzorze 1, z n a m i e n n y t y m, że 3-podstawiony -1-(0-acylozablokowany- β -D-rybofuranozylo)-1,2,4-triazol o wzorze 2 w którym każdy z podstawników Ac oznacza grupę acylową, Y oznacza grupę cyjanową, poddaje się reakcji z amoniakiem, a następnie usuwa blokujące grupy acylowe przez zmydlenie.

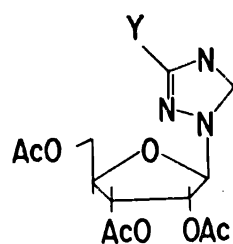
Tablica I

Porównanie aktywności przeciwwirusowej

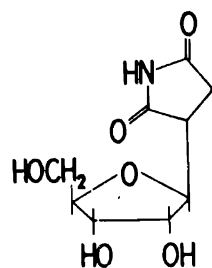
Nr związku	Wirus Herpes Typ 1	Wirus Herpes Typ 2	Wirus Myxoma	Wirus Pseudorabies	Wirus Vaccinia	Adeno wirus	Wirus Para influenzy	Rhino wirus Typ 13
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 Amid kwasu 1- β -D-rybofuranozylo/-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego	1,5 1,0 1,2		1,3 1,7	0,0,0,0	1,0,0,9	0,5	1,0,1,0 0,8	0,5
2 Sól amonowa 5'-fosforanu amidu kwasu 1- β -D-rybofuranozylo/-triazolo-3-karboksylowego	0,7 0,8	0,9	—	—	0,5	0,0	0,5	0,3
3 Amid kwasu 1- β -D-rybofuranozylo/-1,2,4-triazolo-3-tio-karboksylowego	1,0 0,5	—	0,2	0,3	0,0	0,0,0,0	0,1,0,2	
4 Amid kwasu 1- β -D-ksylofuranozylo/-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego	0,7 1,2	—	0,95	0,8	0,7	0,1	0,7,0,8	0,4,0,5
5 Chlorowodorek amidyny kwasu 1- β -D-rybofuranozylo/-1,2,4-triazolo-3-karboksylowego	0,8 1,0	—	1,1	0,6	—	0,1	0,7,0,8	0,6
6 Sól amonowa cyklicznego 3',5'-fosforanu-1- β -D-rybofuranozylo/1,2,4-triazolo-3-karboksylowego	0,65 0,8 1,4,1,0	—	0,7	0,5	—	0	0	0,6,0,5
7 5-IDU	1,6 1,2,1,1, 0,7— 1,1	1,8 0,8	0,8 0,6	0,6 0,4	1,3 0,8	0,2 0,2	0,0 0,1	0,0 0,1
8 Ara-C		0,6	0,8,0,8	0,6,1,1	0,7,0,9	0,0	0,1	0,1
9 Ara-A								



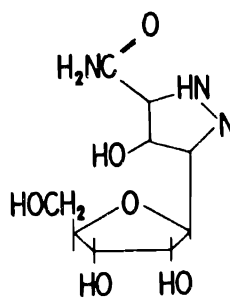
Wzór 1



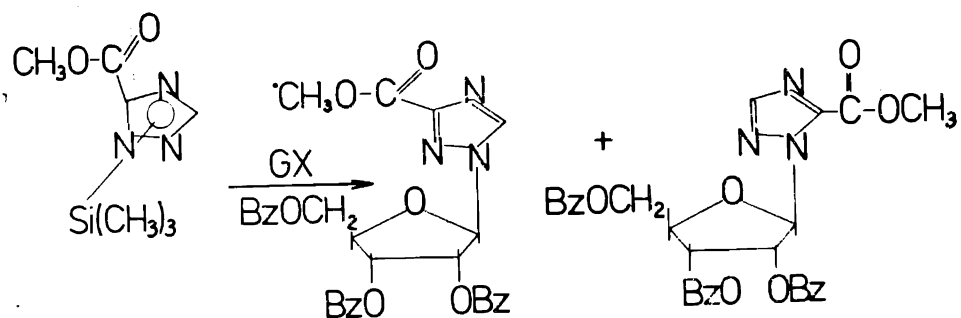
Wzór 2



Wzór 3

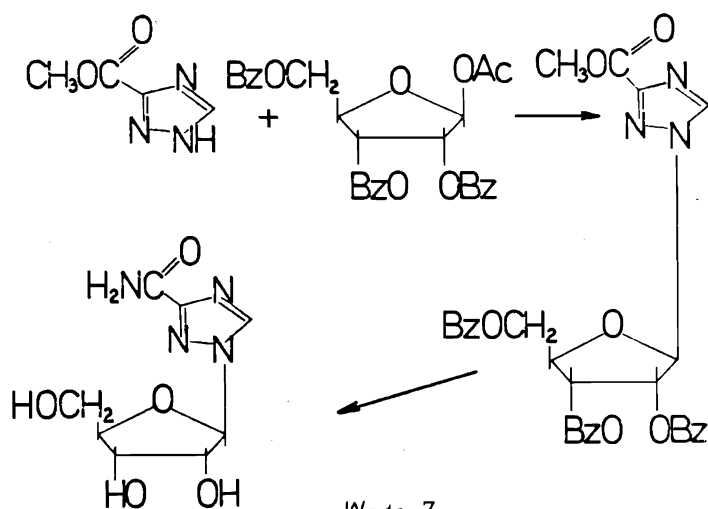


Wzór 4



Wzór 6

Schemat 1



Wzór 7
Schemat 2

