



(12) PATENT

(19) NO

(11) 334255

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

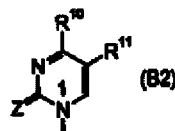
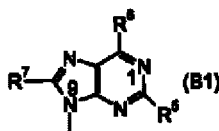
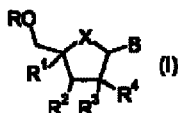
A61K 31/708 (2006.01)

C07H 19/06 (2006.01)

C07H 19/16 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20035524	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.06.07 PCT/EP2002/06256
(22)	Inng.dag	2003.12.11	(85)	Videreføringsdag	2003.12.11
(24)	Løpedag	2002.06.07	(30)	Prioritet	2001.06.12, GB, 0114286
(41)	Alm.tilgj	2003.12.18			
(45)	Meddelt	2014.01.20			
(73)	Innehaver	F Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, CH-4070 BASEL, Sveits John Herbert Merrett, 23 Bush Spring, Baldock, Hertfordshire SG7 6QT, England, Storbritannia Nobuo Shimma, 2-11-19, Higashikaigan-Manami, Chigasaki-shi, Kanagawa-ken 253-0054, Japan Rene Robert Devos, 4 Salmon Close, Welwyn Garden City, Hertfordshire AL7 1TR, England, Storbritannia Christopher John Hobbs, 9 Magnolia Close, Hertford, Hertfordshire SG13 7UR, England, Storbritannia Wen-Rong Jiang, 602 Teredo Drive, Redwood, CA 94065, USA Joseph Armstrong Martin, 350 Sharon Park Drive, Apartment I-26, US-CA94025 MENLO PARK, USA Isabel Najera, 49 Salisbury Avenue, St Albans, Hertfordshire AL1 4TZ, England, Storbritannia Takuo Tsukuda, 540-22, Rensyoji, Odawara-shi, Kanagawa-ken 250-0865, Japan			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Anvendelse av 4'-substituerte nukleosider for fremstilling av medikament for behandling av sykdommer mediert av Hepatitt C Virus (HCV)			
(56)	Anførte publikasjoner	JP 07-126282 A WO 99/43691 A1 US 3910885 A			
(57)	Sammendrag				



Foreliggende oppfinnelse angår anvendelse av nukleosid-derivater med formel (I) hvor B betyr en 9-purinyrest B1 med formel (B1) eller en 1-pyrimidyl-rest B2 med formel (B2) hvor symbolene er som definert i beskrivelsen, og av farmasøytisk akseptable salter derav; for behandling av sykdommer bevirket av Hepatitt C Virus (HCV), for fremstilling av et medikament for slik behandling og farmasøytiske preparater inneholdende slike forbindelser.

Oppfinnelsen angår anvendelse av 4'-substituerte nukleosider for fremstilling av medikament for behandling av sykdommer mediert av Hepatitt C Virus (HCV).

5 Hepatitt C virus er den dominerende årsak til kronisk leversykdom over hele verden. Pasienter infisert med HCV har risiko for å utvikle cirrhose i leveren og påfølgende hepatocellulært karsinom, og således er HCV hovedindikasjon for lever-transplantasjon. Bare to godkjente terapier er for tiden tilgjengelige for behandling av HCV-infeksjon (R. G. Gish, Sem. 10 Lever. Dis., 1999, 19, 35). Disse er interferon- α -monoterapi, og mer nylig, kombinasjonsterapi av nukleosidanalogen, ribavirin (Virazol), med interferon- α .

 Mange av medikamentene godkjent for behandling av virale infeksjoner er nukleosider eller nukleosid-analoger, og mesteparten av 15 disse nukleosid-analog- medikamenter hemmer viral replikasjon etter omdannelse til de tilsvarende trifosfater gjennom hemning av de virale polymerase-enzymene. Denne omdannelsen til trifosfatet blir vanligvis mediert av cellulære kinaser, og derfor blir den direkte evaluering av nukleosider som inhibitorer av HCV-replikasjon bare hensiktsmessig utført 20 ved anvendelse av en celle-basert måling. For HCV mangler tilgjengeligheten av en ekte celle-basert viralreplikasjonsmåling eller dyremodell for infeksjon.

 Hepatitt C virus tilhører til familien av Flaviridae. Den er en RNA-virus, idet RNA-genomet koder for et stort polyprotein som etter prosessering gir 25 det nødvendige replikasjonsmaskineri for å sikre syntese av avkom-RNA. Det er antatt ved mesteparten av de ikke-strukturelle proteiner kodet for av HCV RNA-genomet er involvert i RNA-replikasjon. Lohmann et al. [V. Lohmann et al., Science, 1999, 285, 110-113] har beskrevet konstruksjonen av en Human Hepatoma (Huh7) cellelinje hvor subgenomiske HCV RNA- 30 molekyler blir innført og vist å replikere med høy effektivitet. Det er antatt at mekanismen for RNA-replikasjon i disse cellelinjer er identisk med replikasjonen av full-lengde HCV RNA-genomet i infiserte hepatocytter. De

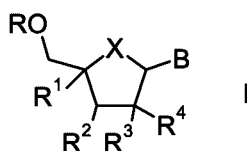
- 2 -

subgenomiske HCV cDNA-kloner som blir anvendt for isoleringen av disse cellelinjer har dannet basis for utviklingen av en celle-basert måling for å identifisere nukleosidanalogs-inhibitorer for HCV-replikasjon.

JP07126282 beskriver 4'-alkylsubstituerte tionukleosidderivater som kan anvendes for behandling av Hepatitt C Virus infeksjoner.

Forbindelsene med formel I er vist å være inhibitorer av subgenomisk Hepatitt C Virus replikasjon i en hepatomacellelinje. Disse forbindelser har potensiale til å være effektive som antiviral-medikamenter for behandling av HCV-infeksjoner hos mennesker.

Oppfinnelsen vedrører anvendelse av forbindelser med formel I



hvor

R er hydrogen eller $-\text{[P(O)(OH)-O]}_n\text{H}$ og n er 1, 2 eller 3;

R¹ er C₁₋₁₂ alkyl, C₂₋₇ alkenyl, C₂₋₇ alkynyl, halogenalkyl, alkylkarbonyl, alkoksykarbonyl, hydroksyalkyl, alkoksyalkyl, alkoksy, cyano, azido, hydroksyiminometyl, alkoksyiminometyl, halogen, alkylkarbonylamino, alkylaminokarbonyl, azidoalkyl, aminometyl, alkylaminometyl, dialkylaminometyl eller heterocyklyl;

R² er hydrogen, hydroksy, amino, C₁₋₁₂ alkyl, hydroksyalkyl, alkoksy, halogen, cyano eller azido;

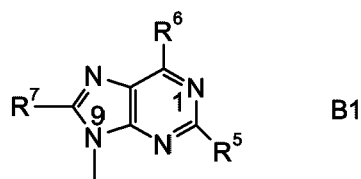
R³ og R⁴ er hydrogen, hydroksy, alkoksy, halogen eller hydroksyalkyl, forutsatt at minst én av R³ og R⁴ er hydrogen; eller

R³ og R⁴ sammen representerer $=\text{CH}_2$ eller $=\text{N-OH}$ eller

R³ og R⁴ begge representerer fluor;

B betyr en 9-purinyrest B1 med formel

- 3 -



hvor

R^5 er hydrogen, hydroksy, C_{1-12} alkyl, alkoksy, alkyltio, NHR^8 , halogen eller SH;

5 R^6 er hydroksy, NHR^8 , $NHOR^9$, $NHNR^8$, $-NHC(O)OR^9$ eller SH;

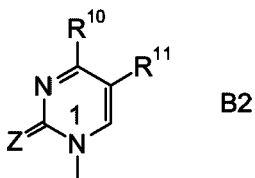
R^7 er hydrogen, hydroksy, C_{1-12} alkyl, alkoksy, alkyltio, NHR^8 , halogen, SH eller cyano;

10 R^8 er hydrogen, C_{1-12} alkyl, hydroksyalkyl, arylkarbonyl eller alkylkarbonyl;

R^9 er hydrogen eller C_{1-12} alkyl;

$R^{9'}$ er C_{1-12} alkyl; eller

B betyr en 1-pyrimidylrest B2 med formel



15 hvor

Z er O eller S;

R^{10} er hydroksy, NHR^8 , $NHOR^9$, $NHNR^8$, $-NHC(O)OR^9$ eller SH;

20 R^{11} er hydrogen, C_{1-12} alkyl, hydroksy, hydroksyalkyl, alkoksyalkyl, halogenalkyl eller halogen;

R^8 R^9 og $R^{9'}$ er som definert ovenfor;

og av farmasøytisk akseptable salter derav; for fremstilling av et medikament for behandling av sykdommer mediert av Hepatitt C Virus (HCV).

25

I forbindelser hvor R er en fosfatgruppe $-[P(O)(OH)-O]_nH$ er n fortrinnsvis 1.

Om ikke definert på andre måter i kravene gjelder følgende definisjoner.

5 Betegnelsen "alkyl" som blir anvendt her betyr en lineær eller forgrenet hydrokarbonrest inneholdende 1 til 12 karbonatomer. Fortrinnsvis betyr betegnelsen "alkyl" en lineær eller forgrenet hydrokarbonrest inneholdende 1 til 7 karbonatomer. Mest foretrukket er metyl, etyl, propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, tert.-butyl eller pentyl. Alkylen kan være usubstituert eller substituert. Substituentene er valgt fra én eller flere av cykloalkyl, nitro, amino, alkylamino, dialkylamino, alkylkarbonyl og
10 cykloalkylkarbonyl.

 Betegnelsen "cykloalkyl" som anvendes her betyr en eventuelt substituert cykloalkylgruppe inneholdende 3 til 7 karbonatomer, f.eks. cyklopropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cykloheksyl eller cykloheptyl.

15 Betegnelsen "alkoksy" som anvendes her betyr en eventuelt substituert lineær eller forgrenet alkyloksygruppe hvor "alkyl" delen er som definert ovenfor så som metoksy, etoksy, n-propyloksy, i-propyloksy, n-butyloksy, i-butyloksy, tert. -butyloksy, pentyloksy, heksyloksy, heptyloksy omfattende deres isomerer.

20 Betegnelsen "alkoksyalkyl" som anvendes her betyr en alkoksygruppe som definert ovenfor som er bundet til en alkylgruppe som definert ovenfor. Eksempler er metoksymetyl, metoksyetyl, metoksypropyl, etoksymetyl, etoksyetyl, etoksypropyl, propyloksypropyl, metoksybutyl, etoksybutyl, propyloksybutyl, butyloksybutyl, tert. butyloksybutyl, metoksypentyl, etoksypentyl, propyloksypentyl omfattende deres isomerer.

25 Betegnelsen "alkenyl" som anvendes her betyr en usubstituert eller substituert hydrokarbonkjederest som har fra 2 til 7 karbonatomer, fortrinnsvis fra 2 til 4 karbonatomer, og som har én eller to olefiniske dobbeltbindinger, fortrinnsvis én olefinisk dobbeltbinding. Eksempler er vinyl, 1-propenyl, 2-propenyl (allyl) eller 2-butenyl (krotyl).

30 Betegnelsen "alkynyl" som anvendes her betyr usubstituert eller substituert hydrokarbonkjederest som har fra 2 til 7 karbonatomer,

fortrinnsvis 2 til 4 karbonatomer, og som har én eller hvor mulig to trippelbindinger, fortrinnsvis én trippelbinding. Eksempler er etynyl, 1-propynyl, 2-propynyl, 1-butylnyl, 2-butylnyl eller 3-butylnyl.

5 Betegnelsen "hydroksyalkyl" som anvendes her betyr en lineær eller forgrenet alkylgruppe som definert ovenfor hvor 1, 2, 3 eller flere hydrogenatomer er substituert med en hydroksygruppe. Eksempler er hydroksymetyl, 1-hydroksyetyl, 2-hydroksyetyl, 1-hydroksypropyl, 2-hydroksypropyl, 3-hydroksypropyl, hydroksyisopropyl, hydroksybutyl.

10 Betegnelsen "halogenalkyl" som anvendes her betyr en lineær eller forgrenet alkylgruppe som definert ovenfor hvor 1, 2, 3 eller flere hydrogenatomer er substituert med et halogen. Eksempler er 1-fluormetyl, 1-klormetyl, 1-brommetyl, 1-iodmetyl, trifluormetyl, triklormetyl, tribrommetyl, triiodmetyl, 1-fluoretyl, 1-kloretyl, 1-brometyl, 1-iodetyl, 2-fluoretyl, 2-kloretyl, 2-brometyl, 2-iodetyl, 2,2-dikloretyl, 3-brompropyl eller 2,2,2-trifluoretyl.

 Betegnelsen "alkyltio" som anvendes her betyr en lineær eller forgrenet (alkyl)S-gruppe hvor "alkyl" delen er som definert ovenfor. Eksempler er metyltio, etyltio, n-propyltio, i-propyltio, n-butylio, i-butylio eller tert.-butyltio.

20 Betegnelsen "aryl" som anvendes her betyr en eventuelt substituert fenyl og naftyl (f.eks. 1-naftyl, 2-naftyl eller 3-naftyl). Egnede substituerter for aryl kan velges fra dem som er angitt for alkyl, i tillegg kommer imidlertid halogen, hydroksy og eventuelt substituert alkyl, halogenalkyl, alkenyl, alkynyl og aryloksy substituerter som kan tilføyes seleksjonen.

25 Betegnelsen "heterocyklyl" som anvendes her betyr eventuelt substituerte mettete, delvis umettete eller aromatiske monocykliske, bicykliske eller tricykliske heterocykliske systemer som inneholder ett eller flere heteroatomer valgt fra nitrogen, oksygen og svovel, som også kan være kondensert til en eventuelt substituert mettete, delvis umettete eller
30 aromatisk monocyklisk karbocyklus eller heterocyklus.

Eksempler på egnede heterocykler er oksazolyl, isoksazolyl, furyl, tetrahydrofuryl, 1,3-dioksolanyl, dihydropyranyl, 2-tienyl, 3-tienyl, pyrazinyl, isotiazolyl, dihydroooksazolyl, pyrimidinyl, tetrazolyl, 1-pyrrolidinyl, 2-pyrrolidinyl, 3-pyrrolidinyl, pyrrolidinonyl, (N-oksyd)-pyridinyl, 1-pyrrolyl, 2-pyrrolyl, triazolyl, f. eks. 1,2,3-triazolyl eller 1,2,4-triazolyl, 1-pyrazolyl, 2-pyrazolyl, 4-pyrazolyl, piperidinyl, morfolinyl (f. eks. 4-morfolinyl), tiomorfolinyl (f. eks. 4-tiomorfolinyl), tiazolyl, pyridinyl, dihydrotiazolyl, imidazolidinyl, pyrazolinyl, piperazinyl, 1-imidazolyl, 2-imidazolyl, 4-imidazolyl, tiadiazolyl, f.eks. 1,2,3-tiadiazolyl, 4-metyl piperazinyl, 4-hydroksypiperidin-1-yl.

Egnede substituenten for heterocyklyl kan velges fra dem som er angitt for alkyl, i tillegg kommer imidlertid eventuelt substituert alkyl, alkenyl, alkynyl, en oksogruppe (=O) eller aminosulfonyl, hvilke er substituenten som kan tilføyes seleksjonen.

Betegnelsen "acyl" ("alkylkarbonyl") som anvendes her betyr en gruppe med formel $C(=O)R$ hvor R er hydrogen, en usubstituert eller substituert lineær eller forgrenet hydrokarbonrest inneholdende 1 til 7 karbonatomer eller en fenylgruppe. Mest foretrukne acylgrupper er de hvor R er hydrogen, en usubstituert lineær eller forgrenet hydrokarbonrest inneholdende 1 til 4 karbonatomer eller en fenylgruppe.

Betegnelsen halogen står for fluor, klor, brom eller iod, foretrukket er fluor, klor, brom.

Innen oppfinnelsen betegnelsen "Z" representerer O eller S, fortrinnsvis O.

I strukturformlene for forbindelsene angitt gjennom hele denne søknaden angir en fortykket avsmalnende linje (**—**) en substituent som sitter ovenfor planet til ringen som det asymmetriske karbon tilhører, og en prikket linje (.....) angir en substituent som sitter nedenfor planet til ringen som det asymmetriske karbonet tilhører.

Forbindelser med formel I viser stereoisomeri. Disse forbindelser kan være hvilken som helst isomer av forbindelsen med formel I eller

blandinger av disse isomerer. Forbindelsene og mellomproduktene ifølge foreliggende oppfinnelse som har ett eller flere asymmetriske karbonatomer, kan oppnås som racemiske blandinger av stereoisomerer som kan spaltes.

5 Forbindelser med formel I viser tautomeri, hvilket betyr at forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan foreligge som to eller flere kjemiske forbindelser som lett kan omdannes seg imellom. I mange tilfeller betyr det bare utveksling av et hydrogenatom mellom to andre atomer, hvor det danner en kovalent binding til begge. Tautomere
10 forbindelser foreligger i en mobil likevekt med hverandre, slik at forsøk på å fremstille de separate substanser vanligvis fører til dannelsen av en blanding som viser alle de kjemiske og fysikalske egenskaper som forventes på grunnlag av strukturene til komponentene.

15 Den mest vanlige form for tautomeri er den som involverer karbonyl- eller ketoforbindelser og umettete hydroksylforbindelser eller enoler. Den strukturelle forandring er forskyvningen av et hydrogenatom mellom fra karbon- og oksygen- atomer under omleiring av bindinger. For eksempel er i mange alifatiske aldehyder og ketoner, så som acetaldehyd, ketoformen den dominerende; i fenoler er enolformen hovedkomponenten.

20 Forbindelser med formel I som er basiske kan danne farmasøytisk akseptable salter med uorganiske syrer så som hydrohalogensyrer (f.eks. saltsyre og bromhydrogensyre), svovelsyre, salpetersyre og fosforsyre og med organiske syrer (f.eks. med eddiksyre, vinsyre, ravsyre, fumarsyre, maleinsyre, eplesyre, salicylsyre, sitronsyre, metansulfonsyre og p-
25 toluensulfonsyre). Dannelsen og isoleringen av slike salter kan utføres i henhold til metoder som er kjente på området.

Foretrukket er anvendelse av forbindelser med formel I, hvor

R er hydrogen;

R¹ er C₁₋₁₂ alkyl, C₂₋₇ alkenyl, C₂₋₇ alkynyl,, halogenalkyl,
30 alkylkarbonyl, alkoksy, hydroksymetyl, cyano, azido, alkoksyiminometyl, alkylkarbonylamino, alkylaminometyl eller dialkylaminometyl;

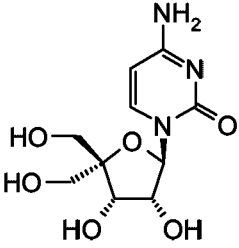
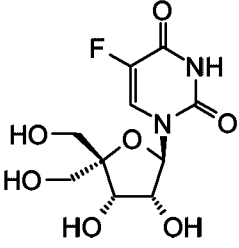
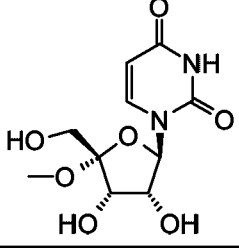
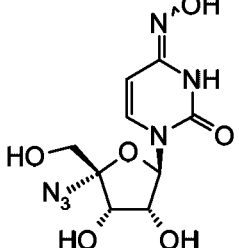
- 8 -

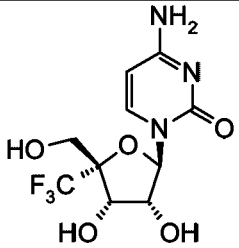
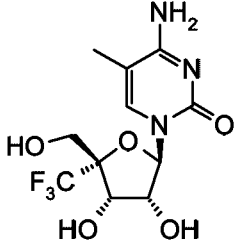
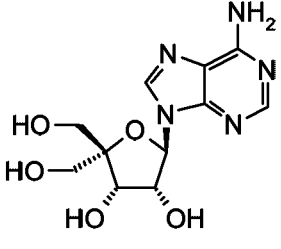
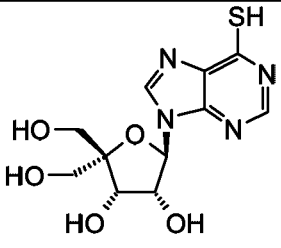
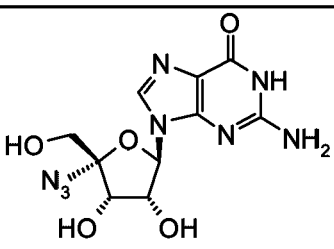
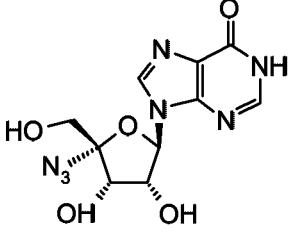
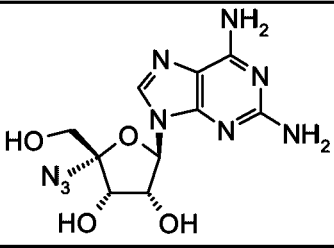
R^2 er hydrogen, hydroksy, alkoksy eller halogen;
 R^3 og R^4 er hydrogen, hydroksy, alkoksy, halogen eller hydroksyalkyl, forutsatt at minst én av R^3 og R^4 er hydrogen; eller

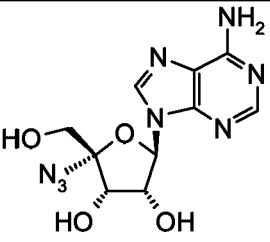
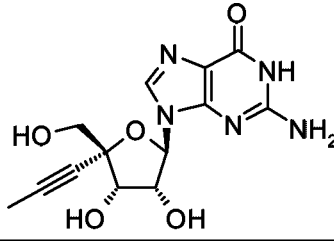
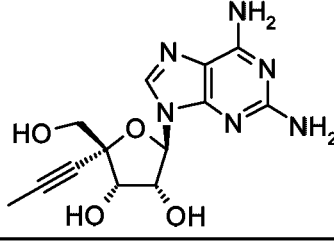
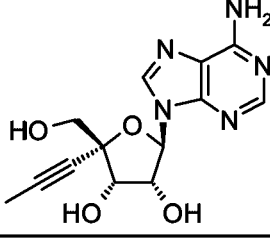
5 R^3 og R^4 representerer fluor; og

B betyr en 9-purinyrest B1 eller en 1-pyrimidylrest B2 som definert ovenfor.

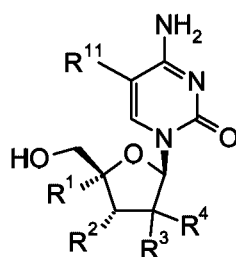
Eksempler på foretrukne forbindelser er oppført nedenfor

Forbindelse nr.	STRUKTUR	Navn
forbindelse 6		4'-C-(hydroksymetyl)cytidin
forbindelse 7		5-fluor-4'-C-(hydroksymetyl)-uridin
forbindelse 8		4'-C-metoksyuridin
forbindelse 10		(E og/eller Z)-4'-C-azidouridin-4-oxsim

forbindelse 11		4'-C-(trifluormetyl)cytidin
forbindelse 12		4'-C-(trifluormetyl)-5-metylcytidin
forbindelse 14		4'-C-(hydroksymetyl)adenosin
forbindelse 15		9-[4-C-(hydroksymetyl)-beta-D-ribofuranosyl]-6-merkaptopurin
forbindelse 16		4'-C-azidoguanosin
forbindelse 16-1		4'-C-azidoinosin (9-(5-azido-3,4-dihydroksy-5-hydroksymetyl-tetrahydro-furan-2-yl)-1,9-dihydro-purin-6-on)
forbindelse 17		2-amino-4'-C-azidoadenosin

forbindelse 18		4'-C-azidoadenosin
forbindelse 19		4'-C-(1-propynyl)guanosin
forbindelse 20		2-amino-4'-C-(1-propynyl)-adenosin
forbindelse 21		4'-C-(1-propynyl)adenosin

En spesielt foretrukket gruppe forbindelser for behandling av HCV er de med formel I-a



I-a

5

hvor

 R^1

er C_{1-12} alkyl, C_{2-7} alkenyl, C_{2-7} alkynyl, halogenalkyl, alkylkarbonyl, alkoksy, hydroksymetyl, cyano, azido, alkoksyiminometyl, alkylkarbonylamino, alkylaminometyl eller dialkylaminometyl;

10

 R^2

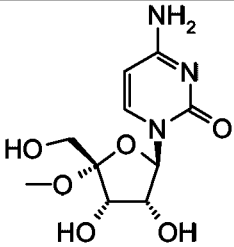
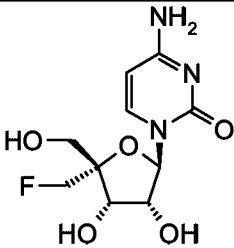
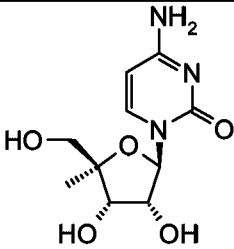
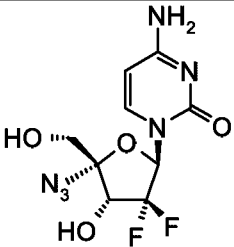
er hydrogen, hydroksy, alkoksy eller halogen;

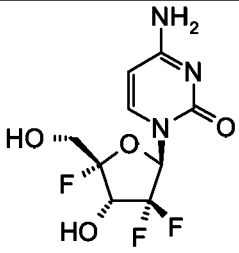
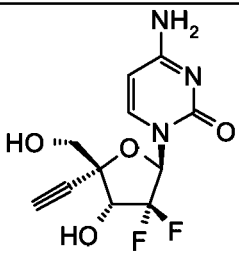
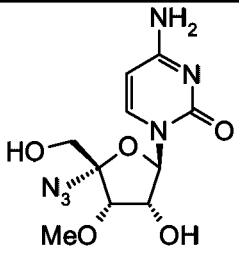
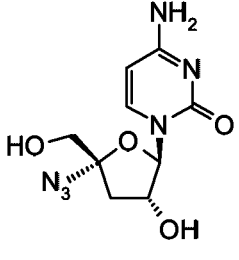
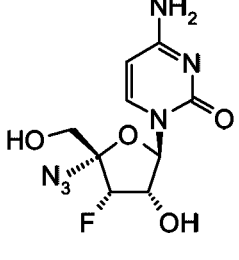
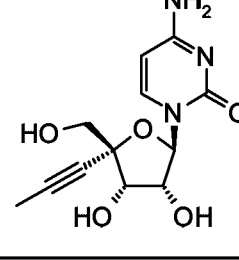
R^3 og R^4 er hydrogen, hydroksy, alkoksy, halogen eller hydroksyalkyl, forutsatt at minst én av R^3 og R^4 er hydrogen; eller

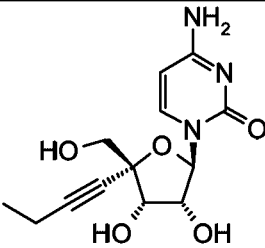
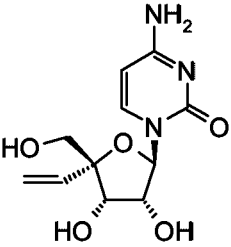
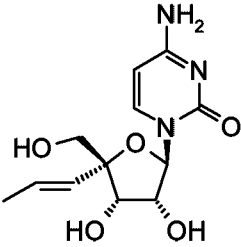
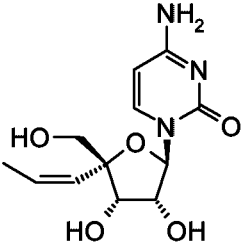
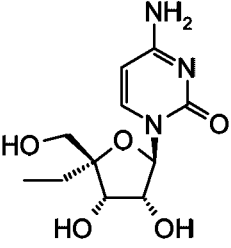
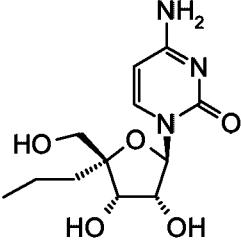
R^3 og R^4 representerer fluor.

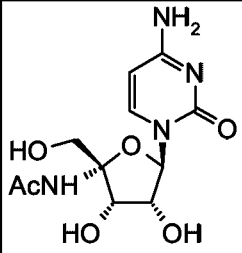
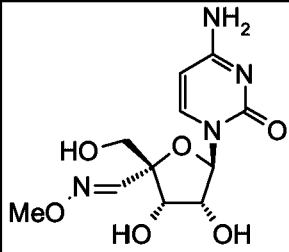
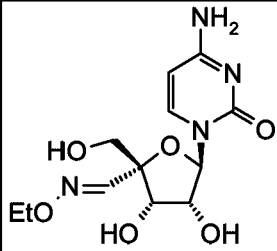
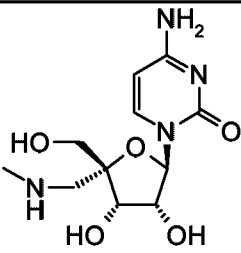
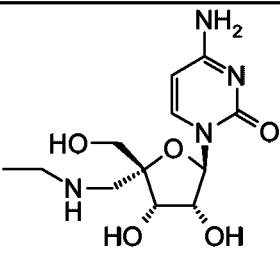
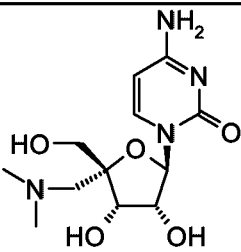
5 og farmasøytisk akseptable salter.

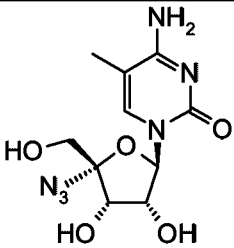
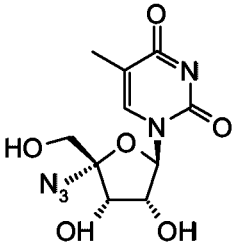
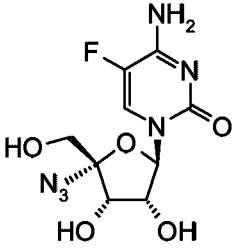
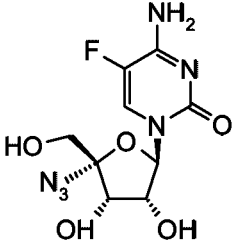
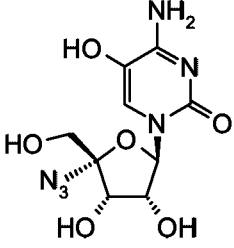
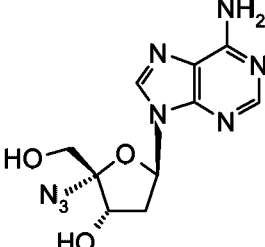
Eksempler på slike spesielt foretrukne forbindelser er oppført nedenfor

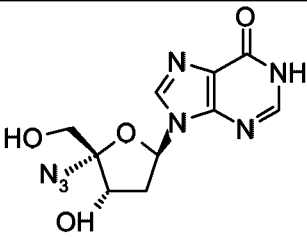
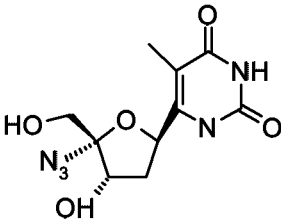
Forbindelse nr.	Struktur	Navn
forbindelse 9		4'-C-metoxycytidin
forbindelse 22		4'-C-(fluormetyl)cytidin
forbindelse 23		4'-C-methylcytidin
forbindelse 24		4'-C-azido-2'-deoksy-2',2'-difluorcytidin

forbindelse 25		2'-deoksy-4'-C-fluor-2',2'-difluorcytidin
forbindelse 26		2'-deoksy-4'-C-etynyl-2',2'-difluorcytidin
forbindelse 27		4'-C-azido-3'-O-metylcytidin
forbindelse 28		4'-C-azido-3'-deoksyctidin
forbindelse 29		4'-C-azido-3'-deoksy-3'-fluorcytidin
forbindelse 30		4'-C-(1-propynyl)cytidin

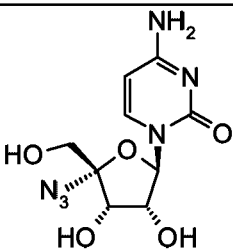
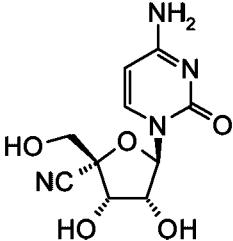
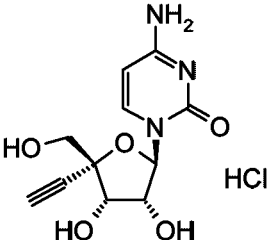
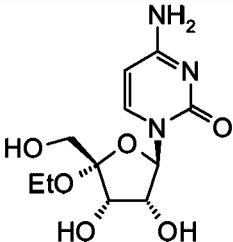
forbindelse 31		4'-C-(1-butynyl)cytidin
forbindelse 32		4'-C-vinylcytidin
forbindelse 33		(E)-4'-C-(1-propenyl)cytidin
forbindelse 34		(Z)-4'-C-(1-propenyl)cytidin
forbindelse 35		4'-C-ethylcytidin
forbindelse 36		4'-C-propylcytidin

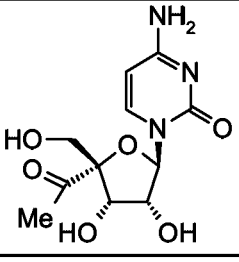
forbindelse 37		4'-C-acetamidocytidin
forbindelse 38		(E)-4'-C-(metoksyimino)cytidin
forbindelse 39		(E)-4'-C-(etoksyimino)cytidin
forbindelse 40		4'-C-[(metylamino)metyl]cytidin
forbindelse 41		4'-C-[(etylamo)metyl]cytidin
forbindelse 42		4'-C-[(dimetylamino)metyl]cytidin

forbindelse 43		4'-C-azido-5-metylcytidin
forbindelse 43-1		4'-C-azido-5-metyluridin
forbindelse 44		4'-C-azido-5-fluorocytidin
forbindelse 44-1		4'-C-azido-5-fluoruridin
forbindelse 45		4'-C-azido-5-hydroksycytidin
forbindelse 46		4'-azido-2'-deoksyadenosin

forbindelse 47		4'-C-azido-2'-deoksyinosin
forbindelse 48		4'-C-azido-5-metyluridin

Mest foretrukne forbindelser for behandling av HCV er oppført nedenfor:

Forbindelse nr.	Struktur	Navn
forbindelse 1 (Eksempel 1)		4'-C-azidocytidin
forbindelse 2 (Eksempel 2)		4'-C-cyanocytidin
forbindelse 3 (Eksempel 3)		4'-C-etylnylcytidin-hydroklorid (1:1)
forbindelse 4		4'-C-etoksycytidin

forbindelse 5		4'-C-acetylcytidin
---------------	---	--------------------

Forbindelsene med formel I kan fremstilles ved forskjellige metoder kjent på området organisk kjemi generelt og nukleosidanalogsyntese spesielt. Utgangsmaterialene for syntesene er enten lett tilgjengelige fra kommersielle kilder eller er kjente eller kan selv fremstilles ved teknikker som er kjente på området. Generelle oversikter for fremstilling av nukleosidanalogs foreligger i de følgende publikasjoner:

A M Michelson "The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides", Academic Press, New York 1963.

L Goodman "Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry" Ed P O P Ts'O, Academic Press, New York 1974, bd. 1, kapitel 2.

"Synthetic Procedures in Nucleic acid Chemistry" Ed W W Zorbach og R S Tipson, Wiley, New York, 1973, bd. 1 og 2.

Syntesen av karbocyliske nukleosider er sammenfattet av L Agrofoglio *et al*, Tetrahedron, 1994, 50, 10611.

Strategiene som er tilgjengelige for syntesen av forbindelser med formel I omfatter:

1. modifikasjon eller innbyrdes omdannelse av frembrakte nukleosider; eller

2. konstruksjon av den heterocykliske base etter glykosylering; eller

3. kondensering av et beskyttet furanose-derivat med en pyrimidin- (B2) eller purin(B1)base.

Disse metoder vil bli ytterligere beskrevet nedenfor:

1. Modifikasjon eller innbyrdes omdannelse av frembrakte nukleosider.

Slike metoder omfatter på den ene side modifikasjon av 9-purinyll- eller 1-pyrimidylresten eller på den annen side modifikasjon av karbohydratgruppen.

A. Modifikasjon av purinyl- eller pyrimidylgruppen:

- 5 a) Deaminering av aminopurin- eller aminopyrimidinnukleosider som beskrevet av J. R. Tittensor og R. T. Walker European Polymer J., 1968, 4, 39 og H. Hayatsu, Progress in Nukleic Acid Research and Molecular Biology 1976, bd. 16, s. 75.
- 10 b) Omdannelsen av 4-hydroksygruppen i 4-hydroksypyrimidinnukleosider til en utgående gruppe og fortrenkning med nukleofile reagenser. Slike utgående grupper omfatter halogen som beskrevet av J. Brokes og J. Beranek, Col. Czech. Chem. Comm., 1974, 39, 3100 eller 1,2,4-triazol som beskrevet av K. J. Divakar og C. B. Reece, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1982, 1171.
- 15 c) 5-Substitusjon av pyrimidinnukleosider blir oppnådd ved anvendelse av 5-metalloderivater så som 5-mercuri eller 5-palladium, for eksempel som beskrevet av D. E. Bergstrom and J. L. Ruth J. Amer. Chem. Soc., 1976, 98, 1587. Innføring av fluor i 5-stillingen til pyrimidinnukleosider kan oppnås med reagenser så som trifluormetylhypofluorit som beskrevet av M. J. Robins, Ann New York Acad. Sci. 1975, 255, 104.
- 20 d) Modifiserte purinnukleosider kan fremstilles fra de tilsvarende purinnukleosid- derivater hvor 2-, 6- eller 8-substituenten er en egnet utgående gruppe så som halogen eller sulfonat eller 1,3,4-triazol. 6-substituerte purinnukleosider kan fremstilles ved behandling av de tilsvarende 6-halogenpurin- eller 6-(1,2,4-triazol-4-yl)-
- 25 purinnukleosidderivater med det tilsvarende nukleofile reagens som beskrevet av V. Nair and A. J. Fassbender Tetrahedron, 1993, 49, 2169 og av V. Samano, R. W. Miles and M. J. Robins, J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 9331.
- 30 Liknende kan 8-substituerte purinnukleosider fremstilles ved behandling av det tilsvarende 8-halogenpurinnukleosid med det tilsvarende nukleofile reagens som beskrevet av L. Tai-Shun, C. Jia-Chong, I. Kimiko og A. C.

Sartorelli, J. Med. Chem., 1985, 28, 1481; Nandanan *et al*, J. Med. Chem., 1999, 42, 1625; J. Jansons, Y. Maurinsh og M. Lidaks, Nucleosides Nucleotides, 1995, 14, 1709. Innføring av en 8-cyanosubstituent kan oppnås ved fortrenkning ved anvendelse av et metall- cyanid som beskrevet av L-L. Gundersen, Acta. Chem. Scand. 1996, 50, 58. 2-modifisert purinnukleosid kan fremstilles på lignende måte som beskrevet av T. Steinbrecher, C. Wamelunge, F. Oesch og A. Seidl, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1993, 32, 404.

e) Hvor substituenten i 2- eller 8-stilling i purinnukleosidet blir bundet via en karbon-karbonbinding, f. eks. alkyl, og deretter kan metallkatalyserte krysskoblings- prosedyrer anvendes ved å starte med den tilsvarende 2 eller 8-halogensubstituerte purinnukleosidanalogue som beskrevet av A. A. Van Aerschott, *et al*, J. Med. Chem., 1993, 36, 2938; V.Nair og G.S. Buenger, J.Am.Chem.Soc., 1989, 111(22), 8502; C. Tu, C. Kean og B. E. Eaton Nucleosides Nucleotides, 1995, 14, 1631.

B. Modifikasjon av karbohydratresten:

Etter innføring av beskyttelsesgrupper som er kompatible med de videre kjemi:

- Azid kan innføres i 4'-stillingen ved behandling av 4',5'-

didehydronukleosidet med iodazid som eksemplifisert av H.Maag *et al*, J. Med.Chem., 1992, 35, 1440. Et alkoksyd kan innføres i 4'-stillingen ved behandling av 4',5'-didehydro- nukleosidet med iod fulgt av en alkohol og blykarbonat som eksemplifisert av J.P.Verheyden og J.G.Moffatt, J.Am.Chem.Soc., 1975, 97(15), 4386. Fluorid kan innføres i 4'-stillingen ved behandling av 4',5'-didehydronukleosidet med iod fulgt av sølv(I)fluorid som beskrevet av G. R. Owen *et al*, J. Org. Chem., 1976, 41(8), 3010 eller A. Maguire *et al*, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1993, 1(15), 1795. En 4'-formylgruppe kan innføres og deretter omdannes til en lang rekke av substituenten omfattende, men ikke begrenset til 4'-halogenalkyl, 4'-etynyl, 4'-oksiminometyl og 4'-cyano som eksemplifisert ved M. Nomura *et al*, J. Med. Chem., 1999, 42, 2901.

- 20 -

- Modifikasjon av enten 2'-hydroksysubstituenten eller 3'-hydroksysubstituenten i nukleosidanalogen er mulig.

- Omdannelse av 3-hydroksy til en utgående gruppe så som halogen ved omsetning med for eksempel trifenylfosfin og et tetrahalogenalkan som beskrevet for eksempel av L. De Napoli *et al*, Nucleosides Nucleotides, 1993, 12, 981, fulgt av reduksjon gir 3-deoksysukkerderivater som beskrevet av D. G. Norman og C. B. Reese, Synthesis 1983, 304.

- Derivatisering av 3-hydroksygruppen ved omdannelse til en triflatgruppe fulgt av reduksjon ved anvendelse av natriumborhydrid som beskrevet av S. A. Surzhykov *et al*, Nucleosides Nucleotides, 1994, 13(10), 2283.

Direkte innføring av en fluor- substituent kan gjennomføres med fluoreringsmidler så som dietylaminosulfur- trifluorid som beskrevet av P. Herdewijn, A. Van Aerschot og L. Kerremans, Nucleosides Nucleotides, 1989, 8, 65.

- Omdannelse av hydroksysubstituenten til en utgående gruppe så som halogen eller sulfonat muliggjør også fortrenkning ved anvendelse av nukleofile reagenser så som tetrabutylammoniumfluorid, litiumazid eller metallcyanider som eksemplifisert av H. Hrebabecky, A. Holy og E. de Clercq, Collect. Czech. Chem. Comm. 1990, 55, 1800; K. E. B. Parkes og K. Taylor, Tet. Lett., 1988, 29, 2995; H. M. Pfundheller *et al*, Helv. Chim. Acta, 2000, 83, 128.

- Omsetning av 2'-ketonukleosider med fluoreringsmidler så som dietylamino- svoveltrifluorid kan anvendes for å fremstille 2',2'-difluornukleosider som beskrevet av D. Bergstrom, E. Romo og P. Shum Nucleosides Nucleotides, 1987, 6, 53.

2. Konstruksjon av den heterocykliske base etter glykosylering.

a) Slike som for eksempel anvender furanosylaminderivater som beskrevet av N. J. Cusack, B. J. Hildick, D. H. Robinson, P. W. Rugg og G. Shaw J. Chem. Soc. Perkin Trans., I 1973, 1720 eller G. Shaw, R. N. Warrener, M. H. Maguire og R. K. Ralph, J. Chem. Soc., 1958, 2294.

b) Slike som anvender for eksempel furanosylureaer for pyrimidinnukleosidsyntese som beskrevet av J. Šmejkal, J. Farkas og F. Šorm, Coll. Czech. Chem. Comm., 1966, 31, 291.

c) fremstilling av purinnukleosider fra imidazolnukleosider er sammenfattet av L. B. Townsend, Chem. Rev., 1967, 67, 533.

3. Kondensering av et beskyttet furanose- derivat med et purin- eller pyrimidin-derivat.

Kondenseringsreaksjonen av et beskyttet furanose-derivat med et tilsvarende purin- eller pyrimidin-derivat kan utføres ved anvendelse av standardmetoder omfattende anvendelse av en Lewis-syre- katalysator så som kvikksølv(II)bromid eller tinn(IV)klorid eller trimetylsilyltrifluormetansulfonat i løsningsmidler så som acetonitril, 1,2-dikloretan, diklormetan, kloroform eller toluen ved redusert, omgivelses- eller forhøyet temperatur. Eksempler på kondenseringsreaksjonen av en beskyttet furanose

- med tungmetall-derivater av puriner eller pyrimidiner derivater (f. eks. klorkvikksølv-derivater) er beskrevet av J Davoll og B. A. Lowry, J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 1650; J. J. Fox, N. Yung, J. Davoll og G. B. Brun, J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 2117.
- Med alkoksypyrimidiner er beskrevet av K. A. Watanabe, D. H. Hollenberg og J. J. Fox., Carbohydrates, Nucleosides and Nucleotides. 1974, 1,1.
- Med silyl-derivater av puriner eller pyrimidiner som beskrevet av U. Niedballa og H. Vorbruggen, J. Org. Chem., 1976, 41, 2084; U. Niedballa og H. Vorbruggen, J. Org. Chem., 1974, 39, 3672. A. J. Hubbard, A. S. Jones og R. T. Walker, Nucleic Acids Res., 1984, 12, 6827.

Videre

- fusjonen av per-acylerte sukkere med puriner under vakuum i nærvær av p-toluen-sulfonsyre er beskrevet av T. Simadat, Y. Ishudo og T. Sato, Chem. Abs., 1962, 56, 11 692 og W. Pfeleiderer, R. K. Robins, Chem. Ber. 1965, 98, 1511.

- Kondenseringsreaksjonene er beskrevet av K. A. Watanabe, D. H. Hollenberg og J. J. Fox, Carbohydrates, Nucleosides and Nucleotides, 1974, 1,1.

5 Slike metoder resulterer ofte i blandinger av anomere nukleosid-derivater som kan separeres ved standardteknikker kjent på området så som omkrystallisering, kolonnekromatografi, høy-ytelsesvæskekromatografi eller superkritisk fluidkromatografi.

10 Purin-derivatene og pyrimidin-derivatene for kondenseringsreaksjoner ovenfor kan fåes kommersielt eller kan fremstilles ved prosedyrer kjent på området.

Fremstilling av purin-derivater er sammenfattet av G. Shaw i "Comprehensive Heterocyclic Chemistry" publ. Pergamon Press bd. 5 kapitel 4. 09, s. 499 og "Comprehensive Heterocyclic Chemistry II" publ. Pergamon Press, bd 7, kapitel 7. 11, s. 397.

15 Fremstilling av pyrimidin-derivater er sammenfattet av D. J. Brown i "The Chemistry of Heterocyclic Compounds – The Pyrimidines" 1962 og Supplement 1, 1970, pub John Wiley and Sons, New York, av D. J. Brown i "Comprehensive Heterocyclic Chemistry" pub Pergamon Press bd. 5 kapitel 4. 09, s. 499 og by K. Undheim og T. Benneche i "Comprehensive Heterocyclic Chemistry II" pub Pergamon Press bd. 6 kapitel 6. 02 s. 93.

Furanose-derivater kan fremstilles fra kommersielt tilgjengelige karbohydrat- utgangsmaterialer så som D-formene av ribose, arabinose, xylose eller lyxose, etter innføring av beskyttelsesgrupper som er kompatible med kjemien.

25 4-Substituerte furanoser med substituenten som inneholder et karbon bundet til 4-stillingen i furanosen, for eksempel alkyl, alkenyl, alkynyl, halogenalkyl, acyl, alkoksykarbonyl, hydroksyalkyl, alkoksyalkyl, cyano, oximinometyl, alkoksyiminometyl, alkylaminokarbonyl og acyl, kan fremstilles fra den tilsvarende 4-formyl-furanose. Fremstilling av én slik 4-formylfuranose er beskrevet av H. Ohruai *et al.*, J. Med. Chem., 2000, 43, 30 5416. 4-Halogenalkyl-furanoser kan fremstilles fra de tilsvarende 4-

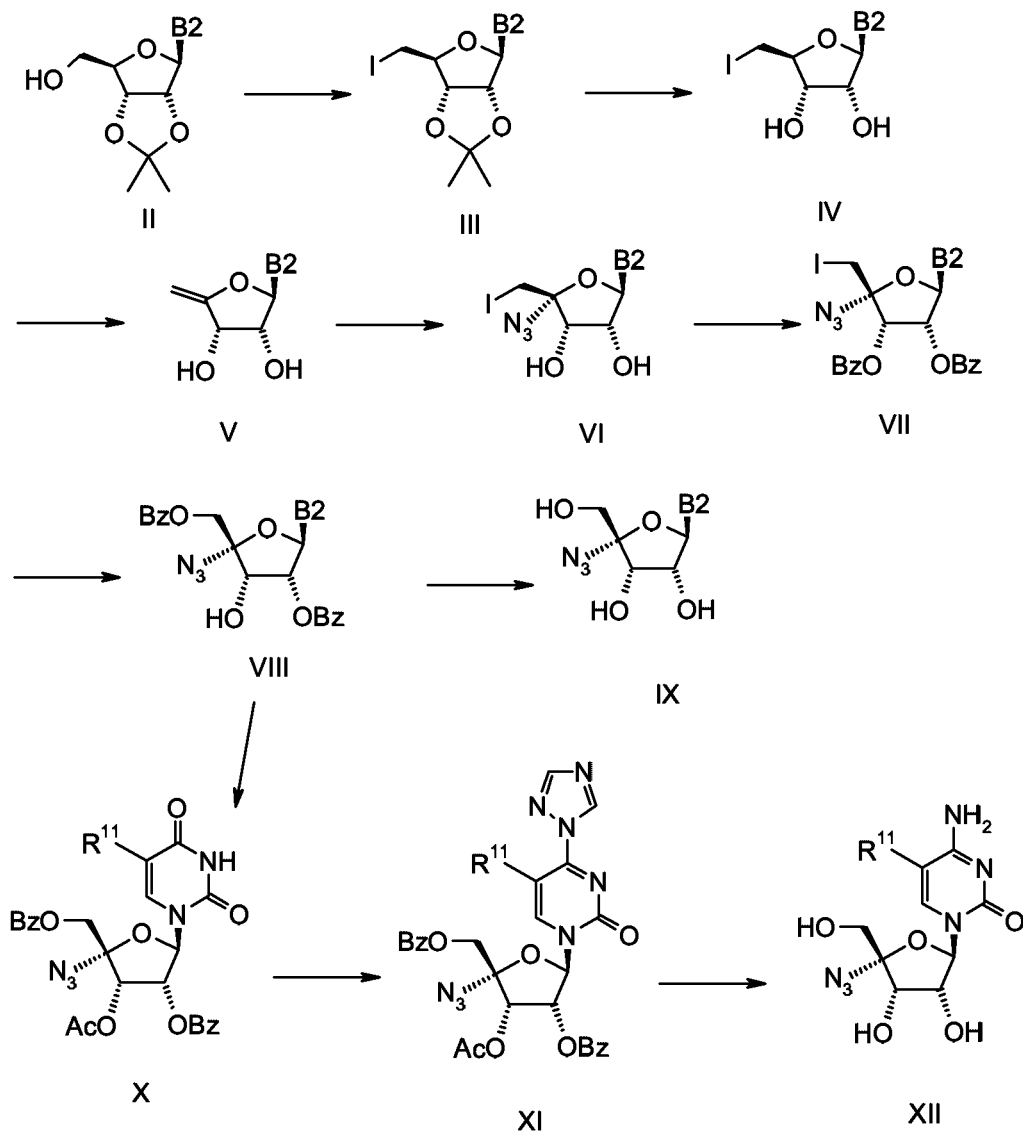
hydroksymetylfuranoser (f. eks., K. Kitano *et al*, Tetrahedron, 1997, 53(39), 13315). 4-metyl-furanoser kan fremstilles ved metoden beskrevet av T. Waga *et al*, Biosci. Biotech. Biochem. 1993, 19(7), 408.

5 2,2-difluorfuranose-derivater kan fremstilles fra D-glukose eller D-mannose som beskrevet av R. Fernandez, M. I. Mateu, R. Echarri og S. Castillon Tetrahedron, 1998, 54, 3523. De forhåndsformede nukleosid-derivater er enten kommersielt tilgjengelige eller syntetiseres i henhold til metodene beskrevet ovenfor.

Metodene beskrevet ovenfor er beskrevet mer detaljert nedenfor:

Forbindelsene med formel I, hvor R^1 er N_3 , R^2 og R^3 er hydroksy og B er B2 kan fremstilles i henhold til Reaksjonsskjema A:

Skjema A



5

hvor Ac er acetyl, Bz er benzoyl og R^{11} er som definert ovenfor.

10

Forbindelser med formel II kan ioderes ved anvendelse av en blanding av trifenyfosfin, iod og pyridin som eksemplifisert ved H. Maag *et al*, J. Med. Chem., 1992, 35, 1440. Acetonid-beskyttelsesgruppen kan fjernes ved behandling med en syre, for eksempel eddiksyre, som beskrevet av J. P. Verheyden *et al*, J. Org. Chem., 1970, 35(7), 2319, hvilket gir nukleosider med formel III. Etter beskyttelse av 2'- og 3'-

hydroksylene med eddiksyreanhydrid og pyridin-eliminering av hydrogeniodid, med for eksempel sølvfluorid i pyridin og fjerning av acetylbeskyttelsesgruppene med metanolisk ammoniakk som beskrevet av J. P. Verheyden *et al.*, J. Org. Chem., 1974, 39(24), 3573, fåes 4',5'-didehydro-

5 nukleosider med formel V. Addisjon av iodazid til dobbeltbindingen kan utføres ved behandling av V med en blanding av iodklorid og natriumazid i N,N-dimetylformamid som beskrevet av H. Maag *et al.*, J. Med. Chem., 1992, 35, 1440, hvilket gir nukleosider med formel VI. Beskyttelse av

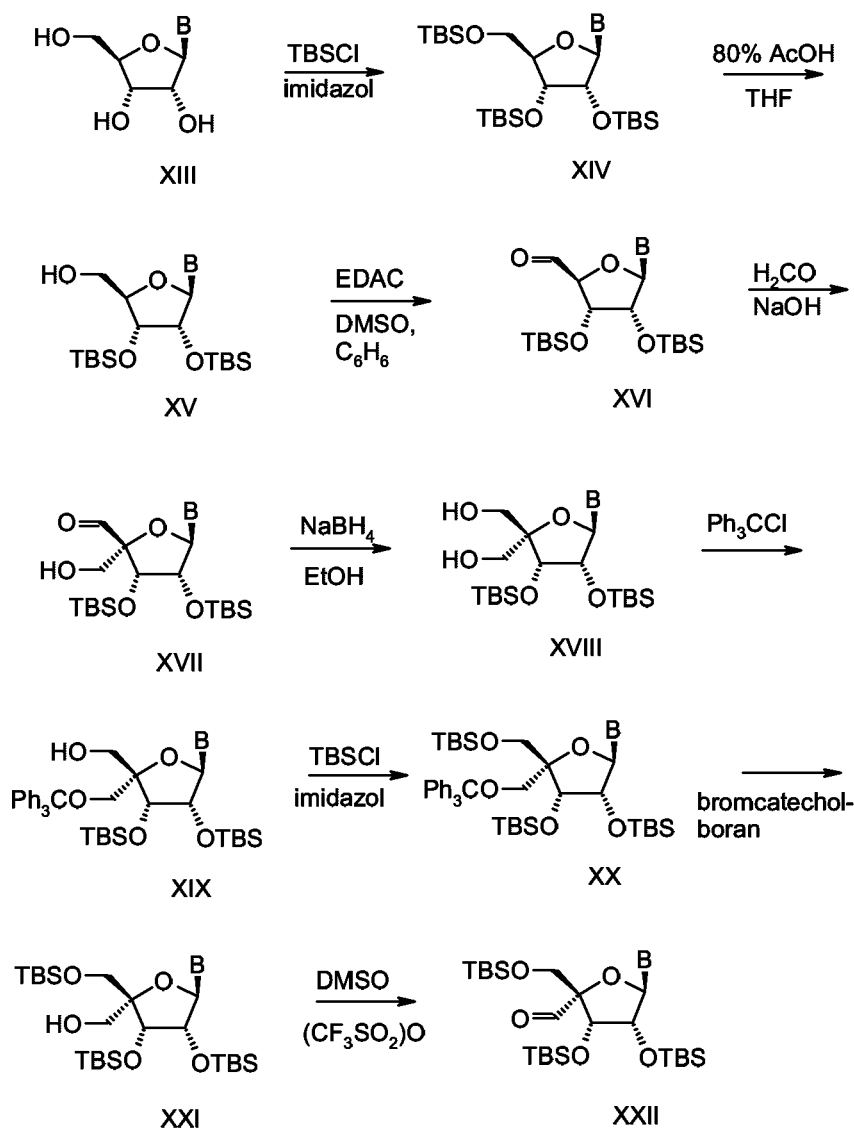
10 hydroksygruppene i VI kan utføres ved behandling av VI med benzoylklorid i pyridin, hvilket gir nukleosider med formel VII, som deretter kan omdannes til 5'-benzoyl-nukleosidene med formel VIII ved behandling med *meta*-klorperbenzosyre i diklormetan, som så kan avbeskyttes med en base, f.eks. natriummetoksyd, i metanol, hvilket gir nukleosider med formel IX, som alle er beskrevet av H. Maag *et al.*, J. Med. Chem., 1992, 35, 1440. I

15 tilfellet hvor B2 i forbindelsen med formel VIII er uracil eller 5'-substituert uracil, kan etter beskyttelse av 3'-hydroksygruppen med eddiksyreanhydrid og pyridin, omdannelse til det tilsvarende cytidin med formel XII oppnås ved metoden beskrevet av A. D. Borthwick *et al.*, J. Med. Chem., 1990, 33(1), 179, hvorved nukleosider med formel X kan behandles med 4-

20 klorfenyl- diklorfosfat og triazol, hvilket gir 4-triazolyl-nukleosider med formel XI, fulgt av behandling av nukleosider XI med vandig ammoniakk, hvilket gir 5-substituerte cytidiner med formel XII.

Forbindelser med formel I, hvor R^1 er $-CH_2$, $-CH=CHCl$, $-CH=N-OH$, $-CN$, R^2 og R^3 er hydroksy og B er B1 eller B2, kan fremstilles i henhold til Reaksjonsskjema B.

Skjema B



5

10

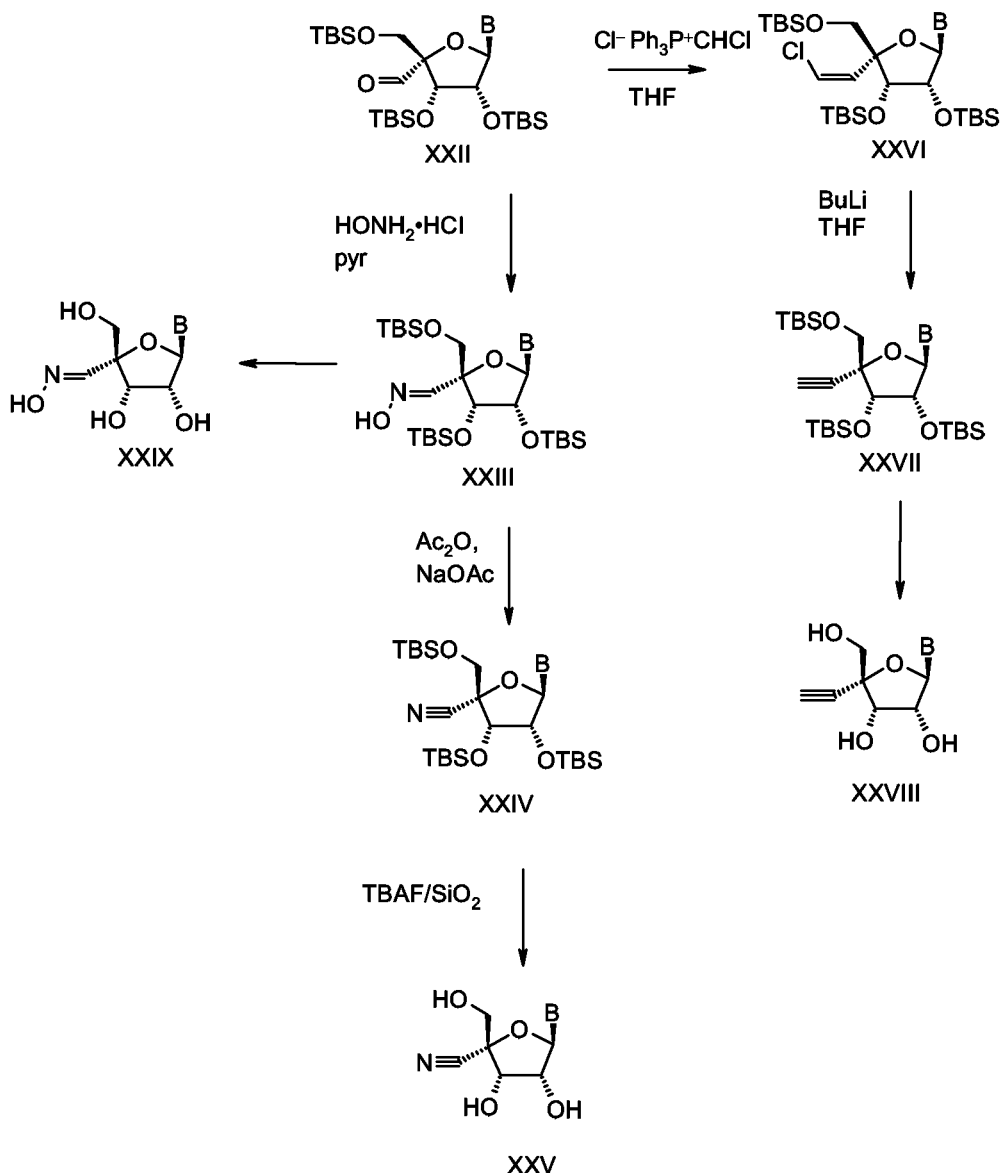
Forbindelser med formel XIII kan silyleres med *tert*-butyldimetylsilyl-klorid ($TBSCl$) og imidazol, hvilket gir tri-*tert*-butyldimetylsilylforbindelser med formel XIV. 5'-*tert*-butyldimetylsilyleteren kan avbeskyttes ved anvendelse av 80% eddiksyre, hvilket gir 5-hydroksy-nukleosidene XV, som deretter kan oksyderes til 5'-formyl-nukleosidene XVI ved anvendelse av en blanding av 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylkarbodiimid-hydroklorid ($EDAC$) og dimetylsulfoksyd ($DMSO$) i et egnet løsningsmiddel, f.eks. benzen.

- 27 -

Alkylering av XVI med formaldehyd og natriumhydroksyd gir 4'-hydroksymetylforbindelsene XVII som kan reduseres til 4'-dihydroksymetylforbindelsene XVIII. Selektiv beskyttelse av hydroksymetylen på α -siden av nukleosidet med tritylklorid i pyridin gir 4'-tritylforbindelsene XIX, fulgt av beskyttelse av hydroksymetylen på β -siden av nukleosidet med *tert*-butyldimetylsilylklorid (TBSCI) og imidazol gir forbindelser med formel XX. Avbeskyttelse av tritylgruppen med bromcatecholboran gir 4'-hydroksymetylforbindelsen XXI, som kan oksyderes med trifluormetansulfonsyreanhydrid og dimetylsulfoksyd, hvilket gir 4'-formylforbindelsen med formel XXII.

Aldehydet med formel XXII kan anvendes som utgangsmateriale for et bredt område av 4'-substituerte nukleosider som vist i Skjema C:

Skiema C



Behandling av aldehydet XXII med hydroksylamin-hydroklorid og pyridin gir 4'-hydroksyiminet med formel XXIII. Vann blir fjernet fra forbindelsen XXIII, hvilket gir 4'-cyano-forbindelser med formel XXIV.

Behandling av 4'-formylforbindelser med formel XXII med klormetyl-fosfoniumklorid og butyllitium gir 4'-(2-kloretenyl)-forbindelser XXVI.

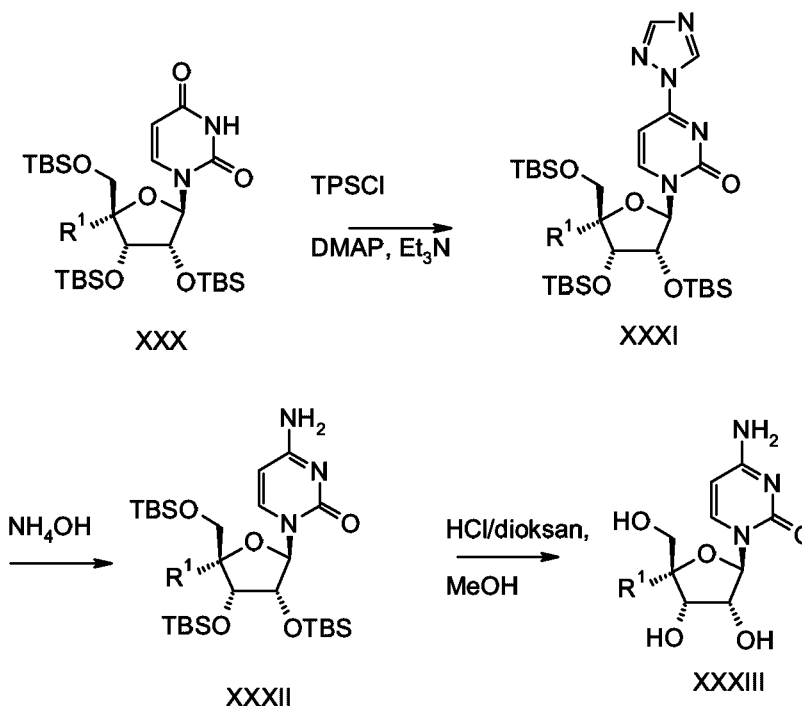
Behandling av forbindelser XXVI med butyllitium resulterer i eliminering av hydrogenklorid, hvilket gir 4'-etynylforbindelsene med formel XXVII.

Fjerning av silyl-beskyttelsesgruppene fra de tri-*tørt*-butyldimetylsilylklorid-beskyttete forbindelser XXIII, XXVII og XXIV kan utføres med en fluoridkilde så som ammoniumflourid i metanol eller

tetrabutylammoniumfluorid absorbert på silika i tetrahydrofuran, hvilket gir de respektive 4'-substituerte nukleosider XXV, XXVIII og XXIX.

Hensiktsmessig beskyttete 4'-substituerte uridiner (for eksempel XXIV og XXVII) kan omdannes til de tilsvarende 4'-substituerte cytidiner i henhold til Reaksjonsskjema D.

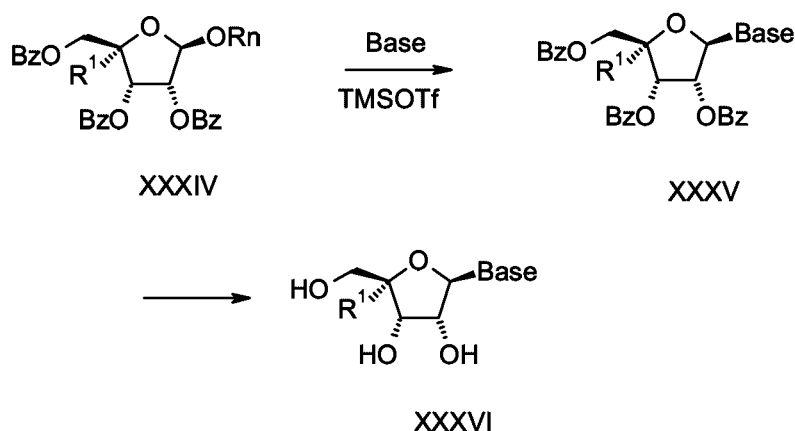
Skjema D



De tri-*tert*butyldimetylsilyl(TBS)beskyttete uridiner med formel XXX kan behandles med tri-isopropylbensensulfonylchlorid, trietylamin og dimetylaminopyridin, hvilket gir 4-triazolylnukleosidene XXXI. 4-triazolylforbindelsene XXXI kan omdannes til 4-amino-forbindelsene XXXII med vandig ammoniakk. Avbeskyttelse av silylgruppene med en blanding av metanol og saltsyre i dioksan gir cytidin-derivatene XXXIII.

Forbindelser med formel I, hvor R¹ er alkoksy, R² og R³ er hydroksy og B er en 9-purinyll-rest B1 eller en 1-pyrimidyl-rest B2, kan fremstilles i henhold til metodene beskrevet av J.P. Verheyden *et al.* US patent nr. 3 910 885

Forbindelser med formel I hvor R¹ er trifluormetyl, metyl eller etynyl, kan fremstilles som vist i Reaksjonsskjema E:

Skjema E

for eksempel ved kobling av det tilsvarende beskyttete 4'-substituerte ribofuranosid XXXIV med en silylert base i nærvær av en Lewis-syre, f.eks. trimetylsilyltrifluormetansulfonat (TMSOTf) eller tinntetraklorid i et passende løsningsmiddel, f.eks. acetonitril eller 1,2-diklorethan, hvilket gir forbindelser med formel XXXV. Beskyttelsesgruppene kan fjernes ved behandling av XXXV med en base, for eksempel natriummetoksyd, i et kompatibelt løsningsmiddel, for eksempel metanol, hvilket gir forbindelser med formel XXXVI.

Metoder for monofosforylering av organiske forbindelser omfattende nukleosider er sammenfattet av L A Slotin, *Synthesis*, 1977, 737. Mer nylig er andre nukleosidfosforyleringsprosedyrer beskrevet: M Uchiyama et al *J. Org. Chem.*, 1993, 58,373; R Caputo et al, *Synlett.*, 1997, 739 og M Taktakishvili og V Nair *Tet. Lett.* 2000, 41, 7173. Andre prosedyrer for monofosforylering som kan være anvendelige for nukleosider er beskrevet av C E McKenna og J Schmidhauser, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1979, 739 og J K Stowell og T S Widlanski *Tet. Lett.*, 1995, 1825. Syntese av di- og trifosfat-derivater er sammenfattet i K H Scheit, *Nucleotide Analogues*, 1980, Wiley Interscience og av K Burgess og D Cook *Chemical Reviews*, 2000, 100, 2047.

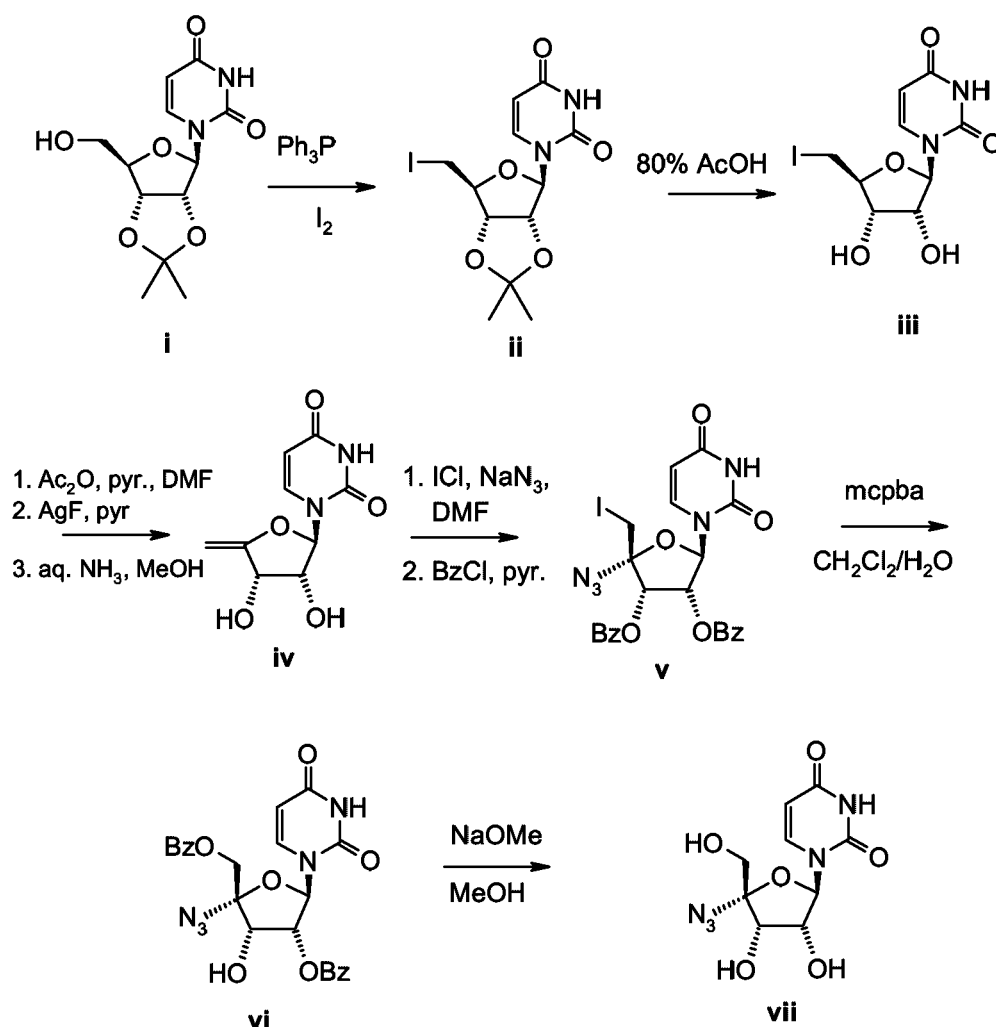
De følgende Eksempler illustrerer metoder for fremstilling av forbindelser med formel I:

Eksempel 1

Fremstilling av forbindelse 1, i henhold til metoden ifølge skjemaer 1 og 1a

5

Skjema 1



1.1. Forbindelse (i)

Forbindelse **(i)** ble kjøpt fra Lancaster (Cat. no.: 206-647-7, CAS 362-43-6)

10

1.2. Forbindelse (ii)

Trifenylfosfin (1,57 g, 6,0 mmol) og iod (1,52 g, 6,0 mmol) ble satt til forbindelse **(i)** (1,14 g, 4,0 mmol) i dioksan (20 ml) inneholdende pyridin (0,65 mmol, 8,0 mmol). Blandingen ble rørt natten over og behandlet med metanol (1 ml). Løsningsmidlet ble avdampet *i vakuum*. Residuet ble

oppløst i etylacetat (200 ml), vasket med vann (100 ml), 10% vandig natriumtiosulfat (100 ml), saltvann (100 ml) og tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Magnesiumsulfatet ble fjernet ved filtrering og filtratet inndampet *i vakuum*. Residuet ble rensed ved flash- kolonnekromatografi på silikagel under eluering med 1:1 etylacetat/petroleter), hvilket ga forbindelsen (ii) som en fargeløs olje som langsomt stivnet til et fargeløst voksaktig fast stoff (1,5 g) massespektrum (CI) m/z 395 $[M+H]^+$.

1.3. Forbindelse (iii)

Forbindelsen (iii) ble fremstilt fra forbindelsen (ii) som beskrevet av J. P. Verheyden *et al.*, J. Org. Chem., 1970, 35(7), 2319.

1.4. Forbindelse (iv)

Forbindelsen (iv) ble fremstilt fra forbindelsen (iii) som beskrevet av J. P. Verheyden *et al.*, J. Org. Chem., 1974, 39(24), 3573.

1.5. Forbindelse (v)

Forbindelse (v) ble fremstilt fra forbindelse (iv) som beskrevet av H. Maag *et al.*, J. Med. Chem., 1992, 35, 1440-1451.

1.6. Forbindelse (vi)

Til en løsning av forbindelsen (v) (482 mg, 0,80 mmol) i diklormetan mettet med vann (10 ml) sattes 55% metaklorperbenzoyre (1,0 g, 4,95 mmol).

Blandingen ble rørt i 2 timer. Ytterligere metaklorperbenzoyre (0,50 g) ble tilsatt, og blandingen ble rørt i ytterligere 3 timer. Etylacetat (100 ml) ble tilsatt og løsningen vasket med 10% natriummetabisulfittløsning (50 ml), fulgt av mettet natriumhydrogenkarbonat-løsning (50 ml). Etylacetatet ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Magnesiumsulfatet ble fjernet ved filtrering, og filtratet ble inndampet *i vakuum*. Residuet ble underkastet flashkromatografi under eluering med 1:1 etylacetat/ petroleter 1:1, hvilket ga forbindelsen (vi) som en fargeløs glassaktig masse (200 mg); massespektrum (ESI) m/z 535 $[M+H+CH_3CN]^+$

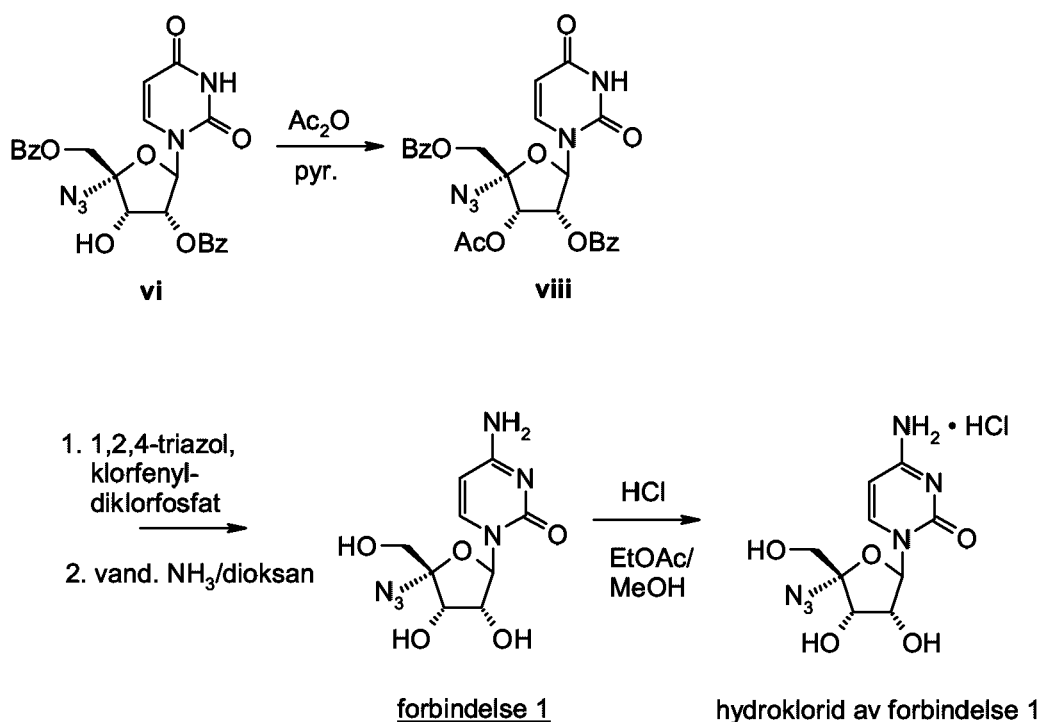
1.7. Forbindelse (vii)

Til en løsning av forbindelsen (vi) (170 mg, 0,35 mmol) i metanol (2 ml) sattes en løsning av natriummetoksyd i metanol (0,5 M, 0,5 ml). Løsningen ble rørt i 2 timer ved romtemperatur. Løsningen ble nøytralisert med

ionebytterharpiks (Amberlite IRC 50 (H⁺), Aldrich, cat. no. 42,883-3) og rørt i 10 min. Harpiksen ble fjernet ved filtrering. Filtratet ble inndampet i *vakuum* og residuet ble underkastet flash- kromatografi under eluering med 1:1 etylacetat/ aceton), hvilket ga en fargeløs olje. Utgning med etylacetat ga forbindelsen (**vii**) som et fargeløst, fast stoff (35 mg); massespektrum (CI) m/z 286 [M+H]⁺.

Omdannelsen av azidetouridin-derivatet til det tilsvarende azidocytidin-derivat (forbindelse 1) og dens hydrokloridsalt er vist i Skjema 1a

Skjema 1a



1.8. Forbindelse (viii)

Til en løsning av forbindelsen (**vi**) (460 mg, 0,93 mmol) i pyridin (3 ml) sattes eddiksyreanhydrid (1 ml) og blandingen ble rørt i 4 timer. Etylacetat (100 ml) ble tilsatt, og blandingen ble vasket med 2 N HCl (50 ml), fulgt av mettet natriumhydrogenkarbonat-løsning (50 ml). Løsningen ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Magnesiumsulfatet ble fjernet ved filtrering, og filtratet ble inndampet i *vakuum*. Residuet ble underkastet flashkromatografi under eluering med 1:1 etylacetat/ petroleter, hvilket ga forbindelsen (**viii**) som en fargeløs gummi (350 mg); massespektrum (ESI) m/z 536 [M+H]⁺

1.9. Forbindelse 1

Til en løsning av forbindelsen (**viii**) (1,5 g, 2,8 mmol) i pyridin (20 ml) sattes 1,2,4-triazol (0,97 g, 14 mmol). 4-klorfenyldiklorfosfat (1,36 ml, 8,4 mmol) ble deretter tilsatt dråpevis under røring. Blandingen ble rørt i 16 timer.

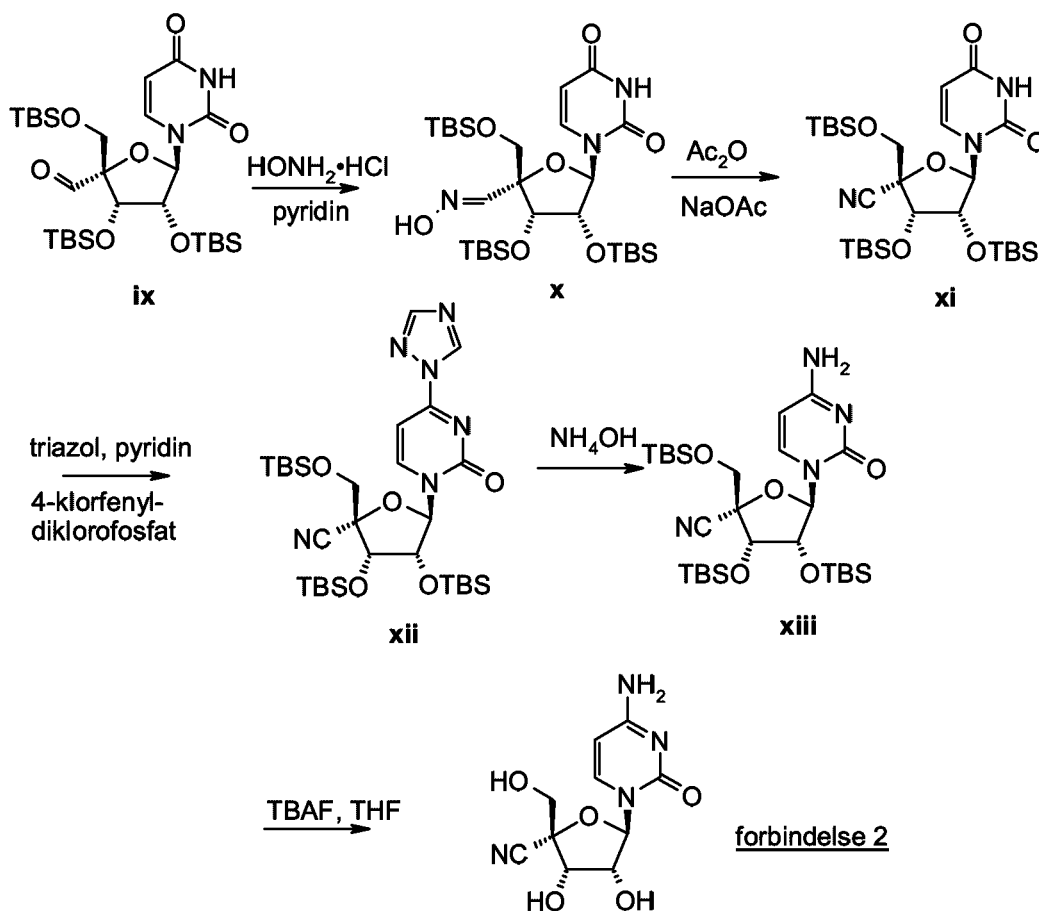
5 Etylacetat (300 ml) ble tilsatt, og blandingen ble vasket med mettet natriumhydrogenkarbonat-løsning (200 ml). Løsningen ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Magnesiumsulfatet ble fjernet ved filtrering, og filtratet ble inndampet *i vakuum*. Residuet ble underkastet flashkromatografi under eluering med 2:1 etylacetat/ petroleter, hvilket ga et gult skum (850
10 mg). Skummet ble behandlet med dioksan (8 ml) fulgt av vandig ammoniakk-løsning (16 ml) og rørt i 16 timer. Filtratet ble inndampet *i vakuum*, og residuet ble flashkromatografert under eluering med 90:18:3:2 diklormetan/metanol/eddiksyre/vann, hvilket ga forbindelsen 1 som et lyst gyldenbrunt skum (350 mg); massespektrum (FAB) m/z 285 $[M+H]^+$

1.10. Hydroklorid av forbindelsen 1

15 Forbindelsen 1 (0,40 g) ble oppløst i metanol og behandlet med en løsning av hydrogenklorid i etylacetat. Produktet utskiltes som et mikrokrySTALLINSK fast stoff og ble oppsamlet ved filtrering og tørket *i vakuum*, hvilket ga hydrokloridsaltet av forbindelsen 1 (0,22 g); massespektrum (ESI) m/z 285
20 $[M+H]^+$

Eksempel 2

Fremstilling av forbindelsen 2 i henhold til metoden i skjema 2



5 2.1. Forbindelse (ix)

Forbindelsen (ix) ble fremstilt fra forbindelsen (xiv), se eksempel 3, som beskrevet av M. Nomura *et al.*, J. Med. Chem., 1999, 42, 2901-2908.

10 2.2. Forbindelse (x)

En blanding av (ix) (600 mg, 0,98 mmol) og hydroksylamin-hydroklorid (140 mg, 1,95 mmol) i pyridin ble rørt ved romtemperatur i 2 timer.

Reaksjonsblandingen ble inndampet i *vakuum* og residuet ble fordelt mellom etylacetat (30 ml) og vann (30 ml). Etylacetatsjiktet ble skilt fra og tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Magnesiumsulfatet ble fjernet ved filtrering og filtratet inndampet i *vakuum*, hvilket ga forbindelse (x) som et hvitt skum (615 mg); massespektrum (ESI) m/z 630 $\{M+H\}^+$.

15

2.3. Forbindelse (xi)

En blanding av forbindelsen (x) (550 mg, 0,87 mmol) og natriumacetat (720 mg, 5,25 mmol) ble oppslemmet i eddiksyreanhydrid og deretter oppvarmet ved 130°C i 3 timer. Reaksjonsblandingen ble inndampet *i vakuum* og residuet fordelt mellom etylacetat (30 ml) og mettet natriumbikarbonat (30 ml). Etylacetatsjiktet ble skilt fra og tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Magnesiumsulfatet ble fjernet ved filtrering og filtratet inndampet *i vakuum*. Residuet ble rensset ved flash- kolonnekromatografi på silikagel under eluering med 1:2 dietyleter/heksan. Produkt-holdige fraksjoner ble samlet og inndampet *i vakuum*, hvilket ga forbindelsen (xi) som et fargeløst, fast stoff (285 mg). massespektrum (ESI) m/z 612 [M+H]⁺.

2.4. Forbindelse (xii)

4-klorfenyl-diklorfosfat (160 µL, 0,98 mmol) ble satt dråpevis til en løsning av forbindelse (xi) (200 mg, 0,33 mmol) og 1,2,4-triazol (115 mg, 1,63 mmol) i vannfritt pyridin (5 ml) og deretter rørt ved romtemperatur i 16 timer. Reaksjonsblandingen ble inndampet *i vakuum* og residuet fordelt mellom etylacetat (30 ml) og 2M saltsyre (30 ml). Etylacetatsjiktet ble skilt fra, vasket med mettet natriumbikarbonat (30 ml) og tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Magnesiumsulfatet ble fjernet ved filtrering og filtratet inndampet *i vakuum*. Residuet ble rensset ved flashkolonnekromatografi på silikagel under eluering med 1:1 dietyleter/heksan fulgt av 2:1 dietyleter/heksan. Produkt-holdige fraksjoner ble samlet og inndampet *i vakuum*, hvilket ga (xii) som et kremfarget, fast stoff (65 mg). Massespektrum (ESI) m/z 663 [M+H]⁺.

2.5. Forbindelse (xiii)

En løsning av forbindelsen (xii) (60 mg, 0,09 mmol) og vandig ammoniakk (2 ml) i acetonitril ble rørt ved romtemperatur i 16 timer. Reaksjonsblandingen ble inndampet *i vakuum* og residuet fordelt mellom etylacetat (10 ml) og 2 M saltsyre (10 ml). Etylacetatsjiktet ble skilt fra og tørket over magnesiumsulfat. Magnesiumsulfatet ble fjernet ved filtrering og inndampet *i vakuum*, hvilket ga forbindelsen (xiii) som et blekgult, fast stoff (45 mg); massespektrum (ESI) m/z 611 [M+H]⁺

2.6. Forbindelse 2

Tetrabutylammoniumfluorid (1 M løsning i THF, 0,3 ml) ble satt til en omrørt løsning av forbindelsen (xiii) (40 mg, 0,06 mmol) i tørt tetrahydrofuran (10 ml) og rørt ved romtemperatur i 2 timer. Løsningsmidlet ble fjernet ved inndampning *i vakuum*. Residuet ble behandlet med pyridin (1 ml) fulgt av eddiksyreanhydrid (0,3 ml) og rørt i 4 timer ved romtemperatur.

Løsningsmidlet ble fjernet ved inndampning *i vakuum*. Residuet ble behandlet med etylacetat (50 ml) og vasket med fortynnet saltsyre (30 ml) fulgt av en 5% vandig natriumbikarbonat-løsning. Etylacetatet ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Magnesiumsulfatet ble fjernet ved filtrering og filtratet inndampet *i vakuum*. Residuet ble flashkolonne-kromatografert under eluering med etylacetat, hvilket ga en olje. Oljen ble oppløst i metanol (1 ml) og behandlet med natriummetoksyd (0,5M løsning i metanol, 0,05 ml) og fikk stå ved romtemperatur i 3 timer. Blandingen ble nøytralisert med ionebytterharpiks (Amberlite IRC 50 (H⁺)). Harpiksen ble fjernet ved filtrering og filtratet inndampet *i vakuum*. Residuet ble oppløst i vann og fryse- tørket, hvilket ga forbindelsen 2 som et amorft fast stoff (7 mg).

2.7. Det tilsvarende 4'-cyanouridin kan fremstilles ved avbeskyttelse av forbindelse (xi).

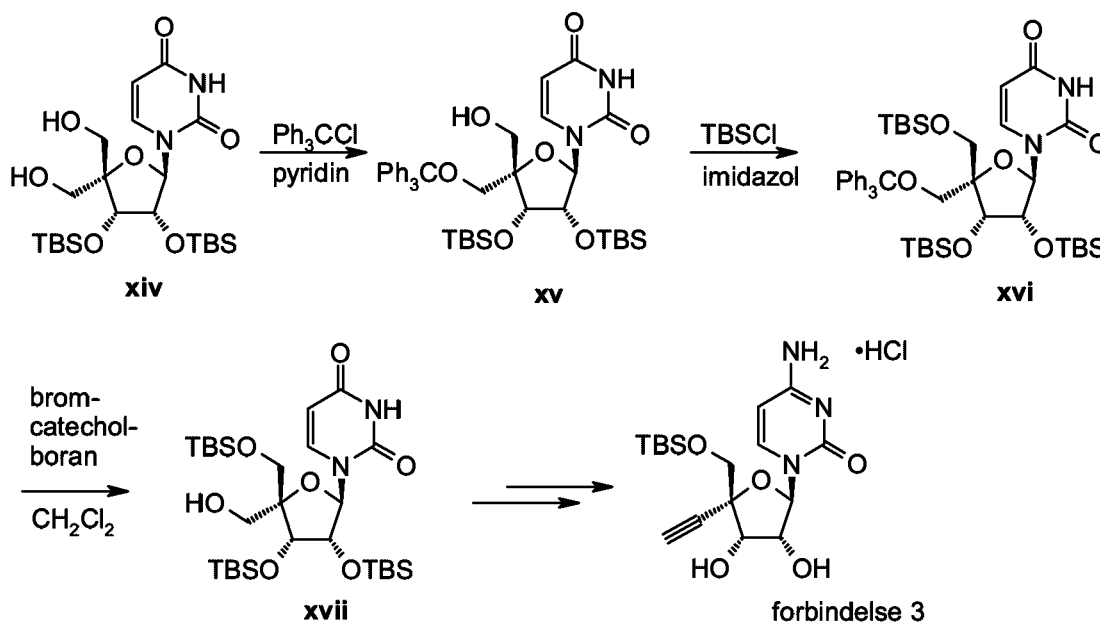
Avbeskyttelsen kan utføres som følger:

Forbindelsen (xi) (50 mg, 82 µmol) ble oppløst i tetrahydrofuran, behandlet med tetrabutylammoniumfluorid på silika og deretter rørt i 16 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble filtrert gjennom Hyflo Super Cel (Fluka, cat. no. 56678), inndampet *i vakuum*, deretter rensset ved flashkolonnekromatografi på silikagel under eluering med diklormetan/metanol/eddiksyre/vann (240:24:3:2) fulgt av diklormetan/metanol/eddiksyre/vann (90:18:3:2). Produkt-holdige fraksjoner ble samlet og inndampet. Residuet ble oppløst i metanol/vann (5:1), behandlet med Duolite C225 ionebytterharpiks (H⁺ form, BDH, cat. no. 56678) og rørt i 15 min. Harpiksen ble fjernet ved filtrering og filtratet inndampet *i vakuum* til et lite volum. Produktet ble oppsamlet ved filtrering

og tørket *i vakuum*, hvilket ga 4'-cyanouridin som et hvitt, krystallinsk fast stoff (15 mg); massespektrum m/z (ESI) 270 $[M+H]^+$.

Eksempel 3

Fremstilling av forbindelse 3 i henhold til metoden i **Skjema 3**



5

3.1. Forbindelse (xiv)

Denne forbindelsen ble fremstilt som beskrevet av M. Nomura *et al.*, J. Med. Chem., 1999, 42, 2901-2908.

10

3.2. Forbindelse (xv)

Tritylklorid (3,2 g; 11,5 mmol) ble satt til en løsning av forbindelsen (xiv) (3,0 g, 6,0 mmol) i pyridin (20 ml) og rørt ved romtemperatur i 16 timer. Løsningsmidlet ble avdampet *i vakuum* og residuet fordelt mellom etylacetat (50 ml) og 2 M saltsyre (50 ml). Etylacetatsjiktet ble skilt fra, vasket med saltvann (50 ml) og tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Magnesiumsulfatet ble fjernet ved filtrering og filtratet inndampet *i vakuum*. Det rå materiale ble renset ved flash- kolonnekromatografi på silikagel under eluering med 2:1 dietyleter/heksan. Produkt-holdige fraksjoner ble samlet og inndampet *i vakuum*, hvilket ga forbindelsen (xv) som et hvitt, fast stoff (2,75 g); massespektrum (ESI) m/z 767 $[M+H]^+$.

20

3.3. Forbindelse (xvi)

tert-Butyldimetylsilylchlorid (0,67 g, 4,4 mmol) og imidazol (0,91 g, 13,3 mmol) ble satt til en omrørt løsning av forbindelse **(xv)** (2,75 g, 3,7 mmol) i dimetylformamid (20 ml). Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 45°C i 16 timer. Ytterligere *tert*-butyldimetylsilylchlorid (0,67 g, 4,4 mmol) og imidazol (0,91 g, 13,3 mmol) ble tilsatt, og blandingen ble oppvarmet til 60°C i 4 timer. Løsningsmidlet ble fjernet ved inndampning *i vakuum*, og residuet ble fordelt mellom etylacetat og saltvann. Etylacetatet ble skilt fra og vasket med mer saltvann og tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Magnesiumsulfatet ble fjernet ved filtrering og filtratet inndampet *i vakuum*. Det gjenværende fargeløse skum ble renset ved flashkolonnekromatografi på silikagel under eluering med 1:2 dietyleter/heksan. Produkt-holdige fraksjoner ble samlet og inndampet *i vakuum*, hvilket ga forbindelsen **(xvi)** som et hvitt, fast stoff (3,1 g).

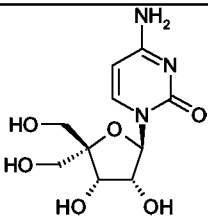
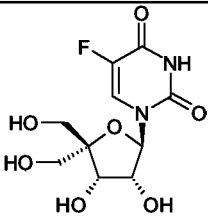
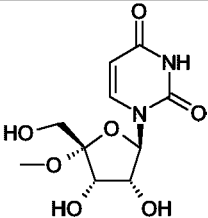
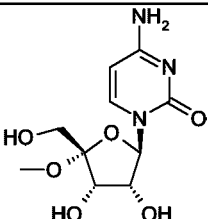
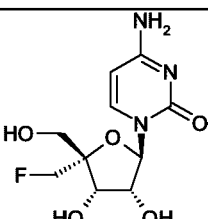
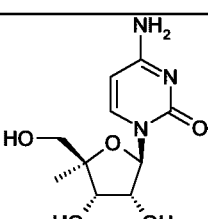
3.4. Forbindelse **(xvii)**

Bromcatecholboran (355 mg, 1,77 mmol) ble satt til en omrørt løsning av forbindelsen **(xvi)** (1,5 g, 1,77 mmol) i tørt diklormetan (50 ml) under en nitrogen-atmosfære ved 0°C. Reaksjonsblandingen ble rørt i 15 min, fortynnet med diklormetan (50 ml) og deretter vasket med mettet natriumbikarbonat (100 ml) og saltvann (100 ml). Diklormetanet ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Magnesiumsulfatet ble fjernet ved filtrering og filtratet inndampet *i vakuum*. Residuet ble renset ved flashkolonnekromatografi på silikagel under eluering med 1:1 dietyleter/heksan. Produkt-holdige fraksjoner ble samlet og inndampet *i vakuum*, hvilket ga forbindelsen **(xvii)** som et hvitt, fast stoff (930 mg).

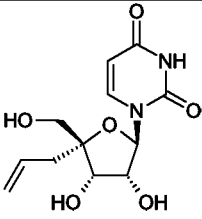
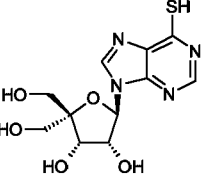
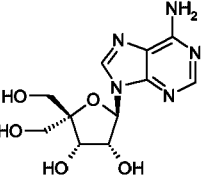
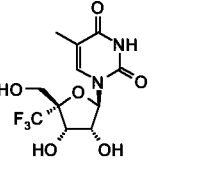
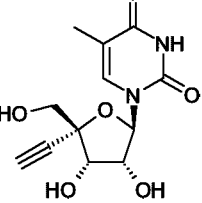
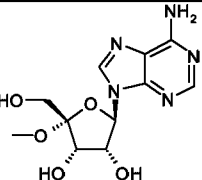
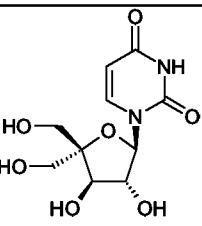
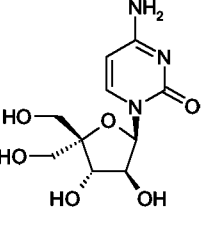
3.5. Forbindelse 3

ble fremstilt fra forbindelsen **(xvii)** som beskrevet av M. Nomura *et al.*, J. Med. Chem., 1999, 42, 2901-2908.

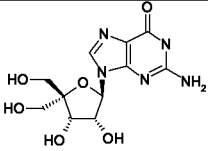
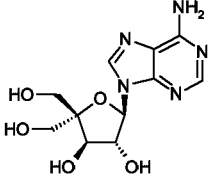
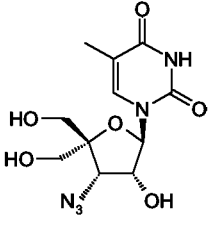
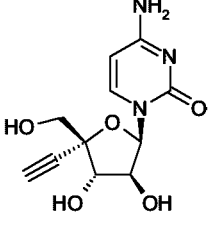
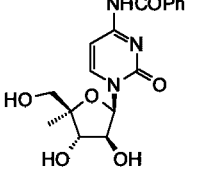
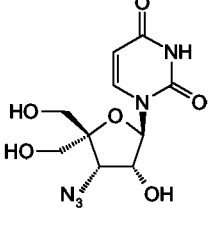
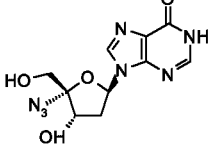
Ytterligere forbindelser kan fremstilles i henhold til metodene beskrevet på området, for eksempel:

Forbindelse nr.	Struktur	Navn og fremstillingsmetode
forbindelse 6		4'-C-(hydroxymetyl)cytidin G. H. Jones <i>et al.</i> , J. Org. Chem., 1979, 44(8), 1309.
forbindelse 7		5-fluor-4'-C-(hydroxymetyl)uridin Youssefyeh <i>et al.</i> , J. Org. Chem., 1979, 44, 1301.
forbindelse 8		4'-C-metoksyuridin J. A. Cook og J. L. Secrist, J. Am. Chem. Soc., 1979, 101, 1554
forbindelse 9		4'-C-metoksycytidin J. G. Moffatt og J. P. Verheyden, US patent nr. 3 910 885
forbindelse 22		4'-C-(fluormetyl)cytidin K. Kitano <i>et al.</i> , Tetrahedron, 1997, 53(39), 13315.
forbindelse 23		4'-C-metylcytidin T. Waga <i>et al.</i> , J. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1993, 57(9), 1433

Ytterligere forbindelser med formel I kan fremstilles analogt med metodene beskrevet i kjent teknikk oppført nedenfor:

	4'-C-allyluridin J. Secrist <i>et al.</i>, J. Am. Chem. Soc., 1978, 100, 2554.
	9-[4-C-(hydroksymetyl)-beta-D-ribofuranosyl]-6-merkaptopurin Youssefieh <i>et al.</i>, J. Org. Chem., 1979, 44, 1301
	4'-C-(hydroksymetyl)adenosin A. Rosenthal og M. Ratcliffe, Carbohydr. Res., 1977, 54, 61.
	4'-C-(trifluormetyl)-5-metyluridin J. Kozak og C. R. Johnson 1998, 17(12), 2221.
	4'-C-(etynyl)-5-metyluridin R. Yamaguchi <i>et al.</i>, J. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63(4), 736
	4'-C-metoksyadenosin C. M. Richards <i>et al.</i>, Carbohydr. Res., 1982, 100, 315.
	1-[4-C-(hydroksymetyl)-beta-D-xylofuranosyl]uracil G. H. Jones <i>et al.</i>, J. Org. Chem., 1979, 44(8), 1309-1317
	1-[4-C-(hydroksymetyl)-beta-D-arabinofuranosyl]cytosin T. Waga <i>et al.</i>, Nucleosides Nucleotides, 1996, 15(1-3) 287-304

- 42 -

	4'-C-(hydroksymetyl)guanosin J. C. Martin og J. P. Verheyden, Nucleosides Nucleotides 1988, 7(3), 365
	9-[4-C-(hydroksymetyl)-beta-D-xylofuranosyl]adenin D. L. Leland og M. P. Kotick, Carbohydr. Res., 1974, 38, C9-C11
	3'-azido-3'-deoksy-4'-C-(hydroksymetyl)-5-metyluridin A. G. Olsen <i>et al</i> , J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 2000, 21, 3610
	1-(4-C-etynyl-beta-D-arabinofuranosyl)cytosin H. Ohrui <i>et al</i> , J. Med. Chem., 2000, 43(23), 4516 eller S. Kohgo <i>et al.</i> , Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63(6), 1146
	N4-benzoyl-1-[4-C-metyl-beta-D-arabinofuranosyl]cytosin T. Yamaguchi <i>et al.</i> , Nucleosides Nucleotides, 1997, 16(7), 1347
	3'-azido-3'-deoksy-4'-C-(hydroksymetyl)uridin S. A. Surzhikov og N. B. Dyatkina Russ. J. Biorg. Chem. (Engl. Transl.), 1993, 19(7), 408
	Fremstilling av 2'-deoksy-4'-azidonukleosider H. Maag, <i>et al</i> . Eur. Pat. søkn. EP 371366 A1

Den følgende målemetode demonstrerer evnen til forbindelsene med formel I til å hemme HCV RNA-replikasjon og derfor deres potensielle nytte ved behandling av HCV-infeksjoner.

Renilla luciferase måling

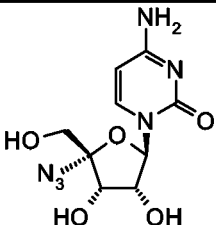
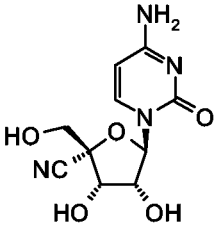
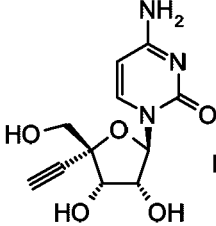
Denne målingen er basert på den ide å anvende en reporter som en enkel avlesning for intracellulært HCV replikon RNA-nivå. I denne hensikt ble Renilla luciferase gen innført i den første åpen leseramme av en replikon-konstruksjon NK5.1 (Krieger *et al.*, J. Virol. 75:4614), umiddelbart etter den interne ribosom-inngangsete(IRES)sekvensen og kondensert med neomycin-fosfotransferase- (NPTII)genet gjennom et selv-spaltningseptid 2A fra munn og klovsyke-virus (Ryan & Drew, EMBO bd. 13:928-933). Etter *in vitro* transkripsjon ble RNA'et elektroporert i humane hepatoma Huh7 celler og G418-resistent kolonier ble isolert og utvidet. Stabil valgt cellelinje 2209-23 ble vist å inneholde replikativt HCV subgenomisk RNA og aktiviteten til Renilla luciferase uttrykt ved replikonet reflekterer dets RNA-nivå i cellene.

For måleprosedyren ble Renilla Luciferase HCV replikon-celler (2209-23) som var dyrket i Dulbecco's MEM (GibcoBRL cat. no. 31966-021) med 5% føtalt kalveserum (FCS, GibcoBRL cat. no. 10106-169) platet på en 96-brønners plate ved 5000 celler pr. brønn og inkubert natten over. Tjue-fire timer senere ble forskjellige fortynninger av kjemiske forbindelser i vekstmediet satt til cellene, som ble inkubert videre ved 37°C i tre dager. Målingen ble utført i duplikat-plater, én i opak hvit og én i transparent, for å måle aktiviteten og cytotoksisiteten til en kjemisk forbindelse parallelt under sikring av at aktiviteten som ble sett ikke skyldes reduksjon av celleproliferasjon.

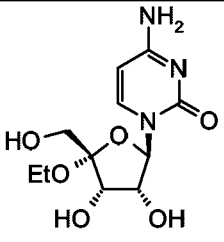
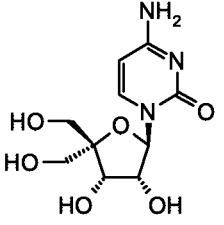
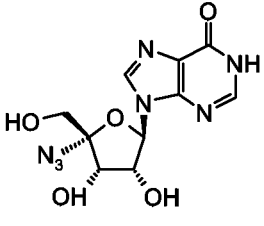
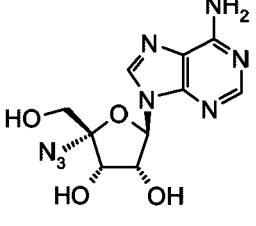
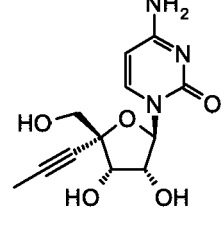
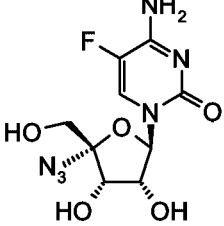
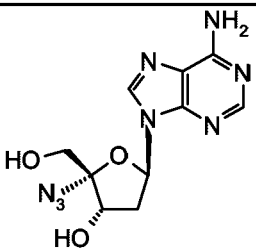
Ved slutten av inkuberingstiden ble cellene i hvite plater høstet og luciferase- aktivitet ble målt ved anvendelse av Dual-Luciferase-reporter-målesystemet (Promega cat. no. E1960) Alle reagensene beskrevet i de følgende avsnitt inngikk i produsentens sett, og produsentens instruksjoner ble fulgt for preparering av reagensene. I korthet ble cellene vasket to ganger med 200 µl fosfatbufret saltvann (pH 7,0) (PBS) pr. brønn og lyset med 25 µl 1x passiv lysebuffer før inkubering ved romtemperatur i 20 min. Ett hundre mikroliter LAR II reagens ble satt til hver brønn. Platen ble deretter innsatt i LB 96V mikroplate-luminometeret (MicroLumatPlus,

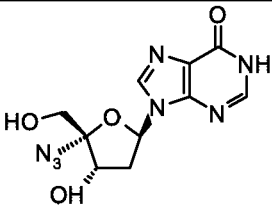
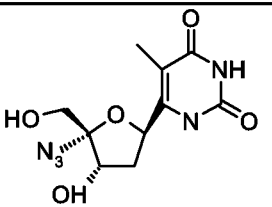
Berthold) og 100 µl Stop & Glo reagens ble injisert i hver brønn med maskinen og signalet målt ved anvendelse av en 2-sekunders forsinkelse, 10-sekunders måleprogram. IC₅₀, konsentrasjonen av medikamentet som er nødvendig for reduksjon av replikon-nivå med 50% i forhold til ubehandlet celle- kontrollverdi, kan beregnes fra plotting av prosentdel reduksjon av luciferase- aktiviteten mot medikamentkonsentrasjon. Resultatene er oppstilt nedenfor.

For cytotoxissitetsmåling ble WST-1 reagens fra Roche Diagnostics (cat. no. 1644807) anvendt. Ti mikroliter av WST-1 reagens ble satt til hver brønn omfattende brønner som inneholder media alene som blindverdier. Celler ble deretter inkubert i 1 til 1,5 timer ved 37°C og OD-verdien ble målt med en 96-brønners plateleser ved 450 nm (referansefilter ved 650 nm). Igjen kan CC₅₀ konsentrasjonen av medikamentet som er nødvendig for reduksjon av celleproliferasjon med 50% i forhold til den ubehandlede cellekontrollverdi, beregnes fra plottingen av prosentdel reduksjon av WST-1 verdien mot medikamentkonsentrasjon.

Forbindelse nr.	STRUKTUR	Navn	IC ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM) WST-1
forbindelse 1		4'-C-azidocytidin	1,2	0% (100µM)
forbindelse 2		4'-C-cyanocytidin	99% (20 µM)	100% (20µM)
forbindelse 3		4'-C-etynylcytidin- hydroklorid (1:1)	3% (20 µM)	0% (20µM)

- 45 -

forbindelse 4		4'-C-etoksycytidin	11% (20µM)	0% (20µM)
forbindelse 6		4'-C-(hydroksy-metyl)-cytidin	13% (20µM)	2% (20µM)
forbindelse 16-1		4'-C-azidoinosin	>500µM	
forbindelse 18		4'-C-azido-adenosin	57	
forbindelse 30		4'-C-(1-Propynyl)-cytidin	15% (20µM)	2% (20µM)
forbindelse 44		4'-C-azido-5-fluorocytidin	108	
forbindelse 46		4'-azido-2'-deoksyadenosin	13	0% (20µM)

forbindelse 47		4'-C-azido-2'-deoksy inosin	37	12% (20µM)
forbindelse 48		4'-C-azido- 5-metyluridin	8	0% (20µM)

Som vist i Tabell ovenfor har forbindelsene med formel I potensiale som effektive antivirale medikamenter for behandling av HCV-infeksjoner hos mennesker.

5 Den aktive forbindelse eller dens salt administreres i kombinasjon med et annet antiviralt middel, så som et anti-hepatitt middel omfattende dem med formel I. Når den aktive forbindelse eller dets salt blir administrert i kombinasjon med et annet antiviralt middel, kan aktiviteten økes i forhold til stamforbindelsen. Dette kan lett fastslås ved fremstilling av forbindelsen til testing av dets anti-HCV-aktivitet i henhold til metoden beskrevet her.

10 Administrering av den aktive forbindelse kan ligge i området fra kontinuerlig (intravenøst drypp) til mange orale administreringer pr. dag (for eksempel Q.I.D) og kan omfatte oral, topisk parenteral, intramuskulær, intravenøs, subkutan, transdermal (som kan omfatte et penetreringsforsterkende middel), munnhule- og

15 suppositoriumsadministrering, blant andre administreringsmetoder.

De 4'-substituerte nukleosid-derivater så vel som deres farmasøytisk anvendelige salter kan anvendes som medikamenter i form av hvilket som helst farmasøytisk preparat. Det farmasøytiske preparatet kan

20 administreres enteralt, enten oralt, f.eks. i form av tabletter, belagte tabletter, dragéer, harde og myke gelatinkapsler, løsninger, emulsjoner, siruper eller suspensjoner eller rektalt, f.eks. i form av suppositorier. De kan også administreres parenteralt (intramuskulært, intravenøst, subkulant eller

intrasternal injeksjon eller infusjonsteknikker), f.eks. i form av injeksjonsløsninger, nasalt, f.eks. i form av nesespray-preparater eller inhaleringsspray, topisk og så videre.

5 For fremstilling av farmasøytiske preparater kan de 4'-substituerte nukleosid-derivater så vel som deres farmasøytisk anvendelige salter formuleres med et terapeutisk inert, uorganisk eller organisk eksipient for fremstilling av tabletter, belagte tabletter, dragéer, harde og myke gelatinkapsler, løsninger, emulsjoner eller suspensjoner.

10 Forbindelsene med formel I kan formuleres i blanding med en farmasøytisk akseptabel bærer. For eksempel kan forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse administreres oralt som farmakologisk akseptable salter. Fordi forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse for det meste er vannoppløselige, kan de administreres intravenøst i fysiologisk saltvannsløsning (f.eks. bufret til en pH på ca. 7,2 til 7,5). Konvensjonelle
15 buffere så som fosfater, bikarbonater eller citrater kan anvendes for dette formål. Selvfølgelig kan en fagmann på området modifisere preparatene innenfor det som er beskrevet for å oppnå en rekke preparater for en spesiell administreringsvei uten å gjøre preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse ustabile eller sette deres terapeutisk aktivitet i fare. Spesielt
20 kan modifikasjoner av foreliggende forbindelser for å gjøre dem mer oppløselige i vann eller andre konstituenten for eksempel lett oppnås med mindre modifikasjoner (saltformulering, forestring, etc.) som er ligget godt innenfor vanlig kunnskap på området. Det ligger også godt innenfor den vanlige kunnskap på området å modifisere administreringsveien og
25 doseringsopplegget for en spesiell forbindelse for å styre farmakokinetikken til foreliggende forbindelser for maksimum fordelaktig effekt hos pasienter.

30 For parenterale preparater vil bæreren vanligvis omfatte sterilt vann eller vandig natriumkloridløsning, selv om andre bestanddeler omfattende dem som bidrar til dispersjon kan inngå. Selvfølgelig må, når sterilt vann skal anvendes og holdes sterilt, preparatene og bærerene også være steriliserte. Injiserbare suspensjoner kan også fremstilles, i hvilket tilfelle egnede flytende bærere, suspenderingsmidler og lignende kan anvendes.

Egnede eksipienter for tabletter, belagte tabletter, dragéer og harde gelatinkapsler er for eksempel laktose, maisstivelse og derivater derav, talkum og stearinsyre eller dens salter.

5 Om ønsket kan tablettene eller kapslene være enterisk belagt eller frigjøringen forsinket ved standardteknikker.

Egnede eksipienter for myke gelatinkapsler er for eksempel vegetabiliske oljer, vokser, fett, halvfast og flytende polyoler.

Egnede eksipienter for injeksjonsløsninger er for eksempel vann, saltvann, alkoholer, polyoler, glyserol eller vegetabiliske oljer.

10 Egnede eksipienter for suppositorier er for eksempel naturlige og herdede oljer, vokser, fett, halvt flytende eller flytende polyoler.

Egnede eksipienter for løsninger og siruper for enteral anvendelse er for eksempel vann, polyoler, sakkarose, invertsukker og glukose.

15 De farmasøytiske preparater ifølge foreliggende oppfinnelse kan også gis som preparater med forsinket frigjøring eller andre egnede preparater.

De farmasøytiske preparater kan også inneholde konserveringsmidler, solubiliseringmidler, stabiliseringsmidler, fuktemidler, emulgeringsmidler, søtningsmidler, fargemidler, smaksstoffer, salter for justering av det osmotiske trykket, buffere, maskeringsmidler eller antioksydasjonsmidler.

20 De farmasøytiske preparater kan også inneholde andre terapeutisk aktive midler som er kjent på området.

Dosen kan variere innenfor vide grenser og vil selvfølgelig reguleres etter de individuelle krav i hvert spesielle tilfelle. For oral administrering bør en daglig dose på mellom 0,01 og 100 mg/kg kroppsvekt pr. dag være passende i monoterapi og/eller i kombinasjonsterapi. En foretrukket daglig dose er mellom 0,1 og 500 mg/kg kroppsvekt, mer foretrukket 0,1 og 100 mg/kg kroppsvekt og mest foretrukket 1,0 og 100 mg/kg kroppsvekt pr. dag. Et typisk preparat vil inneholde fra 5 vekt % til 95 vekt % aktiv forbindelse. Den daglige dosen kan administreres som en enkelt dose eller i oppdelte doser, typisk mellom 1 og 5 doser pr. dag.

25

30

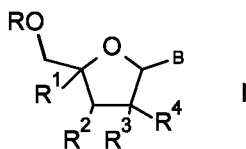
Nukleosid-derivatene eller medikamentene derav kan anvendes i monoterapi eller kombinasjonsterapi, dvs. behandlingen kan foretas sammen med administreringen av én eller flere ytterligere terapeutisk aktive substans(er), for eksempel en immunsystem-modulator så som et interferon, interleukin, tumornekrosefaktor eller kolonistimulerende faktor; et antiviralt middel eller et anti-inflammatorisk middel. Når behandlingen er kombinasjonsterapi, kan slik administrering være samtidig eller sekvensiell i forhold til administreringen av de 4'-substituerte nukleosid-derivater. Samtidig administrering, når den anvendes her, omfatter således administrering av midlene samtidig eller på forskjellige tider.

Det vil forstås at referanser til behandling her strekker seg til forebygging så vel som til behandling av eksisterende tilstander, og at behandling av dyr omfatter behandling av mennesker så vel som av andre pattedyr. Videre omfatter behandling av en Hepatitt C Virus (HCV) infeksjon, som anvendes her, også behandling eller forebygging av en sykdom eller en tilstand forbundet med eller bevirket av Hepatitt C Virus (HCV) infeksjon eller de kliniske symptomer derav.

I foreliggende beskrivelse betyr "omfatte" "innbefatter eller består av" og "omfattende" betyr "innbefattende eller bestående av".

PATENTKRAV

1. Anvendelse av forbindelser med formel I



5

hvor

R er hydrogen eller $-\text{[P(O)(OH)-O]}_n\text{H}$ og n er 1, 2 eller 3;

R¹ er C₁₋₁₂ alkyl, C₂₋₇ alkenyl, C₂₋₇ alkynyl, halogenalkyl, alkylkarbonyl, alkoksykarbonyl, hydroksyalkyl, alkoksyalkyl, alkoksy, cyano, azido, hydroksyiminometyl, alkoksyiminometyl, halogen, alkylkarbonylamino, alkylaminokarbonyl, azidoalkyl, aminometyl, alkylaminometyl, dialkylaminometyl eller heterocyklyl;

10

R² er hydrogen, hydroksy, amino, C₁₋₁₂ alkyl, hydroksyalkyl, alkoksy, halogen, cyano eller azido;

15

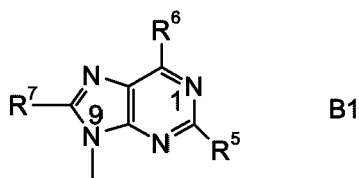
R³ og R⁴ er hydrogen, hydroksy, alkoksy, halogen eller hydroksyalkyl, forutsatt at minst én av R³ og R⁴ er hydrogen; eller

R³ og R⁴ sammen representerer $=\text{CH}_2$ eller $=\text{N-OH}$ eller

20

R³ og R⁴ begge representerer fluor;

B betyr en 9-purinyrest B1 med formel



hvor

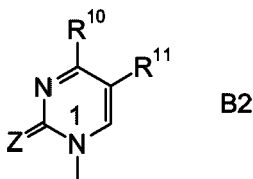
R⁵ er hydrogen, hydroksy, C₁₋₁₂ alkyl, alkoksy, alkyltio, NHR⁸, halogen eller SH;

25

R⁶ er hydroksy, NHR⁸, NHOR⁹, NHNR⁸, $-\text{NHC(O)OR}^9$ eller SH;

- 51 -

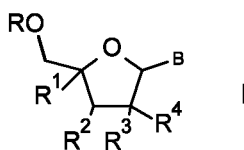
- R^7 er hydrogen, hydroksy, C_{1-12} alkyl, alkoksy, alkyltio, NHR^8 , halogen, SH eller cyano;
- R^8 er hydrogen, C_{1-12} alkyl, hydroksyalkyl, arylkarbonyl eller alkylkarbonyl;
- R^9 er hydrogen eller C_{1-12} alkyl;
- $R^{9'}$ er C_{1-12} alkyl; eller
- B betyr en 1-pyrimidylrest B2 med formel



hvor

- Z er O eller S;
- R^{10} er hydroksy, NHR^8 , $NHOR^9$, $NHNR^8$, $-NHC(O)OR^9$ eller SH;
- R^{11} er hydrogen, C_{1-12} alkyl, hydroksy, hydroksyalkyl, alkoksyalkyl, halogenalkyl eller halogen;
- R^8 , R^9 og $R^{9'}$ er som definert ovenfor;
- og av farmasøytisk akseptable salter derav; for fremstilling av et medikament for behandling av sykdommer mediert av Hepatitt C Virus (HCV).

2. Anvendelse ifølge krav 1 av forbindelser med formel I



hvor

- R er hydrogen;
- R^1 er C_{1-12} alkyl, C_{2-7} alkenyl, C_{2-7} alkynyl, halogenalkyl, alkylkarbonyl, alkoksy, hydroksymetyl, cyano, azido, alkoksyiminometyl, alkylkarbonylamino, alkylaminometyl eller dialkylaminometyl;
- R^2 er hydrogen, hydroksy, alkoksy eller halogen;

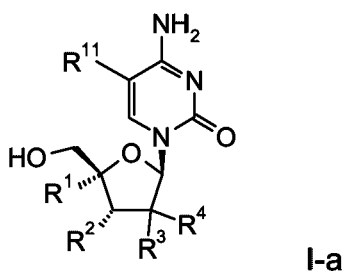
- 52 -

R^3 og R^4 er hydrogen, hydroksy, alkoksy, halogen eller hydroksyalkyl, forutsatt at minst én av R^3 og R^4 er hydrogen; eller

R^3 og R^4 representerer fluor; og

5 B betyr en 9-purinyrest B1 eller en 1-pyrimidylrest B2 som definert i krav 1.

3. Anvendelse ifølge krav 1 eller krav 2 av forbindelsene med formel



hvor

10 R^1 er C_{1-12} alkyl, C_{2-7} alkenyl, C_{2-7} alkynyl, halogenalkyl, alkylkarbonyl, alkoksy, hydroksymetyl, cyano, azido, alkoksyiminometyl, alkylkarbonylamino, alkylaminometyl eller dialkylaminometyl;

R^2 er hydrogen, hydroksy, alkoksy eller halogen;

15 R^3 og R^4 er hydrogen, hydroksy, alkoksy, halogen eller hydroksyalkyl, forutsatt at minst én av R^3 og R^4 er hydrogen; eller

R^3 og R^4 representerer fluor;

R^{11} er hydrogen, C_{1-12} alkyl, hydroksy, hydroksyalkyl, alkoksyalkyl, halogenalkyl eller halogen:

20

og farmasøytisk akseptable salter derav.

4. Anvendelse av forbindelser ifølge krav 3, hvor forbindelsene er 4'-C-etynylcytidin-hydroklorid (1:1),

25

4'-C-etoksytytidin eller

4'-C-acetyltytidin.

- 53 -

5. Anvendelse av forbindelse ifølge krav 3, hvor forbindelsen er 4'-C-azidocytidin.

5 6. Anvendelse av et farmasøytisk preparat på basis av en farmasøytisk effektiv mengde av en forbindelse med formel I eller I-a eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav som definert i hvilket som helst av kravene 1 til 5 for fremstilling av et medikament for behandling av sykdommer mediert av hepatitt C virus (HCV).