

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **211936**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **381955**

(51) Int.Cl.

**C07H 19/06 (2006.01)**

**A61K 31/7052 (2006.01)**

**A61P 31/12 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **12.03.2007**

---

(54) **Pochodne urydyny jako związki przeciwwirusowe,  
zwłaszcza przeciwko wirusom z rodziny Flaviviridae**

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**15.09.2008 BUP 19/08**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**31.07.2012 WUP 07/12**

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA ŚLĄSKA, Gliwice, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ILONA WANDZIK, Gliwice, PL**

**GABRIELA PASTUCH-GAWOŁEK, Gliwice, PL**

**WIESŁAW SZEJA, Żernica, PL**

**BOGUSŁAW SZEWCZYK, Gdańsk, PL**

**EWELINA KRÓL, Gdynia, PL**

**GRZEGORZ GRYNKIEWICZ, Łomianki, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Urszula Ziółkowska**

---

**PL 211936 B1**

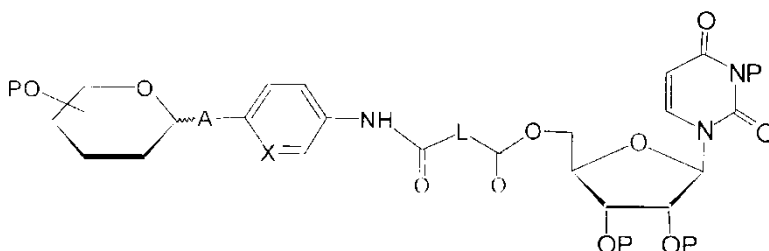
## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są kompleksowe pochodne cukrów i urydyny - związki o właściwościach przeciwwirusowych w stosunku do wirusów z rodziny Flaviviridae, do których należy wirus zapalenia wątroby typu C (wzw c) o strukturze przedstawionej wzorem I i wzorem II, w których urydyna lub jej pochodne połączona jest z jednostką cukrową, którą stanowią mono-, di-, lub trisacharydy wiązaniem glikozydowym i lub tioglikozydowym poprzez łącznik L zawierający od dwu do dwudziestu atomów węgla.

Wirus zapalenia wątroby typu c (wzw c) został zidentyfikowany w 1989 r. i należy do szczególnie groźnych patogenów, powodując zakażenie milionów ludzi na świecie. (Choo, Q.L. i wsp., *Science* 244, 359, 1989). Wirus należy do rodziny *Flaviviridae*, małych wirusów, zawierających jednoniciowe RNA o dodatniej polarności jako materiał genetyczny. Jest on głównym patogenem powodującym wirusowe zapalenie wątroby prowadzące często do groźnych powikłań. W przypadku wirusa zapalenia wątroby typu C (wzw C, HCV) u około 80% zakażonych następuje ostre chroniczne zapalenie wątroby, co może stać się przyczyną marskości wątroby lub pierwotnego raka wątroby. Według danych statystycznych rozpowszechnienie zakażeń HCV jest bardzo duże; ocenia się, że zależnie od kraju, od 0,2% do 2% ludzi jest zakażonych tym wirusem. Według niektórych danych (Sherlock, S., *Antiviral Res.* 52, 77, 2001), na całym świecie liczba osób zakażonych przekracza 170 mln. Niestłumienie szybki wzrost liczby zakażeń wirusem HCV może doprowadzić do tego, że pod koniec obecnej dekady wirus HCV stanie się główną przyczyną śmiertelności spowodowanej przez wirusy i może stanowić znacznie ważniejsze zagrożenie niż zakażenia wywołane wirusem HIV. Możliwości leczenia wirusowego zapalenia wątroby są w obecnej chwili niewielkie, a skuteczność terapii bardzo niska. Stosowany jest najczęściej interferon  $\alpha$ , sam lub w połączeniu z rybawiryną (analog guanozyny). Trwała odpowiedź na tego typu leczenie następuje u 10-20% chorych przy leczeniu samym interferonem, a przy leczeniu skojarzonym - u ok. 30% pacjentów (Mc Hutchison, J.G. i wsp., *New England J. Med* 339, 1485, 1998). Zarówno interferon, jak i rybawiryną dają przy tym silne efekty uboczne, co czasami eliminuje możliwość ich stosowania. Terapia taka jest ponadto bardzo kosztowna i wymaga hospitalizacji, co ogranicza możliwości jej szerokiego stosowania.

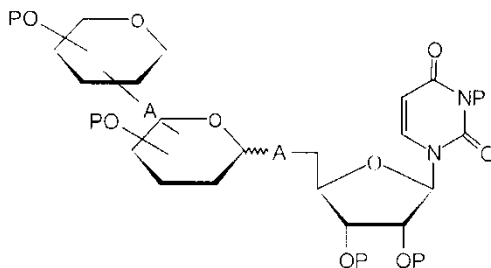
Dla stworzenia nowych metod leczenia muszą powstać preparaty selektywnie hamujące adsorbcję wirusa, replikację jego materiału genetycznego oraz dojrzewanie cząstek wirusowych.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono nieoczekiwanie, że glikokoniugaty pochodne cukrów i urydyny hamują adsorbcję i replikację wirusa. Pochodne urydyny o wzorze :



według wynalazku charakteryzują się tym, że urydyna lub jej pochodne połączona jest z arylo-O-glikozydem (A=O, X=C) lub hetarylo-O-glikozydem

(A=O, X=N) lub z arylo-S-glikozydem (A=S, X=C) lub hetarylo-S-glikozydem (A=S, X=N) poprzez łącznik alkilowy (L) zawierający od jednego do czterech atomów węgla, gdzie P oznacza grupy ochronne alkilowe, acylowe, silylowe lub wodór. Pochodne urydyny o wzorze:



według wynalazku charakteryzują się tym że urydyna lub jej pochodne połączona jest wiązaniem O-glikozydowym (A=O) lub wiązaniem S-glikozydowym (A=S) z jedną lub dwiema jednostkami 2-deoksycukrów, gdzie P oznacza grupy ochronne alkilowe, acylowe, silylowe lub wodór.

Dążąc do poznania pierwszych etapów rozwoju wirusa, tj. jego adsorpcji na powierzchni komórki stosowano jako model badawczy pokrewnego wirusa zwierzęcego należącego do rodzaju *Pestivirus* w rodzinie *Flaviviridae* - wirusa klasycznej świńskiej gorączki (CSFV). Stosowanie modelu zastępczego jest konieczne, ponieważ wirus zapalenia wątroby typu C nie namnaża się w hodowlach *in vitro*, a jedynym modelem zwierzęcym są małe człokształtne.

Kolejnym etapem była ekspresja genów glikoprotein E0 i E2 w systemie bakulowirusowym i badanie wpływu wybranych inhibitorów na powstawanie tych glikoprotein. Badania nad uczestniczącymi w adsorpcji glikoproteinami otoczkowymi HCV i CSFV doprowadziły do racjonalnego zaprojektowania selektywnych terapeutyków blokujących wejście wirusa do komórki gospodarza, a co za tym idzie jego namnażanie.

Wyniki badań dokumentujące własności przeciwwirusowe kompleksowych glikokoniugatów pochodnych urydyny oraz ich syntezę przedstawiono poniżej.

#### Badania biologiczne.

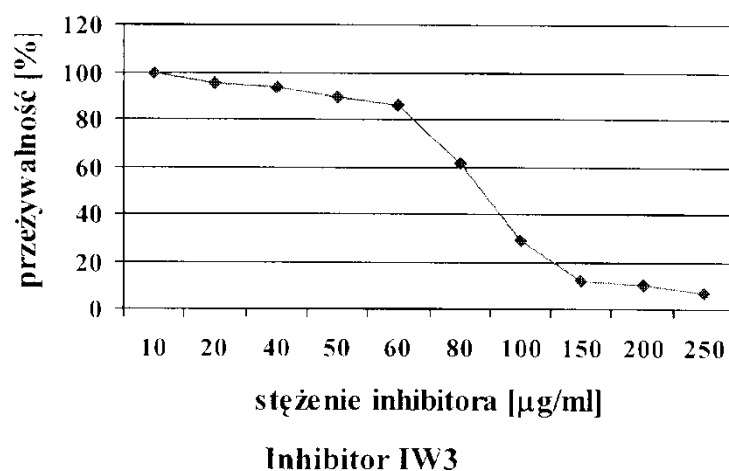
#### **P r z y k ł a d 1. Badanie wpływu syntetycznych inhibitorów N-glikozylacji na rozwój wirusa CSFV w komórkach nerki świńskiej SK6.**

Dawkę podawanego związku określono za pomocą testu cytotoksycznego z czerwienią obojętną. Na płytkę zawierającą komórki SK6 dodawano badany inhibitor zmieniając w szerokim zakresie jego ilość. Płytki inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 37°C. Po dodaniu czerwieni obojętnej kontynuowano inkubację przez 3 godziny. Następnie dodano wodno-alkoholowy 1% roztwór kwasu octowego i oznaczono spektrofotometrycznie ilość uwolnionej czerwieni obojętnej mierząc absorbcję przy długości fali 490 nm. Wyniki przedstawiono na wykresie 1.

Po ustaleniu optymalnej dawki inhibitora, czyli takiej, przy której przeżywalność komórek SK6 jest większa niż 50%, badano wpływ syntetycznych inhibitorów N-glikozylacji na rozwój wirusa CSFV w komórkach nerki świńskiej SK6. W tym celu do jednej płytki M-12 zawierającej komórki SK6 dodawano różne, ustalone wcześniej dawki potencjalnego inhibitora, a po 30 minutach dodawano wirusa CSFV. Ma to na celu sprawdzenie, czy inhibitor blokuje wnikanie wirusa do komórki.

Drugą płytkę M-12 z komórkami SK6 zakażano wirusem, a po 1,5 h (po tym czasie wirus jest już w komórkach) dodawano inhibitora, w celu sprawdzenia jak inhibitor wpływa na namnażanie się wirusa. Hodowle prowadzono przez 48 h, a po tym czasie przeprowadzano test IPMA (ImmunoPeroxidase Monolayer Assay) za pomocą surowicy poliklonalnej anty E0. Komórki zakażone CSFV są zabarwione na czerwono i widoczne gołym okiem, więc w ten sposób można porównać ilość i wielkość pseudoosyniek w porównaniu z kontrolami (1 - komórki SK6 bez wirusa CSFV i bez inhibitora, 2 - komórki SK6 zakażone wirusem CSFV, ale bez dodatku inhibitora). Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Analiza danych wskazuje, że inhibitory GP-U1, GP-U2, GPU-3, IW-2, IW-3, IW-6, IW-7, IW-9 wykazywały hamowanie namnażania się wirusa CSFV w komórkach nerki świńskiej SK6.



**Wykres 1.** Wykres przedstawiający przeżywalność komórek SK6 (%) w zależności od stężenia inhibitora (µg/ml). Jako przykład podano inhibitor IW3.

Tabela 1  
WYNIKI - KOMÓRKI SSACZE:

Nazwa inhibitora	Dawka	Przeżywalność	Inhibitor + wirus	Wirus + inhibitor
1	2	3	4	5
<b>IW-1</b>	20 µg/ml	96%	+	+
	10 µg/ml	100%	+++	+++
<b>IW-2</b>	50 µg/ml	68%	---	---
	40 µg/ml	70%	---	---
	30 µg/ml		+++	+++
	20 µg/ml	100%	+++	+++
<b>IW-3</b>	80 µg/ml	61%	---	---
	60 µg/ml	86%	---	---
	50 µg/ml	89%	---	---
	20 µg/ml	95%	---	---
<b>IW-4</b>	140 µg/ml	53%	+++	+++
	130 µg/ml	87%	+++	+++
	120 µg/ml	93%	+++	+++
	110 µg/ml	95%	+++	+++
<b>IW-5</b>	8 µg/ml	92%	+	+
	7 µg/ml	97%	++	++
	6 µg/ml	98%	+++	+++
	5 µg/ml	100%	+++	+++
<b>IW-6</b>	150 µg/ml	51%	---	---
	120 µg/ml	63%	---	---
	80 µg/ml	78%	---	---
	30 µg/ml	99%	---	---
<b>IW-7</b>	15 µg/ml	57%	---	---
	12 µg/ml	96%	---	---
	10 µg/ml	96%	+	---
	5 µg/ml	96%	++	++
<b>IW-9</b>	180 µg/ml	89%	---	---
	120 µg/ml	93%	+	+
	50 µg/ml	98%	++	++
	30 µg/ml	99%	+++	+++
<b>GP-U1</b>	140 µg/ml		---	---
	120 µg/ml	82%	---	+
	80 µg/ml	90%	+++	+++
	30 µg/ml	98%	+++	+++

cd. tabeli 1

1	2	3	4	5
<b>GP-U2</b>	140 µg/ml		---	---
	120 µg/ml	80%	---	---
	80 µg/ml	90%	---	+
	30 µg/ml	99%	+++	+++
<b>GP-U3</b>	50 µg/ml	55%	---	---
	30 µg/ml	82%	---	---
	10 µg/ml		++	++

--- brak pozytywnych komórek (całkowite zahamowanie namnażania się wirusa CSFV lub brak ekspresji glikoprotein otoczkowych)

+ mała ilość pozytywnych komórek [%] (dobre zahamowanie namnażania się wirusa CSFV)

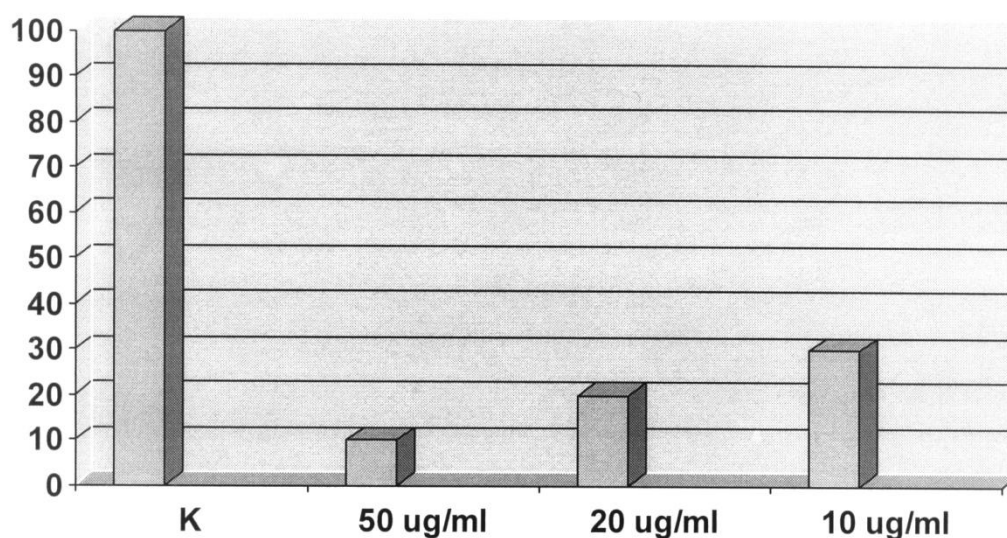
++ średnia ilość pozytywnych komórek [%] (średnie zahamowanie namnażania się wirusa CSFV)

+++ duża ilość pozytywnych komórek (podobnie jak na kontroli) [%] (brak zahamowania namnażania się wirusa CSFV)

W celu określenia ilości nowopowstałych cząstek wirusa CSFV pod wpływem działania różnych dawek inhibitorów, wykonano miareczkowanie supernatantów zebranych z komórek SK6 z płytek po zakażeniu wirusem CSFV. Przykładowo podano wyniki dla inhibitora IW3 w tabeli 2 i rysunku 2.

Tabela 2  
INHIBITOR IW 3

Dawka	Przeżywalność	Inhibitor+wirus	Wirus+inhibitor
<b>60 µg/ml</b>	<b>86%</b>	<b>Brak pseudołysinek</b>	<b>Brak pseudołysinek</b>
<b>50 µg/ml</b>	<b>89%</b>	<b>Brak pseudołysinek</b>	<b>Brak pseudołysinek</b>
20 µg/ml	95%	Pojedyncze pseudołysinki	Pojedyncze pseudołysinki
10 µg/ml	100%	Liczne pseudołysinki	Liczne pseudołysinki



**Wykres 2.** Ilość nowopowstałych cząstek wirusowych (%) w obecności różnych dawek inhibitora IW 3.

Tabela 3  
WYNIKI - KOMÓRKI OWADZIE:

Nazwa inhibitora	Dawka	Przeżywalność	Inhibitor + bakulowirus	Bakulowirus + inhibitor
IW-2	60 µg/ ml	55%	---	---
	50 µg/ml	76%	+	+
	30 µg/ml	82%	++	++
	20 µg/ml	93%	++	++
IW-3	60 µg/ml	53%	---	---
	40 µg/ml	68%	+	+
	20 µg/ ml	98%	++	++
	10 µg/ml	100%	+++	+++
IW-7	15 µg/ml	95%	+	+
	12 µg/ml	97%	++	++
	10 µg/ml	98%	++	++
	5 µg/ml	100%	+++	+++
GP-UI	80 µg/ ml	56%	+	+
	60 µg/ml	68%	++	++
	50 µg/ml	84%	++	++
	30 µg/ml	86%	+++	+++
GP-U2	80 µg/ml	51%	+	+
	60 µg/ml	75%	++	++
	50 µg/ml	77%	++	++
	30 µg/ml	88%	+++	+++
GP-U3	60 µg/ml	56%	+	+
	50 µg/ml	62%	++	++
	40 µg/ml	70%	++	++
	20 µg/ml	83%	+++	+++

--- brak pozytywnych komórek (całkowite zahamowanie namnażania się bakulowirusa lub brak ekspresji glikoprotein otoczkowych)

+ mała ilość pozytywnych komórek [%>] (dobre zahamowanie namnażania się bakulowirusa)

++ średnia ilość pozytywnych komórek [%] (średnie zahamowanie namnażania się bakulowirusa)

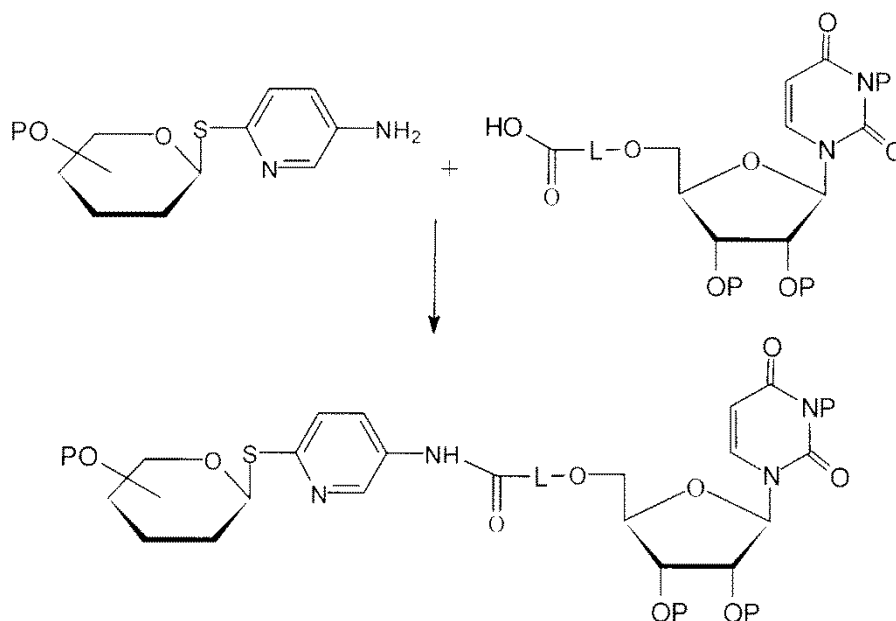
+++ duża ilość pozytywnych komórek (podobnie jak na kontroli) [%] (brak zahamowania namnażania się bakulowirusa)

Inhibitory IW-2, IW-3 wykazywały hamowanie namnażania się bakulowirusa E0 lub E2 w komórkach owadzych Sf9.

### Synteza glikokoniugatów, pochodnych urydyny jako związków przeciwwirusowych

#### Przykład 1. Synteza glikokoniugatów o wzorze ogólnym I.

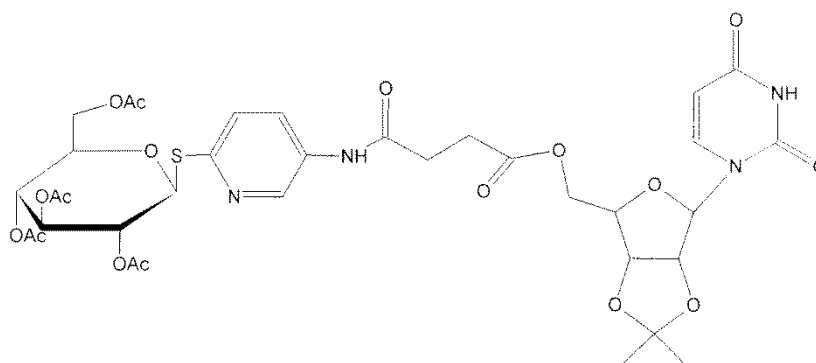
Schemat ogólny syntezy glikokoniugatów o wzorze I przedstawiono na schemacie 1.



Schemat 1

**Przykład szczegółowy syntezy GP-U1, GP-U2 oraz GP-U3.**

N-[6-((2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozyd-1-yl)tio-pirydyn-3-yl)amino-4-okso-butanian-5-[(3-benzoilo-2,4-dioksa-3,4-dihydro-2H-pirymidyn-1-yl)]-2',3'-di-O-izopropylideno-3-D-rybofuranozyd-5'-ylu (GP-U1)



GP-U1

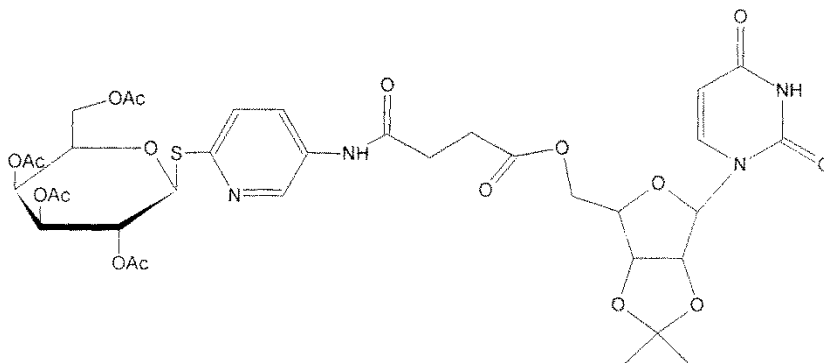
Pochodną kwasu butanowego **1** (425 mg, 0.843 mmola) i (5-amino-2-pirydylo) 2,3,4,6-tetra-O-acetylo-1-tio-β-D-glukopiranozyd (384 mg, 0.843 mmola) rozpuszczono w pirydynie (5 ml), następnie dodano DMAP (4-dimetyloaminopirydyna) (21 mg, 0.169 mmola) i DCC (N,N-dicykloheksylokarbodiimid) (174 mg, 0.843 mmola). Pozostawiono na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 17 h. Po tym czasie mieszaninę rozcieńczono chlorkiem metylenu (50 ml), przemyto wodą (3x 20 ml), osuszono bezwodnym siarczanem sodu i po odsączeniu środka suszącego zatężono na wyparce rotacyjnej. Pirydynę odpędzono z toluenem. Produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej w gradiencie układu elującego chloroform:metanol (rozpoczynając od samego chloroformu do stosunku eluentów 30:1). Otrzymano 158 mg (22.8% wyd.) białego produktu.  $[\alpha]_D^{20} = -5.4$  (CHCl<sub>3</sub>, c=1.6)

<sup>1</sup>H NMR δ (ppm): 1.32, 1.55 (2xs, 6H, CH<sub>3</sub>); 2.02, 2.04, 2.04 (3xs, 12H, CH<sub>3</sub>CO); 2.65-2.78 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 3.88 (ddd, 1H, J=2.4 Hz, J=4.0 Hz, J=10.1 Hz, H-5glu); 4.10 (dd, 1H, J=3.3 Hz, J=12.3 Hz, H-6glu); 4.26 (dd, 1H, J=4.4 Hz, J=12.5 Hz, H-6aglu); 4.32-4.40 (m, 3H, H-4'uryd, H-5'uryd, H-5'auryd); 4.85 (dd, 1H, J=3.3 Hz, J=6.3 Hz, H-3'uryd); 5.05 (dd, 1H, J=1.6 Hz, J=6.4 Hz, H-2'uryd); 5.15 (d, 1H, J=9.5 Hz, H-2glu); 5.18 (d, 1H, J=9.2 Hz, H-4glu); 5.35 (dd-t, 1H, J=9.3 Hz, H-3glu); 5.62 (d, 1H, J=1.5 Hz, H-1'uryd); 5.65 (d, 1H, J=10.4 Hz, H-1glu); 5.70 (d, 1H, J=7.9 Hz, H-5uryd); 7.2

(d, 1H, J=8.6 Hz, H-3pir); 7.35 (d, 1H, J=8.1 Hz, H-6uryd); 7.98 (dd, 1H, J=2.6 Hz, J=8.7 Hz, H-4pir); 8.52 (d, 1H, J=2.4 Hz, H-6pir); 8.75 (s, 1H, NH uryd).

<sup>13</sup>C NMR δ (ppm): 20.80; 20.82; 20.89; 20.95 (CH<sub>3</sub>CO); 25.40, 25.31 (CH<sub>3</sub>); 29.33, 31.71 (CH<sub>2</sub>); 62.20 (C-6glu); 64.52 (C-5'uryd); 68.47 (C-4glu); 69.85 (C-2glu); 74.25 (C-3glu); 75.97 (C-5glu); 81.17 (C-3'uryd); 82.70 (C-1'uryd); 84.67 (C-2'uryd); 85.57 (C-4'uryd); 95.45 (C-1glu); 102.57 (C-5uryd); 124.04, 128.33, 133.55, 141.27, 149.43 (C-pir); 143.09 (C-6uryd); 150.38 (C-4uryd), 164.11 (C-2uryd), 169.71, 169.80, 170.41, 170.68, 171.02, 172.86 (C-O)

N-[6-((2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-galaktopiranozyd-1-yl)tio-pirydyn-3-yl)amino-4-okso-butanian-5-  
-[3-benzoilo-2,4-dioksa-3,4-dihydro-2H-pirymidyn-1-yl)]1-2',3'-di-O-izopropylideno-β-D-rybofuranozyd-  
-5'-ylu (GP-U2)



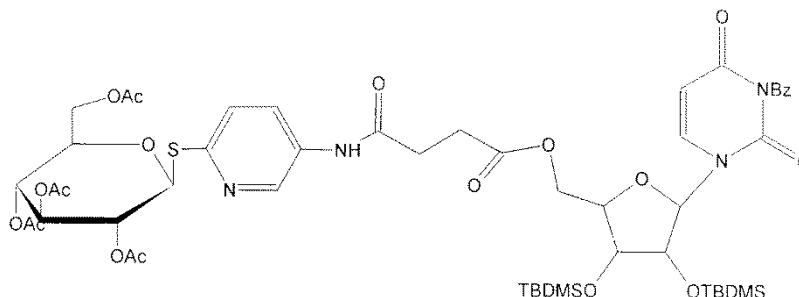
**GP-U2**

Pochodną kwasu butanowego **1** (350 mg, 0.695 mmola) i (5-amino-2-pirydylo) 2,3,4,6-tetra-(9-ace-tylo-1-tio-β-D-galaktopiranozyd (318 mg, 0.695 mmola) rozpuszczono w pirydynie (5 ml), następnie dodano DMAP (17 mg, 0.139 mmola) i DCC (143 mg, 0.695 mmola).

Pozostawiono na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 19 h. Po tym cza-sie mieszaninę rozcieńczono chlorkiem metylenu (50 ml), przemyto wodą (3x 20 ml), osuszono bez-wodnym siarczanem sodu i po odsączeniu środka suszącego zatężono na wyparce rotacyjnej. Pirydy-nę odpędzono z toluenem. Produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej w gradiencie układu eluującego chloroform:metanol (rozpoczynając od samego chloroformu do stosunku eluentów 30:1). Otrzymano 59 mg (10.4% wyd.) białego osadu.

<sup>1</sup>H NMR δ (ppm): 1.35, 1.58 (2xs, 6H, CH<sub>3</sub>); 1.99, 1.99, 2.03 (3xs, 12H, CH<sub>3</sub>CO); 2.56-2.82 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 3.81 (dd, 1H, J=3.7 Hz, J=12.1 Hz, H-6gal); 3.92 (dd, 1H, J=3.3 Hz, J=12.2 Hz, H-6agal); 4.11 (m, 1H, H-5gal); 4.26-4.39 (m, 3H, H-4'uryd, H-5'uryd, H-5'auryd); 4.83 (dd, 1H, J=3.2 Hz, J=6.5 Hz, H-3'uryd); 5.02 (dd, 1H, J=2.2 Hz, J=6.3 Hz, H-2'uryd); 5.16 (dd, 1H, J=3.7 Hz, J=10.0 Hz, H-3gal); 5.38 (dd-t, 1H, J=10.0 Hz, H-2gal); 5.47 (d, 1H, J=3.2 Hz, H-4gal); 5.57 (d, 1H, J=10.5 Hz, H-1gal); 5.68 (d, 1H, J=2.0 Hz, H-furyd); 5.68 (d, 1H, J=8.1 Hz, H-5uryd); 5.84-6.20 (s, 1H, NH); 7.23 (d, 1H, J=8.6 Hz, H-3pir); 7.36 (d, 1H, J=8.1 Hz, H-6uryd); 7.96 (dd, 1H, J=2.7 Hz, J=8.6 Hz, H-4pir); 8.40 (d, 1H, J=2.2 Hz, H-6pir).

N-[6-((2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozyd-1-yl)tio-pirydyn-3-yl)amino-4-okso-butanian-5-  
-[3-benzoilo-2,4-dioksa-3,4-dihydro-2H-pirymidyn-1-yl)]1-2',3'-di-(9-tertbutylodimetylosililo-3-D-rybofu-  
ranozyd-5'-ylu (GP-U3)



**GP-U3**



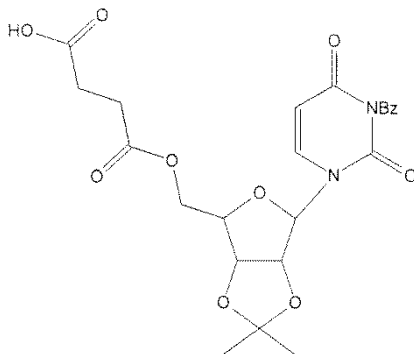
Pochodną kwasu butanowego 2 (200 mg, 0.289 mmola) i (5-amino-2-pirydylo) 2,3,4,6-tetra-O-acetylo-1-tio-β-D-glukopiranozyd (132 mg, 0.289 mmola) rozpuszczono w pirydynie (5 ml), następnie dodano DMAP (7.1 mg, 0.058 mmola) i DCC (60 mg, 0.289 mmola). Pozostawiono na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 20 h. Po tym czasie mieszaninę zatężono na wyparce rotacyjnej, a pirydynę odpędzono z toluenem. Produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej w gradiencie układu eluującego chloroform:heksan (od 2:1 do 10:1) a następnie chloroform:metanol (rozpoczynając od samego chloroformu do stosunku eluentów 30:1). Otrzymano 46 mg (14.1% wyd.) białego osadu,  $[\alpha]_D^{20} = 5.6$  (CHCl<sub>3</sub>, c=0.9), t.t.=143-144°C

<sup>1</sup>H NMR δ (ppm): 0.06, 0.07, 0.08, 0.10 (4xs, 12 H, CH<sub>3</sub>); 0.88, 0.89 (2xs, 18 H, CH<sub>3</sub>); 2.02, 2.03, 2.04 (3xs, 12H, CH<sub>3</sub>CO); 2.62-2.82 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 3.86 (ddd, 1H, J=2.4 Hz, J=4.4 Hz, J=9.9 Hz, H-5glu); 4.09 (dd, 1H, J=2.2 Hz, J=10.1 Hz, H-6glu); 4.10 (dd, 1H, J=4.5 Hz, J=10.2 Hz, H-6aglu); 4.20-4.32 (m, 4H, H-3'uryd, H-2'uryd, H-4'uryd, H-5'uryd); 4.48 (dd, 1H, J=3.8 Hz, J=9.15 Hz, H-5'auryd); 5.15 (d, 1H, J=9.3 Hz, H-4glu); 5.19 (dd~t, 1H, J=10.4 Hz, H-2glu); 5.34 (dd~t, 1H, J=9.3 Hz, H-3glu); 5.68 (d, 1H, J=3.3 Hz, H-1'uryd); 5.68 (d, 1H, J=10.3 Hz, H-1glu); 5.90 (d, 1H, J=8.2 Hz, H-5uryd); 7.19 (d, 1H, J=8.6 Hz, H-3pir); 7.46-7.54 (m, 2H, H-ar); 7.66 (m, 1H, H-ar); 7.77 (d, 1H, J=8.2 Hz, H-6uryd); 7.88-7.96 (m, 3H, H-4pir, H-ar); 8.49 (d, 1H, J=2.6 Hz, H-6pir).

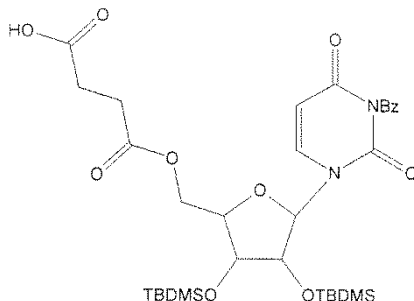
<sup>13</sup>C NMR δ (ppm): -4.34, -4.81, -4.60, -5.04 (CH<sub>3</sub>); 17.92 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 20.80, 20.57; 20.65; 20.70 (CH<sub>3</sub>CO); 25.72 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 28.97, 31.36 (CH<sub>2</sub>); 61.89, 62.86 (C-5'uryd); 68.20 (C-4glu); 69.51 (C-2glu); 70.87 (C-3'uryd); 74.06 (C-3glu); 74.91 (C-2'uryd); 75.82 (C-5glu); 81.31 (C-4'uryd); 82.31 (C-1'uryd); 91.42 (C-1glu); 102.03 (C-5uryd); 123.61, 128.11, 131.29, 132.69, 140.97 (Cpir); 129.16, 130.49, 135.23 (C<sub>arom</sub>); 140.37 (C-6uryd); 149.04 (C-4uryd); 162.16 (C-2uryd), 169.41, 169.51, 169.69, 170.12, 170.65, 172.22 (C=O).

#### Pochodne kwasu butanowego:

Monobursztynian 5-[(3-benzoilo-2,4-dioksa-3,4-dihydro-2H-pirydyn-1-yl)]-2',3'-di-O-izopropylideno-β-D-rybofuranozyd-5'-ylu (1)



Monobursztynian 5-[(3-benzoilo-2,4-dioksa-3,4-dihydro-2H-pirydyn-1-yl)]-2,3'-di-O-tertbutylo-dimetylosililo-β-D-rybofuranozyd-5'-ylu (2)

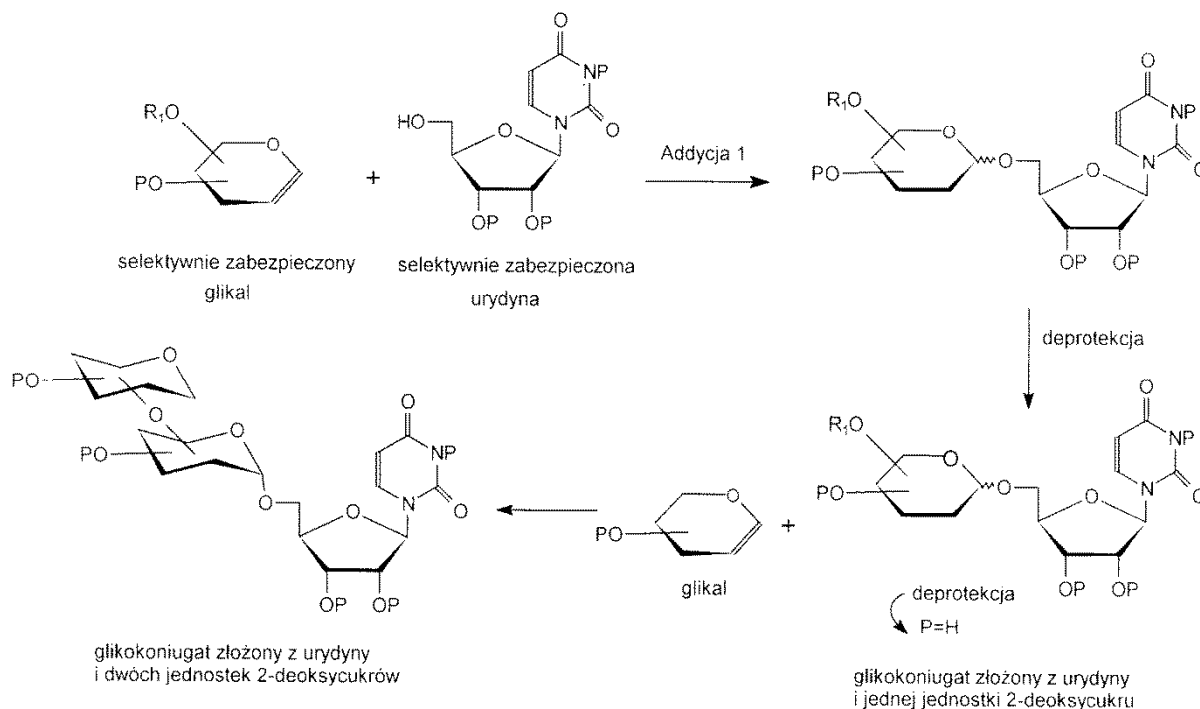


**P r z y k ł a d 2.** Synteza glikokoniugatów o wzorze ogólnym II.

Schemat ogólny syntezy glikokoniugatów o wzorze II przedstawiono na schemacie 2.

Syntezę glikokoniugatów o wzorze ogólnym II przeprowadzono w wyniku reakcji addycji odpowiednio zabezpieczonych pochodnych urydyny do wiązania podwójnego ortogonalnie zabezpieczonych pochodnych glikali. Stosowano warunki addycji Falcka-Mioskowskiego wobec TPHB (bromowodorem trifenylfosfiny) jako katalizatora (Bolitt V. i współpracownicy, *J. Org. Chem.*, **55**, 5812 (1990)).

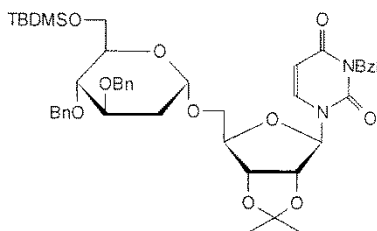
Otrzymany w wyniku Addycji 1 glikokoniugat złożony z urydyny i jednej jednostki 2-deoksycukru został przygotowany do kolejnej addycji 2 poprzez ortogonalną deprotekcję w części monosacharydowej. W wyniku addycji 2 otrzymano glikokoniugaty złożone z urydyny i dwóch jednostek 2-deoksycukrów.



Schemat 2

### Przykład szczegółowy syntezy IW3, IW4 oraz IW7.

3,4-di-O-benzyl-6-O-t-butyldimetylosililo-2-deoksy- $\alpha$ -D-glukopioranozylo-(1 $\rightarrow$ 5)-N<sup>3</sup>-benzoilo-2,3'-O-izopropylidenourydyna IW3



IW3

**Addycja 1.** 3,4-di-O-benzyl-6-O-t-butyldimetylosililo-D-glukal (0.3 mmol) i N<sup>3</sup>-benzoilo-2',3'-O-izopropylidenourydynę (0.3 mmol) rozpuszczono w CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml) i mieszano przez 15 minut w obecności sit molekularnych 4A. Następnie dodano katalityczną ilość TPHB (0.03 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej do całkowitego przereagowania glikalu. Przebieg reakcji kontrolowano metodą TLC w układzie toluen : octan etylu 8:1 (v:v). Po zakończeniu reakcji odsączano sита molekularne, przesącz rozcieńczono chlorkiem metylenu (30 ml), przemywano 10% roztworem wodorowęglanu sodowego (30 ml), a następnie wodą (3x15 ml). Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zateżono na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej stosując układ rozpuszczalników heksan : octan etylu 3:1 (v:v). Wydajność **IW3** 75%, białe kryształy,  $t_f = 71-73^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{20} = +12,67^\circ$  (c= 1,5; CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR  $\delta$  (ppm) 0.01, 0.06 (2s, 6H, Si[C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]), 0.90 (s, 9H, Si[C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]), 1.34, 1.54 (2s, 6H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.69 (ddd, 1H,  $J_{2''ax,1''} = 3.7$  Hz,  $J_{2''ax,3''} = 1.4$  Hz,  $J_{2''ax,2''eq} = 12.5$  Hz, H-2''ax), 2.14 (ddd, 1H,  $J_{2''eq,1''} \approx 0$  Hz,  $J_{2''eq,3''} = 4.0$  Hz,  $J_{2''eq,2''ax} = 12.5$  Hz, H-2''eq), 3.47-3.92 (m, 7H, H-5'a,b, H-3'', H-4'', H-5'', H-6''a,b), 4.37-4.42 (m, 1H, H-4'), 4.64,97 (q<sub>AB</sub>, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.66 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.67-4.77 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.90 (d, 1H,  $J_{1'',2''ax} = 2.7$  Hz, H-1''), 5.77 (d, 1H,  $J_{5,6} = 8,3$  Hz, H-5), 5.82 (d, 1H,  $J_{1,2'} = 2.4$  Hz,

H-Ph), 7.27-7.39 (m, 10H, 2-CH<sub>2</sub>Ph), 7.43-7.50 (m, 2H, Ph(m)), 7.54 (d, 1H, J<sub>6,5</sub>=8.1 Hz, H-6), 7.59-7.65 (m, 1H, Ph(P)), 7.89-7.95 (m, 2H, Ph(o)).

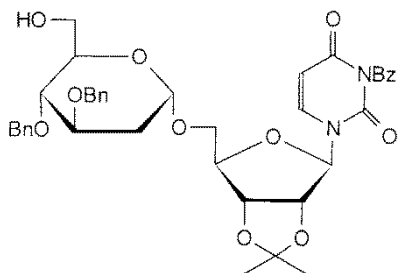
<sup>13</sup>C NMR δ (ppm) -5.31, -5.11 (Si[C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]), 18.33 (Si[C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]), 25.44, 27.27 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.94 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 35.51 (C-2"), 62.36 (C-5'), 66.86, 72.92, 76.81, 78.04 (C-3", C-4", C-5", C-6"), 71.92, 75.17 (2-CH<sub>2</sub>Ph), 80.76 (C-3'), 85.18 (C-2'), 85.68 (C-4'), 93.79 (C-1'), 97.53 (C-1"), 101.92 (C-5), 114.30 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 127.77, 127.79, 127.83, 128.13, 128.47 (2-CH<sub>2</sub>Ph), 129.19 (Ph(m)), 130.50 (Ph(o)), 131.40 (Ph(C<sub>IV</sub>)), 136.13 (Ph(p)), 138.33, 138.43 (2-CH<sub>2</sub>Ph(C<sub>IV</sub>)), 140.48 (C-6), 149.10 (C-2), 161.94 (C-4), 168.32 (PhCO).

**LR ESI-MS:** *m/z* dla C<sub>45</sub>H<sub>56</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>SiNa ([M+Na]<sup>+</sup>)

obliczono: 851.36

oznaczono: 851.3.

3,4-di-O-benzylo-2-deoksy-α-D-glukopioranozylo-(1→5)-N<sup>3</sup>-benzoilo-2',3'-O-izopropylidenourydyna IW7



IW7

**Deprotekcja 1. Desililacja.** Do roztworu substratu **IW3** (0.2 mmola) w THF (3 ml) dodano Bu<sub>4</sub>NF\*3H<sub>2</sub>O (0.44 equiv). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej, przebieg reakcji kontrolowano metodą TLC w układzie toluen : octan etylu 2:1 (v:v). Po zakończeniu reakcji do mieszaniny reakcyjnej dodano CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 ml) oraz wodę (10 ml), wytrząsano intensywnie, po czym warstwę wodną odrzucono. Warstwę organiczną przemyto wodą (2x10 ml), suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączono środek suszący, a przesącz zateżono na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej stosując układ rozpuszczalników heksan : octan etylu 1:1 (v:v). Wydajność **IW7** 83%, krzepnący olej, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +26,79° (c=1,00; CHCl<sub>3</sub>).

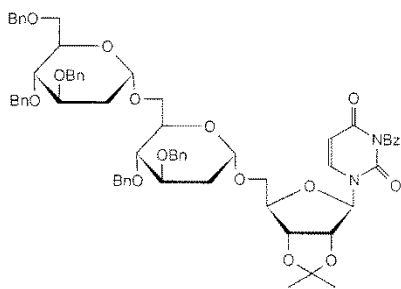
<sup>1</sup>H NMR δ (ppm): 1.33, 1.54 (2s, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.67 (ddd, 1H, J<sub>2"ax,1"</sub>=3.3 Hz, J<sub>2"ax,3"</sub>=11.5 Hz, J<sub>2"ax,2"eq</sub>=12.7 Hz, H-2"ax), 2.03 (d, 1H, J<sub>6"OH,6"</sub>=2.9 Hz, 6"-OH), 2.18 (ddd, 1H, J<sub>2"eq,1"</sub>≈0 Hz, J<sub>2"eq,3"</sub>=4.4 Hz, J<sub>2"eq,2"ax</sub>=12.7 Hz, H-2"eq), 3.45-3.82 (m, 6H, H-5'a,b, H-3", H-4", H-6"a,b), 3.85-3.96 (m, 1H, H-5"), 4.30-4.39 (m, 1H, H-4'), 4.64-4.97 (q<sub>AB</sub>, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.66 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.70 (dd, 1H, J<sub>3'2'</sub>=5.9 Hz, J<sub>3'4'</sub>=3.7 Hz, H-3'), 4.80 (dd, 1H, J<sub>2'1'</sub>=2.2 Hz, J<sub>2'3'</sub>=6.1 Hz, H-2'), 4.90 (bd, 1H, J<sub>1",2"ax</sub>=3.3 Hz, H-1"), 5.74 (d, 1H, J<sub>1'2'</sub>=2.2 Hz, H-1'), 5.78 (d, 1H, J<sub>5,6</sub>=8.1 Hz, H-5), 7.24-7.39 (m, 10H, 2-CH<sub>2</sub>Ph), 7.42-7.50 (m, 2H, Ph(m)), 7.47 (d, 1H, J<sub>6,5</sub>=8.4 Hz, H-6), 7.58-7.65 (m, 1H, Ph(p)), 7.89-7.95 (m, 2H, Ph(o)).

**LR ESI-MS:** *m/z* dla C<sub>39</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>Na ([M+Na]<sup>+</sup>)

obliczono: 737.27

oznaczono: 737.2.

3,4,6-tri-O-benzylo-2-deoksy-α-D-glukopioranozylo-(1→6)-3,4-di-O-benzylo-2-deoksy-α-D-glukopioranozylo-(1→5)-N<sup>3</sup>-benzoilo-2',3'-O-izopropylidenourydyna IW4



IW4

**Addycja 2.** 3,4-di-O-benzyl-6-O-t-butyldimetylosililo-D-glukal (0.15 mmol) i IW7 (0.15 mmol) rozpuszczono w  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 ml) i mieszano przez 15 minut w obecności sit molekularnych 4A. Następnie dodano katalityczną ilość TPHB (0.015 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej do całkowitego przereagowania glikalu. Przebieg reakcji kontrolowano metodą TLC w układzie toluen : octan etylu 8:1 i 1:1 (v:v). Po zakończeniu reakcji odsączało się sита molekularne, przesącz rozcieńczono chlorkiem metylenu (30 ml), przemywano 10% roztworem wodorowęglanu sodowego (30 ml), a następnie wodą (3x15 ml). Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, odsączało się środek suszący, a przesącz zatężono na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej stosując układ rozpuszczalników heksan : octan etylu 2:1 (v:v). Wydajność **IW4** 59%, krzepnący olej.

**P r z y k ł a d 2. Badanie wpływu syntetycznych inhibitorów N-glikozylacji na elispresję genów glikoprotein E0 i E2 CSFV w systemie bakulowirusowym.**

W serii doświadczeń ustalono dawki podawanego inhibitora za pomocą testu cytotoksycznego z 0,4% Trypan Blue. Test cytotoksyczny z 0,4% Trypan Blue służy do pomiaru przeżywalności komórek. Po inkubacji z Trypan Blue komórki martwe barwią się na kolor niebieski, a komórki żywe pozostają niezabarwione, dzięki czemu przy użyciu homocytometru (komory Thoma) możliwe jest określenie przeżywalności korzystając ze wzoru:

Ilość żywych komórek (niezabarwione) / Ilość wszystkich komórek (żywe + martwe) = przeżywalność (%)

W tym celu komórki owadzie po zadaniu inhibitorem inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 27°C. Po odplukaniu pożywką przeniesiono komórki do probówek Eppendorfa, pobrano 50  $\mu\text{l}$  zawiesiny, wprowadzono do probówki Eppendorfa, dodano 50  $\mu\text{l}$  roztworu Trypan Blue, inkubowano przez 5 minut, nakropiono na komorę Thoma i policzono komórki.

Po ustaleniu optymalnej dawki inhibitora, czyli takiej, przy której przeżywalność komórek Sf9 jest większa niż 50%, badano wpływ inhibitora na namnażanie się bakulowirusów zawierających gen glikoproteiny E0 lub E2 w tych komórkach postępując podobnie jak w przypadku komórek nerki świnińskiej SK6, które zakażano wirusem CSFV. W tym celu do jednej płytki M-12 zawierającej komórki Sf9 dodawano różne, ustalone wcześniej dawki potencjalnego inhibitora, a po 30 minutach dodawano bakulowirusa E0 lub E2. Miało to na celu sprawdzenie, czy inhibitor blokuje wnikanie bakulowirusa do komórki. Drugą płytkę M-12 z komórkami Sf9 zakażano bakulowirusem E0 lub E2, a po 1,5 h (po tym czasie bakulowirus jest już w komórkach) dodawano inhibitora, w celu sprawdzenia jak inhibitor wpływa na namnażanie się bakulowirusa. Hodowle prowadzono przez 48 h, a po tym czasie przeprowadzano test IPMA za pomocą surowicy poliklonalnej anty E0 lub E2. Komórki zakażone bakulowirusem są zabarwione na czerwono, więc w ten sposób można porównać ilość i wielkość komórek pozytywnych w porównaniu z kontrolami (1 - komórki Sf9 bez bakulowirusa E0 lub E2 i bez inhibitora, 2 - komórki Sf9 zakażone bakulowirusem E0 lub E2, ale bez dodatku inhibitora). Wyniki przedstawiono w tabeli 3.

**$^1\text{H NMR } \delta$  (ppm)** 1.32, 1.53 (2s, 6H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.61-1.75 (m, 2H, H-2''ax, H-2'''ax), 2.17, 2.30 (2-dd, 2H,  $J_{2\text{eq},1} \approx 0$  Hz,  $J_{2\text{eq},3} = 11.2$  Hz,  $J_{2\text{eq},2\text{ax}} = 12.5$  Hz, H-2''eq, H-2'''eq), 3.43-3.94 (m, 12H, H-5'a,b, H-3'', H-4'', H-5'', H-6''a,b, H-3''', H-4''', H-5''', H-6'''a,b), 4.32-4.46 ( $q_{\text{AB}}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.31-4.38 (m, 1H, H-4'), 4.51-4.66 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.68 (dd, 1H,  $J_{3,2} = 6.1$  Hz,  $J_{3,4} = 3.4$  Hz, H-3'), 4.77 (dd, 1H,  $J_{2',1} = 2.0$  Hz,  $J_{2',3} = 6.1$  Hz, H-2'), 4.88 (d, 1H,  $J_{1'',2''\text{ax}} = 2.7$  Hz, H-1''), 4.86-4.95 ( $q_{\text{AB}}$ , 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.02 (dd, 1H,  $J_{1''',2''\text{ax}} = 2.7$  Hz, H-1'''), 5.75 (d, 1H,  $J_{5,6} = 8.1$  Hz, H-5), 5.75 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 2.2$  Hz, H-1'), 7.20-7.40 (m, 25H, 5- $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 7.42-7.50 (m, 2H, Ph(m)), 7.45 (d,  $J_{6,5} = 8.1$  Hz, H-6), 7.55-7.65 (m, 1H, Ph(p)), 7.86-7.94 (m, 2H, Ph(O)).

$^{13}\text{H NMR } \delta$  (ppm) 25.44, 27.25 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 35.06, 35.25 (C-2", C-2'''), 65.80, 67.12, 68.76, 69.95, 70.89, 71.15, 71.66, 73.06, 73.42, 74.40, 74.88, 75.04, 76.01, 78.12 (C-5', C-3", C-4", C-5", C-6", C-3''', C-4''', C-5''', C-6''', 5- $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 80.76 (C-3'), 85.10 (C-2'), 85.86 (C-4'), 94.28 (C-1'), 97.57 (C-1''), 97.78 (C-1'''), 101.90 (C-5), 114.31 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 127.50-128.48 (5- $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 129.20 (Ph(m)), 130.49 (Ph(o)), 131.36 (Ph(p)), 135.17 (Ph( $\text{C}_{\text{IV}}$ )), 138.24-138.67 (5- $\text{CH}_2\text{Ph}(\text{C}_{\text{IV}}$ )), 140.81 (C-6), 149.90 (C-2), 161.93 (C-4), 168.30 (PhCO).

**LR ESI-MS:**  $m/z$  dla  $\text{C}_{66}\text{H}_{70}\text{N}_2\text{O}_{15}\text{Na}$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ )

obliczono: 1153.46

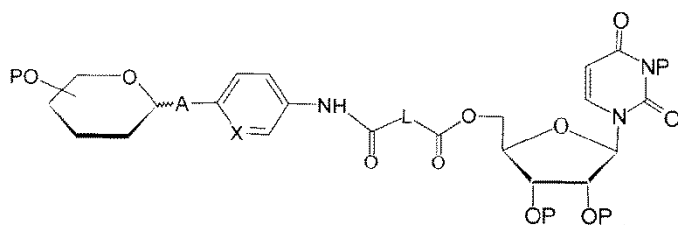
oznaczono: 1153.4.

## Zastrzeżenia patentowe

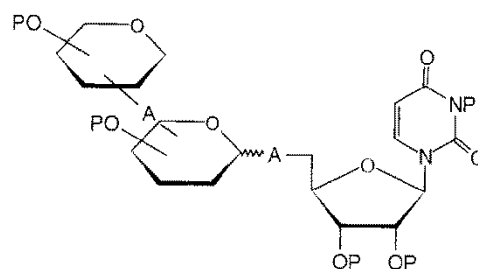
1. Pochodne urydyny jako związki przeciwwirusowe zwłaszcza przeciwko wirusom z rodziny Flaviviridae o strukturze przedstawionej wzorem I, **znamiennie tym**, że urydyna lub jej pochodne połączona jest z arylo-O-glikozydem ( $\text{A}=\text{O}$ ,  $\text{X}=\text{C}$ ) lub hetarylo-O-glikozydem ( $\text{A}=\text{O}$ ,  $\text{X}=\text{N}$ ) lub z arylo-S-glikozydem ( $\text{A}=\text{S}$ ,  $\text{X}=\text{C}$ ) lub hetarylo-S-glikozydem ( $\text{A}=\text{S}$ ,  $\text{X}=\text{N}$ ) poprzez łącznik alkilowy (L) zawierający od jednego do czterech atomów węgla, gdzie P oznacza grupy ochronne alkilowe, acylowe, silylowe lub wodór.

2. Pochodne urydyny jako związki przeciwwirusowe zwłaszcza przeciwko wirusom z rodziny Flaviviridae o strukturze przedstawionej wzorem II, **znamiennie tym**, że urydyna lub jej pochodne połączona jest wiązaniem O-glikozydowym ( $\text{A}=\text{O}$ ) lub wiązaniem S-glikozydowym ( $\text{A}=\text{S}$ ) z jedną lub dwiema jednostkami 2-deoksycukrów, gdzie P oznacza grupy ochronne alkilowe, acylowe, silylowe lub wodór.

## Rysunek



**Wzór I**



**Wzór II**

P: grupy ochronne (alkilowe, acylowe, silylowe, acetalowi) lub wodór

A: atom tlenu lub siarki

X: atom węgla lub azotu

L : łącznik alkilowy zawierający od 1 do 4 atomów węgla.

