RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **212067** (13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **381650**

(22) Data zgłoszenia: **31.01.2007**

(51) Int.Cl.
C07H 17/02 (2006.01)
C07D 405/12 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(54) **Zastosowanie sulfidów i sulfotlenków glikozylowo heteroarylowych jako związków przeciwwirusowych, zwłaszcza przeciwko wirusom z rodziny Flaviviridae**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
04.08.2008 BUP 16/08

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.08.2012 WUP 08/12

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA ŚLĄSKA, Gliwice, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
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 212067 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie sulfidu i sulfotlenku glikozylowo heteroarylowego jako związków przeciwwirusowych zwłaszcza przeciwko wirusom zapalenia wątroby typu C z rodziny *Flaviviridae*.

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. Niesłychanie 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 α, 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 badań stwierdzono nieoczekiwanie, że sulfidy glikozylowo heteroarylowe oraz sulfotlenki glikozylowo heteroarylowe stanowią nową klasę połączeń hamujących namnażanie się wirusa w komórkach ssaczych.

Wynalazek dotyczy zastosowania sulfidów i sulfotlenków glikozylowo heteroarylowych jako związków przeciwwirusowych zwłaszcza przeciwko wirusom z rodziny *Flaviviridae*. gdzie sulfidy o wzorze I i sulfotlenki o wzorze II zawierają jako podstawniki w części cukrowej estry kwasów karboksylowych (R=acyl) lub etery alkilowe (R=alkil) lub etery sililowe (R=SiR_3, gdzie R=alkil, aryl), do wytwarzania środków przeciw wirusowych, w szczególności w stosunku do wirusa zapalenia wątroby typu C.

Jako podstawnik heteroarylowy stosuje się pochodne pirydyny, imidazolu, triazyny zawierające podstawniki elektronoakceptorowe.

Natomiast jako podstawnik glikozylowy stosuje się monosacharydy, disacharydy z wolnymi grupami hydroksylowymi lub podstawionymi rodnikiem acylowym, alkilowym, sililowym. Dążąc do poznania pierwszych etapów rozwoju wirusa, tj. jego adsorbcji 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 małpy człekokształtne.

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. Metodykę pracy i uzyskane wyniki przedstawiono na poniższych przykładach.

P r z y k ł a d 1.

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 1% wodno-alkoholowy roztwór kwasu octowego i oznaczono spektrofotometrycznie ilość uwolnionej czerwieni obojętnej mierząc absorbancję przy długości fali 490 nm. Wyniki przedstawiono w Tabeli 1 (kolumna 2 i 3).

Po ustaleniu optymalnej dawki inhibitora, czyli takiej, przy której przeżywalność komórek SK6 jest większa niż 50%, badano wpływ inhibitora na namnażanie się wirusa w tych komórkach. 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 pseudołysinek 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 2 (kolumna 4 i 5). Analiza danych wskazuje, że inhibitory GP-1, GP-4, GP-5, GP-6, GP-7 wykazywały hamowanie namnażanie się wirusa CSFV w komórkach nerki świńskiej SK6. W celu określenia ilości nowopowstałych cząstek wirusa CSFV pod wpływem działania różnych dawek inhibitorów, wykonano miareczkowanie supernatantów zebranych znad komórek SK6 z płytek po zakażeniu wirusem CSFV. Przykładowo w Tabeli 1 podano wyniki dla inhibitora GP7.

T a b e l a 1
Inhibitor GP7

Dawka	Przeżywalność	Inh. + Wirus	Wirus + Inh.
60 μg/ml	86%	Brak pseudołysinek	Brak pseudołysinek
50 μg/ml	89%	Brak pseudołysinek	Brak pseudołysinek
20 μg/ml	95%	Pojedyncze pseudołysinki	Pojedyncze pseudołysinki
10 μg/ml	100%	Liczne pseudołysinki	Liczne pseudołysinki

P r z y k ł a d 2

Badanie wpływu syntetycznych inhibitorów N-glikozylacji na ekspresję genów glikoprotein E0 i E2 CSFV w systemie bakulowirusowym.

W tym celu przeprowadzono następujące doświadczenia:

1. Ustalenie dawki podawanego inhibitora za pomocą testu cytotoksycznego z 0,4% Trypan Blue.

2. Badanie wpływu inhibitora na ekspresję genów glikoprotein E0 i E2 CSFV w systemie Bakulowirusowym.

T a b e l a 2
WYNIKI - KOMÓRKI SSACZE:

1. Nazwa inhibitora	2. Dawka	3. Przeżywalność	4. Inhibitor + wirus	5. Wirus + inhibitor
1	2	3	4	5
GP-1	50 μg/ml	68%	---	---
	40 μg/ml	86%	---	---
	20 μg/ml	100%	+++	+++
GP-2	15 μg/ml		+++	+++
	10 μg/ml	97%	+++	+++
	5 μg/ml	99%	+++	+++
GP-3	140 μg/ml	90%	+	+
	130 μg/ml	90%	+	+
	120 μg/ml	93%	++	+
	110 μg/ml	95%	++	++
GP-4	80 μg/ml	53%	---	+
	60 μg/ml	87%	++	++
	50 μg/ml	93%	++	++
	300 μg/ml	95%	++	++

cd. tabeli 2

1	2	3	4	5
GP-5	6 μg/ml	95%	---	---
	5 μg/ml	98%	---	+
	3 μg/ml	100%	+++	+++
GP-6	12 μg/ml		---	---
	10 μg/ml	94%	---	+
	5 μg/ml	94%	++	++
GP-7	150 μg/ml	57%	---	---
	140 μg/ml	60%	---	---
	120 μg/ml	89%	---	---
	100 μg/ml	100%	---	---

--- 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 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:

$$\frac{\text{Ilość żywych komórek (niezabarwione)}}{\text{Ilość wszystkich komórek (żywe + martwe)}} = \text{Przeżywalność (\%)}$$

W tym celu komórki owadzie po zadaniu inhibitorem inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 27°C. Po odpłukaniu pożywką przeniesiono komórki do probówek Eppendorfa, pobrano 50 ul zawiesiny, wprowadzono do probówki Eppendorfa, dodano 50 ul roztworu Tryptan Blue, inkubowano przez 5 minut, nakroplono na komorę Thoma i policzono komórki.

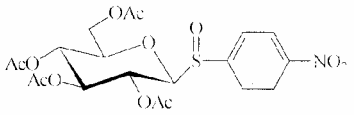
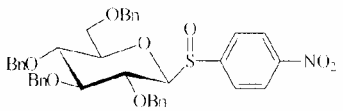
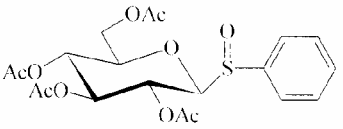
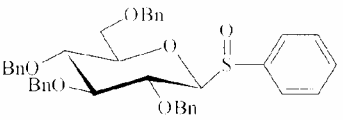
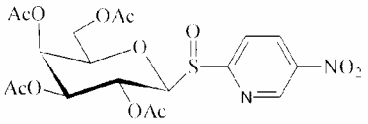
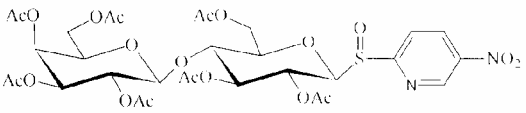
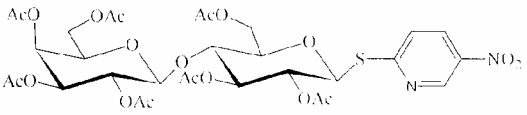
Po ustaleniu optymalnej dawki inhibitora, czyli takiej, przy której przeżywalność komórek Sf9 jest większa niż 50%, badano wpływ inhibitora na namnażanie się bakulowirusów zawierających gen glikoproteiny E0 lub E2 w tych komórkach postępując podobnie jak w przypadku komórek nerki świńskiej SK6, które 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.

T a b e l a 3.
WYNIKI - KOMÓRKI OWADZIE:

Nazwa inhibitora	Dawka	Przeżywalność	Inhibitor + bakulowirus	Bakulowirus + inhibitor
GP-1	60 μg/ml	75%	+	+
	40 μg/ml	87%	++	++
	20 μg/ml	98%	+++	+++
	10 μg/ml	100%	+++	+++
GP-4	80 μg/ml	58%	+	+
	60 μg/ml	60%	++	++
	40 μg/ml	71%	++	++
	20 μg/ml	75%	+++	+++
GP-5	8 μg/ml	66%	+++	+++
	6 μg/ml	90%	+++	+++
	4 μg/ml	98%	+++	+++
	3 μg/ml	100%	+++	+++
GP-6	15 μg/ml	53%	---	---
	12 μg/ml	81%	+	+
	10 μg/ml	90%	++	++
	5 μg/ml	95%	+++	+++
GP-7	120 μg/ml	56%	---	---
	100 μg/ml	60%	+	+
	80 μg/ml	98%	++	++
	60 μg/ml	100%	+++	+++

--- 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)

Analiza danych wskazuje, że inhibitory GP-6, GP-7 wykazywały hamowanie namnażania się bakulowirusa E0 lub E2 w komórkach owadzich Sf9.

GP 1	Sulfotlenek 4'-nitrofenylo-2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozylowy	 1
GP 2	Sulfotlenek 4'-nitrofenylo-2,3,4,6-tetra-O-benzylo-β-D-glukopiranozylowy	 2
GP 3	Sulfotlenek fenylo-2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozylowy	 3
GP 4	Sulfotlenek fenylo-2,3,4,6-tetra-O-benzylo-β-D-glukopiranozylowy	 4
GP 5	Sulfotlenek (5'-nitro-2'-pirydylo)-2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-galaktopiranozylowy	 5
GP 6	Sulfotlenek (5'-nitro-2'-pirydylo)-per-O-acetylo-β-D-laktozylowy	 6
GP 7	Sulfid (5'-nitro-2'-pirydylo) per-O-acetylo-β- D-laktozylowy	 7

Sposób otrzymywania sulfotlenków przedstawiono na poniższych przykładach.

Przepis ogólny

Tioglikozyd (0,01 mola) rozpuszczono w chlorku metylenu (100 ml) i ochłodzono do 0°C po czym dodano 60% kwas m-chloronadbenzoesowy (2,87g, 0,01 mola) i mieszano w temperaturze pokojowej kontrolując przebieg reakcji metodą tle. Przerywano reakcję nie czekając na całkowite przereagowanie tioglikozydu, aby ograniczyć ilość powstającego sulfonu. Mieszaninę poreakcyjną odmywano wodą (3 x 50 ml), suszono bezwodnym siarczanem magnezu i po odsączeniu środka suszącego zatężano na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej stosując układ rozpuszczalników toluen:octan etylu 4:1.

Produkt	Czas reakcji [min]	Wydajność [%]	
GP-1	60	78*	81**
GP-2	40	51*	
GP-3	30	77*	
GP-4	30	78*	
GP-5	40	48*	51**
GP-6	120	59*	68**

* wydajność liczona na wyjściowy tioglikozyd
** wydajność liczona na przereagowany tioglikozyd

2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozylo-(4-nitrofenylo) sulfotlenek, (GP-1)

^{1}H NMR (mieszanina diastereoizomerycznych sulfotlenków) δ (ppm): 1.94, 1.98, 2.03, 2.13 (4s, 4xCH_3CO), 3.74 (ddd, J=2.4 Hz, J=4.2 Hz, J=10.0 Hz, H-5), 3.98-4.21 (m, H-6a, H-6b), 4.50 (d, $J_{1,2}$=9.5 Hz, H-1, 4.93 (dd~t, J=9.5 Hz, H-2), 5.19-5.36 (m, H-3, H-4), 7.95 (d, J=9.0 Hz, Ph), 8.41 (d, J=9.0 Hz, Ph)

2.03 (s, 4xCH_3CO), 3.65 (ddd, J=2.2 Hz, J=5.4 Hz, J=9.8 Hz, H-5), 3.98-4.21 (m, H-6a, H-6b). 4.42 (d, J=9.8 Hz, H-1), 4.99 (dd~t, J=9.5 Hz, H-2), 5.19-5.36 (m, H-3, H-4), 7.86 (d, 1=9.0 Hz, H-Ph), 8.41 (d, J=9.0 Hz, Ph)

2,3,4,6-tetra-0-benzylo-β-D-glukopiranozylo-(4-nitrofenylo) sulfotlenek, (GP-2)

^{1}H NMR δ (ppm): 3.43 (ddd, J=2.0 Hz, J=5.1 Hz, J=9.8 Hz, H-5), 3.43 (dd, J=2.0 Hz. J=11.2 Hz, H-6b), 3.49 (dd, J=5.1 Hz, J=11.2 Hz, H-6a), 3.60 (dd~t, J=9.3 Hz, H-4), 3.81 (dd~t, J=9.0 Hz, H-3). 4.01 (d, J=9.8 Hz, H-1), 4.10 (dd~t, 1=9.8 Hz, H-2), 4.24 i 4.31 (qAB, J=11.7 Hz, $\underline{CH_2}$Ph), 4.57 i 4.81 (qAB, J=10.7 Hz, $\underline{CH_2}$Ph), 4.94 (s, CH_2Ph), 4.96 i 5.00 (qAB, J=10.5 Hz, $\underline{CH_2}$Ph), 7.14-7.38 (m, Ph), 7.79 (d, J=9.0 Hz, Ph), 8.25 (d, J=9.0 Hz, Ph)

2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozylo-fenylo sulfotlenek, (GP-3)

^{1}H NMR (mieszanina diastereoizomerycznych sulfotlenków) δ (ppm): 1.71, 2.00, 2.01, (3s. 4xCH_3CO), 3.62 (ddd, J=2.4 Hz, J=5.6 Hz, J=10.0 Hz, H-5), 4.03 (dd, J=2.4 Hz, J=12,4 Hz, H-6b), 4.14 (m, H-6a), 4.21 (d, J_{12}=9.5 Hz, H-1), 5.01 (dd~t, J=9.5 Hz, H-2), 5.21-5.38 (m, H-3, H-4), 7.52--7.75 (m, Ph)

1.91, 1.96, 2.01, 2.08 (4s, 4xCH_3CO), 3.72 (ddd, 3=2.9 Hz, J=3.9 Hz, J=10.0 Hz, H-5), 4.08--4.19 (m, H-6a, H-6b), 4.46 (m, H-1), 4.96 (m, H-2), 5.21-5.38 (m, H-3, H-4), 7.52-7.75 (m, Ph)

2,3,4,6-tetra-O-benzylo-β-D-glukopiranozylo-fenylo sulfotlenek, (GP-4)

^{1}H NMR (mieszanina diastereoizomerycznych sulfotlenków) δ (ppm): 3.32 (ddd, J=2.4 Hz, J=4.6 Hz, J=9.8 Hz, H-5), 3.47-3.82 (m, H-3, H-4, H-6a, H-6b), 3.98 (d, 1=9.8 Hz, H-1), 4.01 (dd-t. J=9.8 Hz, H-2), 4.22 i 4.33 (qAB, J=12.0 Hz, $\underline{CH_2}$Ph), 4.57 i 4.64 (qAB, J=10.7 Hz, $\underline{CH_2}$Ph), 4.78-5.05 (m, CH_2Ph), 7.15-7.70 (m, Ph)

3.47-3.82 (m, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b), 4.45 (s, CH_2Ph), 4.49 (d, 1=8.6 Hz, H-1), 4.78-5.05 (m, H-2, $\underline{CH_2}$Ph), 7.15-7.70 (m, Ph)

2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-galaktopiranozylo-(5-nitro-2-pirydylo) sulfotlenek, (GP-5)

^{1}H NMR (mieszanina diastereoizomerycznych sulfotlenków) δ (ppm): 1.70, 1.81, 1.96, 2.13 (4s, 4xCH_3CO), 3.78-4.24 (m, H-5, H-6a, H-6b), 5.03 (d, $J_{1,2}$=10.2 Hz, H-1), 5.11 (dd, J=3.5 Hz, J=9.9 Hz, H-3), 5.41 (m, H-4), 5.81 (dd~t, J=9.9 Hz H-2), 8.14 (d, J=9.0 Hz, H-3_{pir}), 8.73 (dd, J=2.0 Hz, J=8.8 Hz, H-4_{pir}), 9.50 (d, J=1.8 Hz, H-6_{pir}).

2.02, 2.04, 2.17, 2.18 (4s, 4xCH_3CO), 3.78-4.24 (m, H-5, H-6a, H-6b), 4.63 (d, $J_{1,2}$=10.2 Hz, H-1), 5.21 (dd, 1=3.5 Hz, 1=9.9 Hz, H-3), 5.41 (m, H-4), 5.76 (dd~t, J=10.1 Hz H-2), 8.27 (d, 1=8.7 Hz, H-3_{pir}), 8.73 (dd, 1=2.0 Hz, J=8.8 Hz. H-4_{pir}), 9.43 (d, 1=1.8 Hz, H-6_{pir}).

2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-galaktopiranozylo-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetylo-1-tio-β-D-glukopiranozylo-(5-nitro-2-pirydylo) sulfotlenek, (GP-6)

^{1}H NMR (mieszanina diastereoizomerycznych sulfotlenków) δ (ppm): 1.56, 1.96, 2.02, 2.04, 2.06, 2.08, 2.14 (7s, 7xCH_3CO), 3.72-4.18 (m, H-4, H-5, H-5', H-6a, H-6a' H-6b'), 4.49 (d, J, 2=7.8 Hz, H-1'), 4.54 (dd, J=2.4 Hz, 1=11.0 Hz, H-6b), 4.95 (dd, J=3.4 Hz, J=10.5 Hz, H-3'), 5.03 (d, J=9.7 Hz, H-1), 5.09 (dd, J=7.8 Hz, J=10.3 Hz. H-2'), 5.22 (dd~t, J=8.5 Hz, H-3), 5.34 (m, H-4"), 5.48 (dd~t, J=9.5 Hz H-2), 8.10 (d, J=8.7 Hz, H-3_{pir}), 8.71 (dd, J=2.4 Hz, J=8.7 Hz, H-4_{pir}), 9.48 (d, 1=2.4 Hz, H-6_{pir}).

1.87, 1.95, 1.97, 2.08, 2.09, 2.14, 2.15 (7s, 7xCH3CO), 3.45 (ddd, J=1.7 Hz, J= 4.8 Hz, J=9.8 Hz, H-5), 3.79 (dd~t, J=9.8 Hz, H-4), 3.81-4.16 (m, H-5', H-6a, H-6a', H-6b'), 4.27 (dd, 1=1.7 Hz, J=12.2 Hz, H-6b), 4.48 (d, $J_{1,2}$=7.8 Hz, H-1'), 4.61 (d, 1=10.0 Hz, H-1), 4.95 (dd, J=3.4 Hz, 1=10.5 Hz, H-3'), 5.07 (dd, J=7.8 Hz, 1=10.5 Hz, H-2'), 5.30-5.39 (m, H-3. H-4'), 5.48 (dd~t, J=9.8 Hz H-2), 8.18 (d, J=8.4 Hz, H-3_{pir}), 8.73 (dd, 1=2.4 Hz, J=8.4 Hz, H-4_{pir}), 9.42 (d, 1=2.4 Hz, H-6_{pir}).

(5-nitro-2-pirydylo) 2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-galaktopiranozylo-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetylo--1-tio-β-D-glukopiranozyd, (GP-7)

Tiocukier (0.01 mola) rozpuszczono w acetonie (100 ml), dodano 2-chloro-5-nitropirydynę (1.58 g, 0.01 mola) oraz węglan potasu (2.76 g, 0.02 mola) i mieszano w temperaturze pokojowej kontrolując przebieg reakcji metodą tle. Po 60 minutach zakończono reakcję, odsączano osad soli nieorganicznych, a przesącz zatężano. Surowy produkt poddawano oczyszczaniu metodą chromatografii kolumnowej stosując układ rozpuszczalników toluen:octan etylu 10:1. Uzyskano produkt w postaci krzepnącego oleju z 83% wyd. [α] = 40.8° ($CHCl_3$, c 0.2).

^{1}H NMR δ (ppm): 1.97, 2.03, 2.04, 2.07, 2.08, 2.17 (6s, 7xCH_3CO), 3.80-4.19 (m, H-4, H-5, H-5', H-6a, H-6a' H-6b'), 4.46 (dd, J=1.5 Hz, J=12.0 Hz, H-6b), 4.50 (d, 1,2=7.8 Hz, H-1'), 4.97 (dd, J=3.4 Hz, J=10.5 Hz, H-3'), 5.13 (dd, J=7.8 Hz. J=10.6 Hz, H-2'), 5.17 (dd, J=9.3 Hz, 1=10.5 Hz, H-2), 5.32-5.40 (m, H-3, H-4'), 5.88 (d, J=10.5 Hz, H-1), 7.34 (d, J=9.0 Hz, H-3pir), 8.26 (dd, J=2.7 Hz, 1=9.0 Hz, H-4_{pir}), 9.26 (d, J=2.7 Hz, H-6_{pir}).

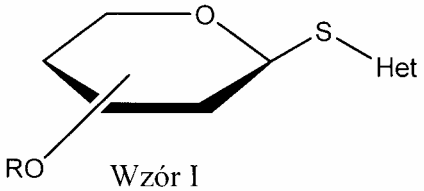
Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie sulfidów i sulfotlenków glikozylowo heteroarylowych jako związków przeciwwirusowych zwłaszcza przeciwko wirusom z rodziny *Flaviviridae,* gdzie sulfidy o wzorze I i sulfotlenki o wzorze II zawierają jako podstawniki w części cukrowej estry kwasów karboksylowych (R=acyl) lub etery alkilowe (R=alkil) lub etery sililowe (R=SiR_3, gdzie R=alki, aryl), do wytwarzania środków przeciwwirusowych, w szczególności w stosunku do wirusa zapalenia wątroby typu C.

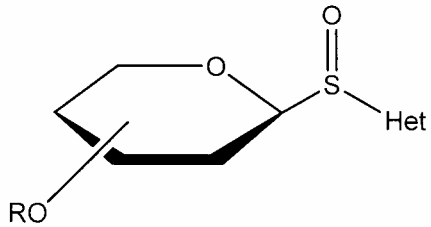
2. Zastosowanie według zastrz. 1, w którym jako podstawnik heteroarylowy stosuje się pochodne pirydyny, imidazolu, triazyny zawierające podstawniki elektronoakceptorowe.

3. Zastosowanie według zastrz. 1, w którym jako podstawnik glikozylowy stosuje się monosacharydy, disacharydy z wolnymi grupami hydroksylowymi lub podstawionymi rodnikiem acylowym, alkilowym, sililowym.

Rysunki



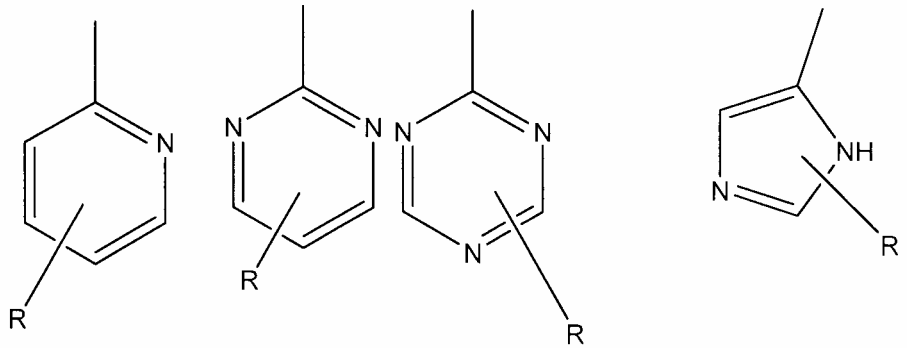
Wzór I



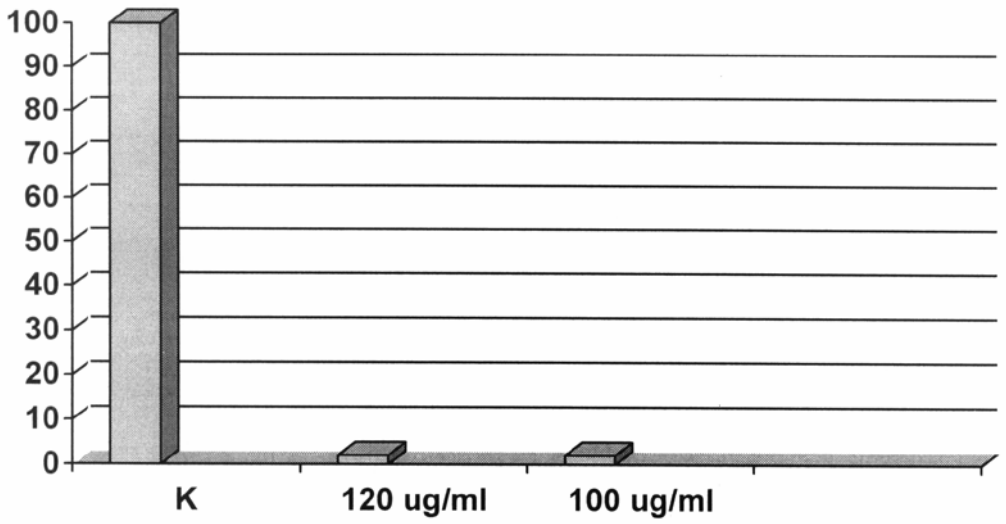
Wzór II

R:H, Acyl, Alkil, Silil

Het:



R: NO, NO_2, SO_2R, COR



Wykres.1 Ilość nowopowstających cząstek wirusowych (%) w obecności różnych dawek inhibitora GP7.

Departament Wydawnictw UP RP
Cena 2,46 zł (w tym 23% VAT)