



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 20 696 T2 2006.03.02

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 090 018 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 20 696.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/14774

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 932 080.7

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 00/00501

(86) PCT-Anmeldetag: 29.06.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 06.01.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 11.04.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 29.09.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 02.03.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C07H 19/10 (2006.01)

C07H 19/20 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

107716 30.06.1998 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Parker Hughes Institute, St. Paul, Minn., US

(72) Erfinder:

UCKUN, M., Fatih, White Bear Lake, US; VIG,  
Rakesh, Middletown, US

(74) Vertreter:

Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183  
Wiesbaden

(54) Bezeichnung: ARYLPHOSPHATDERIVATE VON D4T MIT ANTI-HIV WIRKUNG

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****Gebiet der Erfindung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung ist auf Arylphosphatnukleosidderivate, insbesondere Arylphosphatderivate von 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxythymidin (nachfolgend als „d4T“) gerichtet, das starke Aktivität gegen den menschlichen Immunmangelvirus (HIV) zeigt, zum Beispiel als Inhibitoren von HIV-Revertase.

**Hintergrund der Erfindung**

**[0002]** Die weite Verbreitung von Aids und die fortgesetzten Bemühungen, das verantwortliche Virus unter Kontrolle zu bringen, sind gut dokumentiert. Ein Weg, HIV zu kontrollieren ist der, seine Revertase-Aktivität (RT) zu hemmen. So werden neue, starke und selektive Inhibitoren von HIV-RT als brauchbare therapeutische Mittel benötigt. Bekannt starke Inhibitoren von HIV-RT schließen 5-Triphosphate von 2',3'-Dideoxynukleosidanalogen („ddN“) ein. Diese aktiven RT-Inhibitoren werden intrazellulär durch die Wirkung von Nukleosidkinase und Nukleotidkinase erzeugt. So wurden ddN-Verbindungen, wie AZT und d4T angesehen, daß sie in der Forschung bezüglich Anti-HIV-Mitteln vielversprechend sind.

**[0003]** Die geschwindigkeitsbegrenzende Stufe für die Umwandlung von 3'-Azido-3'-dioxythymidin (Zidovudin, AZT) in sein biologisch aktives Stoffwechselprodukt AZT-Triphosphat erscheint die Umwandlung des Monophosphatderivates in das Diphosphatderivat zu sein, während die geschwindigkeitsbeschränkende Stufe für die intrazelluläre Erzeugung des biologisch aktiven 2',3'-Dideoxy-2',3'-Didehydrothymidin (d4T)-Stoffwechselprodukt d4T-Triphosphat gemäß Berichten die Umwandlung des Nukleosids in sein Monophosphatderivat ist (Balzarini et al., 1989, J. Biol. Chem. 264:6127; McGuigan et al., 1996, J. Med. Chem. 39:1748). Siehe [Fig. 1](#) für den Mechanismus, der im Stand der Technik vorgeschlagen wird.

**[0004]** In einem Versuch, die Abhängigkeit von ddN-Analogen von intrazellulärer Nukleosidkinaseaktivierung zu überwinden, haben McGuigan et al. Arylmethoxyalaninylphosphatderivate von AZT (McGuigan et al., 1993, J. Med. Chem. 36:1048; McGuigan et al., 1992, Antiviral Res. 17:311) und d4T (McGuigan et al., 1996, J. Med. Chem. 39:1748 ; McGuigan et al., 1996 Bioorg. Med. Chem. Lett. 6:1183) hergestellt. Solche Verbindungen waren wie sich zeigt, intrazellulärer Hydrolyse zugänglich, um Monophosphatderivate zu ergeben, die weiter mit Thymidylatkinase phosphoryliert wurden, um die biologisch aktiven Triphosphatderivate in einer von Thymidinkinase (TK)-unabhängigen Weise zu ergeben. Bis heute schlugen jedoch alle Versuche fehl, die Stärke der Arylphosphatderivate von d4T durch verschiedene Substitutionen des Arylrestes ohne gleichzeitige Verstärkung ihrer Zytotoxizität zu erhöhen (McGuigan et al., 1996 J. Med. Chem. 39:1748). Weiterhin berichteten McGuigan et al. (WO 96/29336) von maskiertem Monophosphatnukleosid, Analogen, ihrer Herstellung und ihrer therapeutischen Verwendung bei der Behandlung von Virusinfektionen, einschließlich der Infektion durch HIV:

Bei der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß eine Substitution an dem Arylrest in den Arylphosphatderivaten von Nukleosiden mit einem Elektronen abziehenden Rest, wie einer para-Bromsubstitution, die Fähigkeit der Nukleosidderivate von d4T einer Hydrolyse infolge der Elektronen abziehenden Eigenschaft des Substituenten unterliegt. Die substituierten Phenylphosphatnukleosidderivate zeigten starke und spezifische Antivirus-Aktivität.

**Zusammenfassung der Erfindung**

**[0005]** Die vorliegende Erfindung ist auf para-Brom-substituierte Methoxyalaninylphosphatderivate, von 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxythymidin (nachfolgend „d4T“) und AZT gerichtet, das starke Aktivität gegen HIV hat, zum Beispiel als Inhibitoren von HIV-Revertase. Diese Derivate mit einer Elektronen abziehenden Substitution am Arylrest zeigten sich überraschenderweise mit auffällig gesteigerter Potenz als Anti-HIV-Mittel ohne unerwünschte Gehalte an zytotoxischer Aktivität.

**[0006]** Die para-Brom-substituierten Phenylmethoxyalaninylphosphatderivate von d4T als ein aktives Anti-HIV-Mittel, verhindert die HIV-Replikation in mononukleären Zellen von peripherem Blut (PBMNC) sowie TK-Mangel-CEM-T-Zellen ohne feststellbare Zytotoxizität. Außerdem hatte dieses neue d4T-Derivat, d4T-5'-(para-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat) potente Antivirusaktivität gegen RTMDR-1 einen AZT- und NNI-resistenten Stamm von HIV-1 und moderate Aktivität gegen HIV-2. Ähnlich zeigt das entsprechende para-Brom-substituierte Phenylmethoxyalaninylphosphatderivat von AZT starke Anti-HIV-Aktivität in PBMNC, sowie einen TK-Mangel-CEM T-Zellen, jedoch war dies nicht wirksam gegen die AZT- und NNI-resistenten RTMDR-1 oder HIVB-2. Im Gegensatz zu diesen d4T und AZT-Derivaten zeigen die entsprechenden 3dT-De-

rivate, 3dT-5'-(para-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat) zwar verbesserte Aktivität gegenüber 3dT, war aber nicht so aktiv wie die d4T- und AZT-Derivate in PBMNC- oder TK-Mangel-CEM T-Zellen. Nach unserer Kenntnis ist dies der erste Bericht über eine bisher ungeschätzte Strukturaktivitätsbeziehung, welche die Potenz von Phenylphosphatderivaten sowohl von d4T als auch von AZT bestimmt.

**[0007]** Die Bleiverbindungen d4T-5'(para-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat) und AZT-5'-(para-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat) liefern eine Basis für die Gestaltung wirksamer HIV-Behandlungsstrategien, die in der Lage sind, HIV-Replikation, besondern in TK-Mangelzellen zu hemmen.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0008]** [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung eines bekannteren vorgeschlagenen Stoffwechselweges für Arylphosphatderivate von d4T.

**[0009]** Die [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) sind grafische Darstellungen, welche die Elektronen abziehende Hypothese für die verbesserte Hydrolyse eines substituierten Phenylringes zeigen.

**[0010]** [Fig. 2C](#) ist ein Eluierprofil, das Produktion von A-d4T als ein Ergebnis der Hydrolyse jeder der Testverbindungen zeigt. Verbindung 2, worin X = H (offene Quadrate), Verbindung 3, worin X = OCH<sub>3</sub> (ausgefüllte Quadrate) und Verbindung 4, worin X = Br (gefüllte Kreise) ist.

**[0011]** [Fig. 2D](#) ist ein Eluierprofil, das die Empfindlichkeit der getesteten Verbindungen gegenüber enzymatischer Hydrolyse durch Schweineleberesterase zeigt.

**[0012]** [Fig. 3](#) ist ein Eluierprofil, das die intrazelluläre Hydrolyse der Verbindungen 2 bis 4 in TK-Mangel-CEM-Zellen zeigt. Ein Stoffwechselprodukt-Peak entsprechend 680 pmol von A-d4T-MP wurde nur in Anteilen aus CEM-Zellen-Lysaten ermittelt, die mit Verbindung 4 inkubiert wurden.

**[0013]** Die [Fig. 4A](#) bis [Fig. 4F](#) zeigen die chemischen Strukturen der Verbindung 6c ([Fig. 4A](#)) und der Verbindung 7c ([Fig. 4B](#)), die Anti-HIV-Aktivität gegenüber HTLVIIIB in PBMNC und TK-Mangel-CEM T-Zellen für Verbindung 6c ([Fig. 4C](#)) und für Verbindung 7c ([Fig. 4D](#)), sowie die Antivirus Aktivität gegen HIV-1 (HTLVIIIB), HIV-2 und RTMDR-1 für Verbindung 6c ([Fig. 4E](#)) und Verbindung 7c ([Fig. 4F](#)). Antivirus-Aktivität wurde als Prozent Hemmung von HIV-Replikation ausgedrückt, gemessen durch RT-Aktivität in infizierten Zellen.

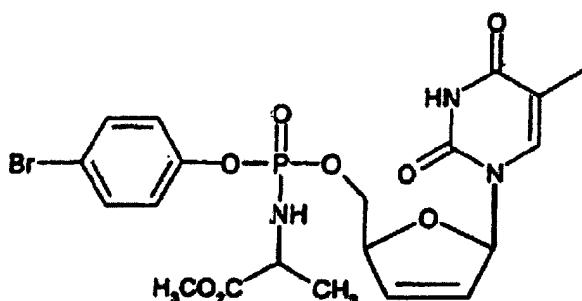
**[0014]** Die [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#) sind schematische Diagramme, die den Resonanzeffekt (Elektron-Delokalisierung) am Phenylring zeigen, wobei der para-Substituent und ortho-Substituent des Phenylringes erwartungsgemäß die gleiche elektronische Wirkung haben.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

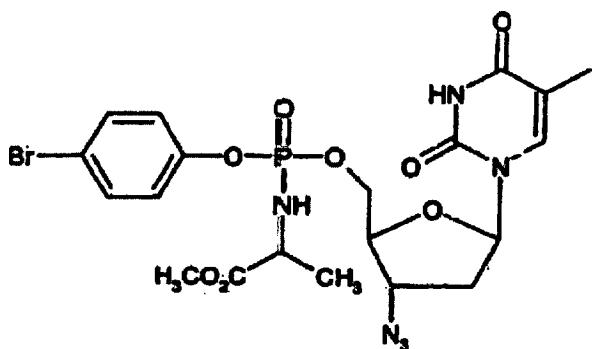
**[0015]** Es wurde überraschenderweise festgestellt, daß bestimmte substituierte Arylphosphatderivate von Nukleosiden erhöhte Aktivität gegen HIV besitzen, während sie niedrige Werte der Zytotoxizität behalten. Als solche sind diese Derivate besonders brauchbar als aktive Mittel für Antivirus-Zusammensetzungen und für Verfahren zur Behandlung von Virusinfektionen, wie HIV-Infektionen.

#### Verbindungen nach der Erfindung

**[0016]** Die Verbindungen nach der Erfindung sind



und



oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz oder Ester hiervon.

#### Synthese des d4T-Derivats

**[0017]** Um allgemein die Synthese der Verbindungen nach der Erfindung zu erläutern, wird die Synthese von d4T-Derivaten beschrieben. Die d4T-Derivate können folgendermaßen hergestellt werden. d4T kann aus Thymidin durch die in Mansuri, et al., 1989, J. Med. Chem., 32, 461, diskutierten Verfahren gewonnen werden, deren Beschreibung hier unter Bezugnahme eingearbeitet wird. Geeignet substituiertes Arylphosphorochloridat kann nach dem Verfahren hergestellt werden, das in McGuigan, et al., Antiviral Res., 1992, 17:311 beschrieben ist und dessen Inhalt hier durch Bezugnahme aufgenommen wird. Das Phosphorochloridat wird zu einer Lösung von d4T in wasserfreiem THF zugegeben, welche N-Methylimidazol zur Bildung des erwünschten Produkts enthält.

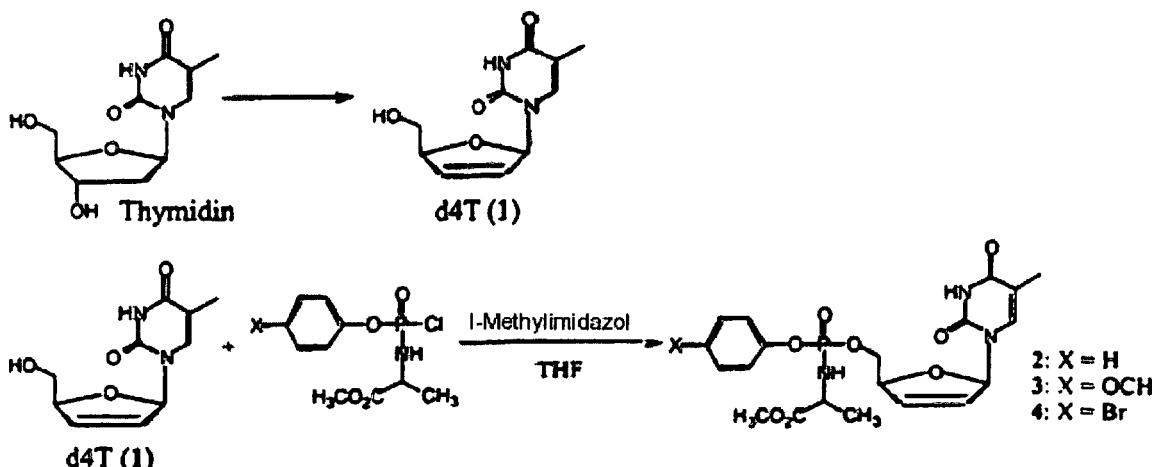
**[0018]** Die d4T-Derivate werden Patienten in der Form geeigneter Zusammensetzungen verabreicht, die das d4T- oder AZT-Derivat als ein aktives Mittel zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, Hilfsstoff oder Verdünnungsmittel enthalten. Gegebenenfalls können Dosierungsformen mit verzögerter Wirkstoffabgabe verwendet werden. Die Zusammensetzungen werden einem Patienten bei Bedarf der Antivirusaktivität in einer geeigneten Antivirusmenge verabreicht, die beispielsweise ausreicht, die HIV-Revertase zu hemmen und/oder die Replikation von HIV in Wirtszellen zu hemmen. Die Dosis wird nach einer geeigneten Dosierungs vorschrift verabreicht.

#### Beispiele

##### Beispiel 1

#### Synthese und Kennzeichnung von d4T-Derivaten

**[0019]** d4T1 wurde aus Thymidin nach dem Verfahren von Manuri et al, 1989, J. Med. Chem. 32, 461 hergestellt. Geeignet substituierte Phenylmethoxyalaninylphosphorochloridate wurden auch nach dem Verfahren, das von McGuigan et al, 1992, Antiviral Resp., 17, 311, berichtet wurde, hergestellt. Verbindungen 2–4 wurden, wie nachfolgend im Schema 1 dargestellt, synthetisiert.



**[0020]** Schema1. Phenylmethoxyalaninylphosphorochloridat wurde zu der Lösung von d4T und 1-Methylimi-

dazol in wasserfreiem THF zugesetzt, und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur während 5 bis 6 Stunden gerührt. Aufarbeitung des Reaktionsgemisches ergab die verlangten Derivate in guten Ausbeuten. Säulen-chromatographie wurde angewendet, um reine Verbindungen zu erhalten.

**[0021]** Die physikalischen Daten der synthetisierten Verbindungen wurden durch HPLC bestimmt, das unter Verwendung von C18 4 × 250 mm LiChrosphersäule, die mit Wasser/Acetonitril 70:30 mit der Fließgeschwindigkeit von 1 ml/Min eluiert wurde. Die Reinheit der folgenden Verbindungen überstieg 96% bei HPLC.  $^{13}\text{C}$  NMR-Peaks, markiert durch Sterne werden wegen Diastereomeren aufgespalten.

Verbindung 2: Ausbeute: 81 %, IR (nackt) 3222, 2985, 2954, 1743, 1693, 1593, 1491, 1456, 1213, 1153, 1039, 931, 769 cm<sup>-1</sup>;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 9,30 (br s, 1H), 7,30 – 7,10 (m, 6H), 6,85–6,82 (m 1H), 6,36–6,26 (m, 1H, 5,91–5,85 (m, 1H), 5,00 (br m, 1H), 4,19–3,68 (m, 4H), 3,72, 3,71 (s, 3H), 1,83, 1,80 (d, 3H), 1,38–1,25 (m, 3H),  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 173,9, 163,7, 150,7, 149,7, 135,7\*, 133,2\*, 129,6\*, 127,3\*, 125,0\*, 120,0, 111,1, 89,6\*, 84,5\*, 66,9\*, 52,5\*, 50,5\*, 20,9 und 12,3;  $^{31}\text{P}$  MR ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 2,66, 3,20 ; MALDI-TOF Masse m/e 487,9 (M + Na); HPLC-Verweilzeit: 5,54 & 5,85 Minuten.

Verbindung 3: Ausbeute 92%, IR (nackt) 3223, 3072, 2999, 2953, 2837, 1743, 1693, 1506, 1443, 1207, 1153, 1111, 1034, 937, 837 und 756 cm<sup>-1</sup>;  $^1\text{H}$  (NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 9,40 (br s, 1H), 7,30–7,00 (m, 5H), 6,83–6,81 (m, 1H), 6,37–6,27 (m, 1H), 5,91–5,86 (m, 1H), 5,00 (br m, 1H), 4,40–4,30 (m, 2H), 4,20–4,10 (m, 2H), 3,95–3,93 (s, 3H), 3,82–3,80 (s, 3H), 1,85–1,81 (s, 3H) und 1,39–1,29 (m, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 174,0, 163,9, 156,6, 150,8, 143,5, 135,8\*, 133,3\*, 127,4\*, 121,2\*, 114,5, 111,2, 89,7\*, 84,5, 66,9\*, 55,5, 52,5, 50,6\*, 20,9 und 12,3;  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 3,82, 3,20; MALDI-TOF Masse m/e 518,2 (M + Na); HPLC-Verweilzeit: 5,83 & 6,26 Minuten.

Verbindung 4: Ausbeute: 83%, IR (nackt): 3203, 3070, 2954, 2887, 2248, 1743, 1693, 1485, 1221, 1153, 1038, 912, 835, 73,3 cm<sup>-1</sup>;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 9,60 -9,58 (br s, 1H), 7,45 – 7,42 (m, 2H), 7,30–7,09 (m, 4H), 6,37–6,27 (m, 1H), 5,93–5,88 (m, 1H), 5,04–5,01 (br m, 1H), 4,35–4,33 (m, 2H), 4,27–3,98 (m, 2H), 3,71–3,70 (s, 3H), 1,85–1,81 (s, 3H), 1,37–1,31 (m, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 173,7, 163,8, 150,8, 149,7\*, 135,6\*, 133,1\*, 127,4\*, 121,9\*, 118,0, 111,2\*, 89,7\*, 84,4\*, 67,8\*, 52,5, 50,0\*, 20,7 und 12,3;  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) δ 3,41, 2,78; MALDI-TOF Masse m/e 567,1 (M + Na); HPLC-Verweilzeit: 12,04 & 12,72 Minuten.

## Beispiel 2

### Empfindlichkeit von Verbindungen 2–4 für Hydrolyse

**[0022]** [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) zeigen eine schematische Wiedergabe der elektronischen Wirkungen des para-Substituenten am Phenylring von Stoffwechselvorläufer B (siehe [Fig. 1](#)). Um die Empfindlichkeit von Verbindungen gegenüber Hydrolyse zu ermitteln, wurden Verbindungen 2 bis 4 in Methanol gelöst und dann mit 0,002 N NaOH behandelt. Die Konzentrationen wurden konstant gehalten, und die Erzeugung des Hydrolyseprodukts A-d4T-MP wurde unter Verwendung von HPLC überwacht. Eine Lichrospher-Kolonne (C18) wurde für die HPLC-Versuche verwendet. Die Kolonne wurde unter isokratischen Bedingungen unter Verwendung des Lösungsmittelgemisches Wasser/Acetonitril 70:30 eluiert, und das Eluierprofil ist in [Fig. 2C](#) gezeigt.

**[0023]** Hydrolyse von Verbindungen wurde in einem Schweineleberesterasesystem getestet. Die Daten sind in [Fig. 2C](#) gezeigt. Die Verbindungen 2 und 4 (1 mM in Tris-HCl) wurden mit 100 E Schweineleberesterase ((Sigma) in Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Aceton und durch Kühlen des Reaktionsgemisches angehalten. Nach dem Zentrifugieren mit 15.000 × g wurden Anteile von 0,1 ml des Reaktionsgemisches hinsichtlich des Vorhandenseins des aktiven Stoffwechselproduktes A-d4T-MP unter Verwendung einer quantitativen analytischen HPLC-Methode, die 50 pmol des Stoffwechselprodukts feststellen kann. Der Anteil von 0,1 ml des Reaktionsprodukts der Verbindung 4 enthielt 1,4 mmol A-d4T-MP, während kein Stoffwechselprodukt in dem Reaktionsprodukt der Verbindung 2 festgestellt wurde.

**[0024]** Wie in den [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) gezeigt, führt das Vorhandensein eines Elektronen abziehenden Substituenten in der para-Stellung des Phenylrestes wahrscheinlich zur Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeiten der Phenoxygruppe in dem Stoffwechselproduktvorläufer B ([Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#)), die durch die carboxyesteraseabhängige erste Stufe ([Fig. 1](#), A zu B) des Stoffwechselweges von Phenylphosphatderivaten von d4T erzeugt wird. Eine einzelne Bromsubstitution in der para-Stellung des Phenylringes würde das Erkennen und die Hydrolyse dieser Verbindung durch die Carboxyesterase (Stufe A zu B, [Fig. 1](#)) nicht stören. Eine elektronische Wirkung, induziert durch den Elektronen abziehenden para-Bromsubstituenten, würde zu einer verstärkten Hydrolyse von Phenoxygruppen C ergebendem D und anschließend E, den Vorläufern des Schlüsselreaktionsprodukts A-d4T-MP führen. Um diese Hypothese zu prüfen, verglichen wir die unsubstituierte Verbindung 2, para-Methoxy ( $\text{OCH}_3$ )-substituierte Verbindung 3 und para-Brom-substituierte Verbindung 4 (= d4T-5-p-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat) bzw. d4T-pBPMPA) hinsichtlich ihrer chemischen Hydrolysegeschwindigkeit nach Behandlung mit 0,002 NaOH durch Messung der Erzeugung von Alaninyl-d4T-Mono-

phosphat (A-d4T-MP).

**[0025]** Wie in [Fig. 2C](#) gezeigt, zeigte Verbindung 4 mit einem para-Bromsubstituenten eine viel schnellere Hydrolyse als die unsubstituierte Verbindung 2, während die Verbindung 3 mit dem Elektronendonor-Substituenten-OCH<sub>3</sub> in der para-Stellung eine langsamere Hydrolysegeschwindigkeit als jede jener zwei Verbindungen hatte. Ähnlich war die Bleiverbindung 4 empfindlicher gegenüber enzymatischer Hydrolyse durch Schweineleberesterase als die Verbindung 2 ([Fig. 2D](#)).

### Beispiel 3

#### Intrazellulärer Stoffwechsel von Verbindungen 2–4 in TK-Mangel-CEM-Zellen

**[0026]** Um den intrazellulären Stoffwechsel von 'Verbindungen 2–4 in TK-Mangel-Zellen zu analysieren, wurden  $1 \times 10^6$ -CEM-Zellen mit Verbindungen 2 – 4 (100  $\mu\text{M}$ ) während 3 Stunden inkubiert und anschließend hinsichtlich der Bildung des teilhydrolysierten Phosphatdiester-Stoffwechselprodukts Alaninyl-d4T-Monophosphats durch HPLC geprüft. Ersichtlich war die Menge dieses Stoffwechselprodukts in CEM-Zellen, die mit der Verbindung 4 behandelt wurden, wesentlich größer als in CEM-Zellen, die mit der Verbindung 2 oder 3 behandelt wurden (680 pmol/ $10^6$  Zellen gegenüber < 50 pmol/ $10^6$  Zellen, [Fig. 3](#)).

**[0027]** CEM-Zellen wurden in einem Medium gezüchtet, das aus RPMI, 10% Rinderfötusserum und 1 % Penicillin/Streptomycin bestand. Zehn Millionen Zellen mit einer Dichte von  $10^6$  Zellen/ml wurden mit 100  $\mu\text{M}$  dieser Verbindungen während 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und durch Zugabe von 0,5 ml 60% Methanol extrahiert. Die Zellylate wurden auf -20°C über Nacht gehalten, wonach die Lysate mit 15.000 × g während 10 Minuten zentrifugiert wurden, um die Zellbruchstücke zu entfernen. 100  $\mu\text{l}$ -Anteile dieser Lysate wurden direkt in HPLC eingespritzt. Das HPLC-System bestand aus einer Hewlett-Packard/HP Reihe 1100, ausgestattet mit einer quarternären Pumpe, einem automatischen Probennehmer, einem elektronischen Entgaser, einem Detektor mit Diodengruppe und einem Computer mit einem Chemstations-Softwareprogramm für Datenanalyse. Die Proben wurden auf 150 × 4,6 mm Sulpelco-LC-DB-C18-Säule eluiert. Ein Lösungsmittelgradient wurde benutzt, um das Stoffwechselprodukt von der ursprünglichen Verbindung aufzulösen, die aus einem Gemisch von Methanol und 10 mM Ammoniumphosphat (pH 3,7) bestand. Der Gradient lief bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/Min von 5 auf 35% Methanol während der ersten 10 Minuten, hielt sich während 5 Minuten auf 35% Methanol und endete mit einem linearen Gradienten von 35 auf 100% Methanol in den nächsten 20 Minuten. Die Ermittlungswellenlänge wurde auf 270 nm eingestellt. Ein Stoffwechselprodukt-Peak mit einer Verweilzeit von 8,7 Minuten entsprechend 680 pmol von A-d4T-MP wurde nur in Anteilen von CEM-Zellysaten, die mit Verbindung 4 inkubiert waren, detektiert.

**[0028]** Wegen ihrer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Hydrolyse wurde die Verbindung 4 als stärkeres Anti-HIV.-Mittel als die anderen Verbindungen postuliert. Verbindungen 2 – 4 sowie die Ausgangsverbindung d4T (1) wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, HIV-Replikation in peripheren einkernigen Bluttrellen und TK-Mangel-CEM-T-Zellen unter Verwendung der oben beschriebenen Verfahren (Zarling et al., 1990, *Nature* 347:92; Erice et al., 1993, *Antimicrob. Agents Chem other*, 37:835; Ukkun et al., 1998, *Antimicrob Agents Chemother*, 42:383) getestet. Der Prozentsatz der Hemmung von Virus-Replikation wurde durch Vergleich der p24- und RT-Aktivitätswerte der Meßsubstanz-behandelten infizierten Zellen mit jenen aus unbehandelten infizierten Zellen berechnet.

**[0029]** Parallel wurde die Zytotoxizität der Verbindungen unter Verwendung eines Mikrokultur-Tretrazoliumtests (MTA) von Zellvermehrung geprüft, wie in den obigen Artikeln von Zarling, Enrice und Ukkun beschrieben ist.

**[0030]** Die Ähnlichkeit der IC<sub>50</sub>-Werte für die Hemmung von HIV-1-Replikation, die in Tabelle 1 gezeigt ist, macht evident, daß die d4T-Arylphosphatderivate stärker als die ursprüngliche Verbindung d4T waren, wenn sie in peripheren einkernigen, HIV-1-infizierten Zellen getestet wurden. Gemäß den früheren Berichten war die Fähigkeit von 4dT, HIV-1-Replikation zu hemmen, im wesentlichen in TK-Mangel-CEM-Zellen reduziert. Während der IC<sub>50</sub>-Wert für die Hemmung von p24-Produktion durch d4T 18 nM in peripheren einkernigen Blutzellen war, war der Wert 556 nM in TK-Mangel-CEM-Zellen. Ähnlich wurde der IC<sub>50</sub>-Wert für die Hemmung der RT-Aktivität von 40 nM auf 2355 nM gesteigert (Tabelle 1). Während alle drei Arylphosphatderivate stärker als d4T in TK-Mangel-CEM-Zellen waren, war die Verbindung 4 (d4T-5'-[p-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat]) mit einem para-Bromsubstituenten in 12,6-mal stärker in der Hemmung von p24-Produktion (IC<sub>50</sub>-Werte: 44 nM gegenüber 556 nM) und 41,3-mal so stark in der Hemmung der RT-Aktivität (IC<sub>50</sub>-Werte: 57 nM gegenüber 2355

nM) als d4T (Tabelle 1).

Tabelle 1

		PBMNC			CEM		
Verbindung	X	IC <sub>50</sub> [p24]	IC <sub>50</sub> [RT]	IC <sub>50</sub> [MTA]	IC <sub>50</sub> [p24]	IC <sub>50</sub> [RT]	IC <sub>50</sub> [MTA]
1 (= d4T)		0,018	0,040	> 10	0,556	2,355	> 10
2	H	ND	ND	> 10	0,145	0,133	> 10
3	-OCH <sub>3</sub>	0,033	0,033	< 10	0,106	0,320	< 10
4	Br	0,022	0,042	> 10	0,044	0,057	> 10

**[0031]** Keine der getesteten Verbindungen zeigte feststellbare Zytotoxizität bei peripheren einkernigen Blutzellen oder CEM-Zellen bei Konzentrationen so hoch wie 10.000 nM, bestimmt durch MTA. Von sich aus war die Verbindung 3 mit einem para-Methoxysubstituenten im Arylrest 5- bis 6-mal weniger wirksam als die Verbindung 4 bei der Hemmung der RT-Aktivität in HIV-infizierten TK-Mangel-CEM-Zellen ( $IC_{50}$ -Werte: 320 nM gegenüber 57 nM), obwohl diese beiden Verbindungen ähnliche Aktivität in peripheren einkernigen Blutzellen zeigten ( $IC_{50}$ -Werte: 33 nM statt 42 nM). So scheint die Identität des para-Substituenten die Anti-HIV-Aktivität des Arylphosphatderivates von d4T in TK-Mangel-Zellen zu beeinflussen. Nach unserer Kenntnis ist dies die erste Demonstration, daß die Stärke sowie der Selektivitätsindex des d4T-Arylphosphatderivates wesentlich durch Einführung eines einzigen para-Bromsubstituenten im Arylrest verbessert werden kann. Diese bisher unbekannte Beziehung zwischen Struktur und Aktivität, die durch den Arylrest der Phosphatderivate von d4T bestimmt wurde, liefert eine Basis für die Gestaltung potentiell stärkerer d4T-Analoga.

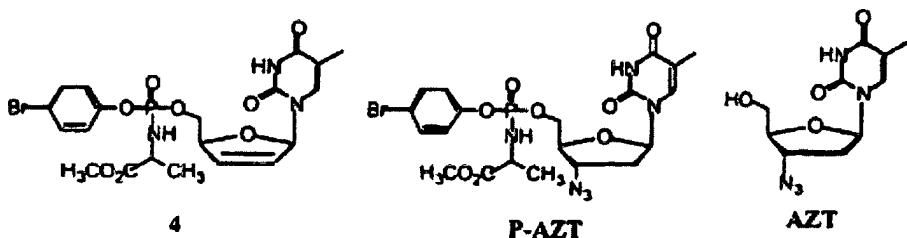
## Beispiel 4

#### Aktivität von Verbindung 4 und AZT in MDR-Zellen

**[0032]** Die Aktivität von Verbindung 4 (d4T-5'-[p-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat]) gegen HIV-MTR-Zellen wurde mit AZT-5'-[p-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat](P-AZT) und mit AZT verglichen. Die Inkubation und Analysemethoden, die verwendet wurden, waren wie oben in Beispiel 4 beschrieben.

[0033] Wie in Tabelle 2 gezeigt, haben P-AZT und AZT ähnliche Aktivitäten wie die IC<sub>50</sub>-Werte von 1,5 bzw. 2,0 nM. Die Aktivität von Verbindung 4 (0,02 nM) ist 100-fach wirksamer als AZT (2,0 nM).

Tabelle 2

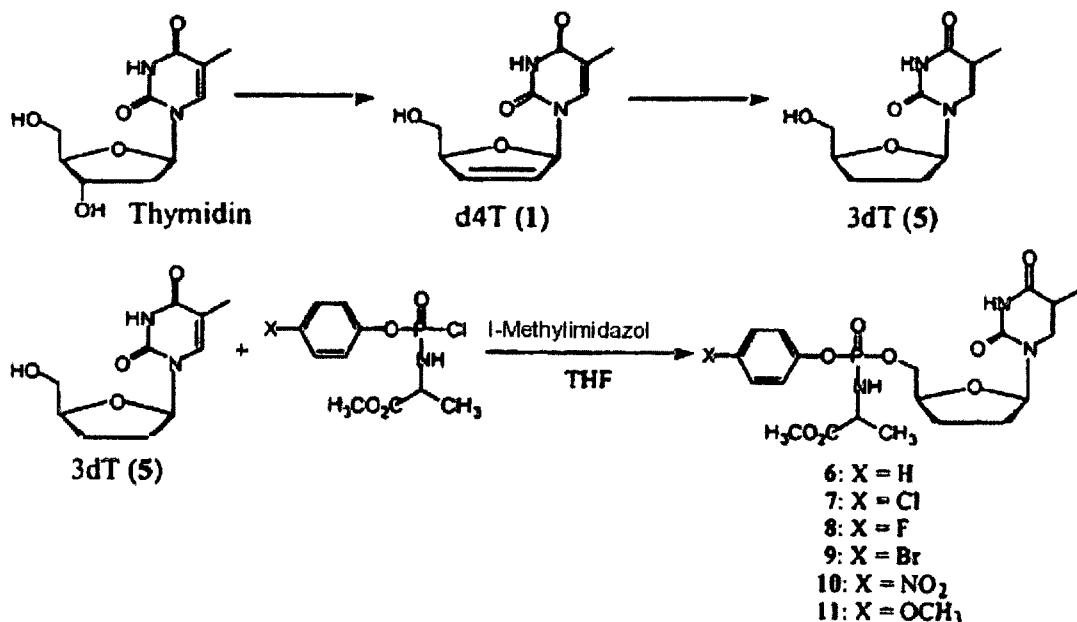


	HIV-2	HIC-MDR
Verbindung	IC <sub>50</sub> [RT]	IC <sub>50</sub> [RT]
\$	0,4	0,02
P-AZT	3,9	1,5
AZT	2,4	2,0

## Beispiel 5

## Synthese von Arylphosphatderivaten von 3dT

**[0034]** Zu weiteren Vergleichszwecken wurde der Effekt auf Anti-HIV-Aktivität verschiedener Substitutionen in der Arylgruppe von Arylphosphatderivaten von 3'-Dioxythymidin (3dT) untersucht. Wie in Schema 3, wurde 3dT 5 aus d4T 1 hergestellt, welches aus Thymidin unter Verwendung des Literaturverfahrens (Mansuri et al., 1989, J. Med. Chem. 32:461-466) hergestellt wurde. Hydrierung von 1 wurde in Ethanol in Gegenwart von H<sub>2</sub> und einer katalytischen Menge von 5%-igem Pd/C durchgeführt, um 3dT 5 in 85%-iger Ausbeute zu ergeben. Geeignete substituierte Phenylmethoxyalaninylphosphorochloridate wurden auch nach der Methode hergestellt, die von McGuigan et al., 1992, Antiviral Res. 17:311-321 beschrieben ist, und Verbindungen 6–11 wurden synthetisiert, wie in Schema 2 dargestellt ist.



**[0035]** Schema 2. Das geeignete substituierte Phenylmethoxyalaninylphosphorchloridat wurde zu einem Gemisch von 3dt und 1-Methylimidazol in wasserfreiem THF zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann wurde Lösungsmittel entfernt. Der resultierende Gummi wurde erneut in Chloroform aufgelöst und mit 1M HCl, gesättigter Natriumbicarbonatlösung (ausgenommen im Fall von NO<sub>2</sub>-Derivat) und dann mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mit Kieselgel-Säulenschwellechromatographie gereinigt, mit 5%-igem Methanol in Chloroform eluiert, um reine Verbindungen 6 – 11 in guten Ausbeuten zu ergeben.

**[0036]** Physikalische Daten der synthetisierten Verbindungen wurden bestimmt. HPLC wurde unter Verwendung von C18 4 × 250 mm LiChrospher-Säule und mit 70:30 Wasser/Acetonitril bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/Min durchgeführt. Die Reinheit der folgenden Verbindungen überstieg 96% mit HPLC. <sup>13</sup>C NMR-Peaks markiert durch Sterne sind aufgrund von Diastereomeren aufgespalten.

Verbindung 5: Ausbeute: 85%, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 11,1 (br s, 1H), 7,82 (s, 1H), 5,97 – 5,94 (m, 1H), 5,10 (br s, 1H), 4,05 – 3,95 (m, 1H), 3,72–3,52 (m, 2H), 2,30–1,86 (m, 4H), 1,77 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 163,9, 150,4, 136,4, 108,7, 84,8, 81,4, 62,2, 31,8, 25,1 und 12,5.

Verbindung 6: Ausbeute: 96%, IR (nackt) 3211, 2955, 2821, 1689, 1491, 1265, 1211, 1153, 1043 und 933 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 10,1 (br s, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,32–7,12 (m, 5H), 6,14–6,08 (m, 1H), 4,41–4,21 (m, 4H), 4,05–4,00 (m, 1H), 3,70, 3,69 (s, 3H), 2,37–2,32 (m, 1H), 2,05–1,89 (m, 7H), 1,38–1,35 (dd, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 173,6\*, 163,8, 150,3, 150,1\*, 135,2, 129,4\*, 124,7, 119,8\*, 110,5\*, 85,7\*, 78,3\*, 67,2\*, 52,3, 50,1\*, 31,6\*, 25,4\*, 20,7\* und 12,4\*; <sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2,82 & 3,11; MS (MALDI-TOF): 490,4 (M + Na); HPLC Rückhaltezeit = 6,86, 7,35 Minuten.

Verbindung 7: Ausbeute 96%; IR (nackt): 3217, 2954, 2821, 1743, 1689, 1489, 1265, 1217, 1153, 1092, 926 & 837 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 9,40 (br s, 1H), 7,43–7,41 (m, 1H), 7,30–7,14 (m, 4H), 6,13–6,07 (m, 1H), 4,39–4,00 (m, 5H), 3,71, 3,70 (a, 3H), 2,38–2,36 (m, 2H), 2,09–1,89 (m, 5H), 1,39–1,36 (dd, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 173,6\*, 163,7, 150,2, 148,8\*, 135,3, 129,5–129,0, 121,5–121,3, 116,3, 110,6, 86,0\*, 78,4\*, 67,7\*,

52,6\*, 50,2\*, 31,8\*, 25,4\*, 20,9\* und 12,5;  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,87 & 3,09 MS (MALDI-TOF); 524,9 (M + Na =); HPLC Rückhaltezeit = 14,5, 14,89 Minuten.

Verbindung 8: Viskoses Öl Ausbeute: 96%;  $\lambda_{\text{max}}$ : 223 ( $\epsilon$  3338) und 269 ( $\epsilon$  4695) nm; IR (nackt): 3211, 2955, 1743, 1693, 1500, 1569, 1265, 1197, 1153, 1045, 923 & 843  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,40 (br s, 1H), 7,45–7,43 (d, 1H), 7,19–7,01 (m, 4H), 6,14 – 6,06 (m, 1H), 4,39–3,97 (m, 5H), 3,71, 3,70 (s, 3H), 2,38–1,89 (m, 7H), 1,39 – 1,35 (t, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,6\*, 163,7, 150,2, 150,1\*, 135,3, 121,5\*, 116,3\*, 110,6\*. 85,9\*, 78,4\*, 67,7\*. 52,6, 50,2\*, 52,6, 50,2\*, 31,8\*, 25,6\*, 20,9\* und 12,5;  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3,13 & 3,37; MS (MALDI-TOF): 508,2 (M + Na); HPLC Rückhaltezeit = 8,38, 8,80 Minuten.

Verbindung 9: Ausbeute: 83%, IR (nackt) 3211, 2954, 1743, 1689, 1485, 1265, 1217, 1153, 1010, 923 & 833  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,82 (br s, 1H), 7,45–7,41 (m, 3H), 7,15–7,11 (m, 2H), 6,14–6,06 (m, 1H), 4,39 – 4,00 (m, 5H), 3,71, 3,70 (s, 3H), 2,38–1,89 (m, 7H), 1,39–1,35 (dd, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,6\*, 163,8, 150,3, 148,5\*, 135,2, 132,6\*, 121,8\*, 117,7, 110,6\*, 85,9\*, 78,3\*, 67,2\*, 52,5, 50,2\*, 31,6\*, 25,6\*, 20,8\* und 12,5;  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,83 & 3,05; MS (MALDI-TOF): 570,0 (M + 2 + Na); HPLC Rückhaltezeit = 15,30, 16,57 Minuten.

Verbindung 10: Ausbeute: 87%; IR (nackt): 3203, 2955, 1743, 1684, 1593, 1522, 1348, 1265, 1153, 1101, 920 % 860  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,51 (br s, 1H), 8,24–8,21 (m, 2H), 7,42–7,37 (m, 3H), 6,13–6,08 (m, 1H), 4,39–4,03 (m, 5H), 3,72, 3,71 (s, 3H), 2,38–1,89 (m, 7H), 1,41–1,38 (dd, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,4\*, 163,7, 155,2\*, 150,2, 144,4, 135,3, 125,9–125,4, 120,6, 115,4, 110,6\*, 86,1\*, 78,4\*, 68,1\*, 52,7, 50,2\*, 31,7\*, 25,8\*, 20,9\* und 12,5;  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,60 & 2,81; MS (MALDI-TOF): 535,0 (M + Na); HPLC Rückhaltezeit = 8,12, 10,14 Minuten.

Verbindung 11: Ausbeute: 100%; IR (nackt): 3209, 2954, 1743, 1506, 1468, 1265, 1207, 1153, 1036, 937 & 835  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,89 (br s, 1H), 7,49–7,47 (m, 1H), 7,16–7,11 (m, 2H), 6,84–6,80 (m, 2H), 6,15 – 6,09 (m, 1H), 4,39–4,02 (m, 5H), 3,77, 3,76 (s, 3H), 3,74, 3,73 (s, 3H), 2,38–1,89 (m, 7H), 1,38 – 1,33 (t, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,7\*, 163,9, 156,3, 150,3, 143,7\*, 135,2, 120,7\*, 114,3\*, 110,5, 85,7\*, 78,4\*, 67,3\*, 55,4, 52,4, 50,1\*, 31,8\*, 25,4\*, 20,8\* und 12,4\*;  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3,27 & 3,52; MS (MALDI-TOF): 521,3 (M + Na); HPLC Rückhaltezeit = 7,15, 7,66 Minuten.

## Beispiel 6

### Antivirus-Aktivität von 3dT-Verbindungen 6–11

**[0037]** Die Verbindungen 6–11 sowie die ursprüngliche Verbindung 3dT wurden in einem Vergleich Seite an Seite mit d4T hinsichtlich ihrer Fähigkeit, HIV-1-Replikation in peripheren einkernigen Blutzellen und TK-Mangel-CEM T-Zellen unter Verwendung früher beschriebener Verfahren zu hemmen (Zarling et al., 1990, Enrice et al., 1993, Uckun et al., 1998, siehe oben).

**[0038]** 3dT sowie dessen Derivate waren weniger aktiv als d4T in peripheren einkernigen Blutzellen sowie TK-Mangel-CEM T-Zellen (Tabelle 3). Bemerkenswerterweise waren in peripheren einkernigen Blutzellen die  $IC_{50}^{[RT]}$ -Werte für Verbindungen 6 – 11 höher als der  $IC_{50}^{[RR]}$ -Wert von 3dT (1,3–3,1 gegenüber 0,7, Tabelle 3), was vorschlägt, daß diese Vorarzneimittel genügend stabil sind und TK-unabhängige Stufen in ihrem Metabolismus, vielleicht ihrer enzymatischen Hydrolyse, geschwindigkeitsbegrenzend für die Erzeugung aktiver Stoffe sein können. Im Gegensatz dazu wurden Arylphosphatderivate von d4T als stärker als d4T beschrieben, was vorschlägt, daß die TK-abhängige Erzeugung von d4T-Monophosphat geschwindigkeitsbegrenzend in ihrer Stoffwechselaktivierung (McGuigan et al., 1996a) ist. In Übereinstimmung mit den berichteten Ergebnissen in der Literatur bezüglich biologischer Aktivität von Arylphosphatderivaten von d4T und AZT (McGuigan et al., 1993, 1996a) waren die Arylphosphatderivate von 3dT aktiver als die Ursprungsverbindung 3dT bei der Hemmung von HIV-1-Replikation in TK-Mangel-Zellen, obwohl mit noch höheren mikromolaren  $IC_{50}^{[RT]}$ -Werten (Tabelle 3).

**[0039]** Da die Verbindungen 6–11 weniger aktiv in TK-Mangel-CEM T-Zellen waren als sie in peripheren einkernigen Blutzellen (PBMNC) waren, wurde postuliert, daß die Umwandlung von 3dT-Monophosphat, das aus diesen Vorarzneimitteln in sein aktives Triphosphat umgewandelt wurde, mit einer viel langsameren Geschwindigkeit in Abwesenheit von TK abläuft. Durch Vergleich zeigten die Arylphosphatderivate von d4T ähnliche Aktivität in normalen und TK-Mangel-Zellen (McGuigan et al., 1996 Bioorg. Med. Chem. Lett. 6:1183–1186).

**[0040]** Anti-HIV-Aktivität von Arylphosphatderivaten von 3'-Deoxythymidin (6 – 11) in normalen peripheren einkernigen Bluttrellen (PBMNC) und TK-Mangel-CEM T-Zellen. Alle Daten sind in  $\mu\text{M}$  angegeben und repräsentieren Konzentrationen, die erforderlich sind, um Virus-Replikation zu hemmen, die durch Tests von RT-Aktivität, durch 50% ( $IC_{50}^{[RT]}$ )<sup>9</sup> oder 50%-ige zytotoxische Konzentration, gemessen durch MTA ( $IC_{50}^{[MTA]}$ ) (Mansuri et al., 1989 J. Med. Chem. 32:461).

Tabelle 3

Verbindung	X	PBMNC		CEM	
		IC <sub>50</sub> [RT]	IC <sub>50</sub> [MTA]	IC <sub>50</sub> [RT]	IC <sub>50</sub> [MTA]
6	H	2,1	< 100	7,5	< 100
7	Cl	2,1	< 100	21,9	< 100
8	F	3,1	< 100	32,7	< 100
9	Br	1,2	< 100	22,8	< 100
10	NO <sub>2</sub>	2,0	< 100	22,6	< 100
11	Qme	1,3	< 100	19,7	< 100
3dT	--	0,7	< 100	91,2	< 100
d4T	--	0,004	< 100	2,335	< 100

[0041] Wie in den [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#) gezeigt, sollte der elektronische Effekt von para-Substitutionen in dem Phenylrest die hydrolytische Umwandlung von B in D auf dem Stoffwechselweg von Arylphosphatderivaten von 3dT beeinflussen, wie in [Fig. 1](#) gezeigt. Das Vorhandensein eines Elektronen abziehenden Substituenten in der para-Stellung des Phenylrestes sollte, wie zu erwarten war, die Hydrolysegeschwindigkeiten der substituierten Phenoxygruppen in Verbindungen 7–10 ([Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#)) steigern. Diese Verbindungen waren aber nicht aktiver als die Verbindung 6 ohne para-Substitution oder die Verbindung 11 mit einem Elektronendonator-para-Substituenten, was die Hypothese stützt, daß die Carboxyesterase-abhängige erste Hydrolysestufe in ihrem Stoffwechsel (A zu B in [Fig. 1](#)) eine kritische und geschwindigkeitsbegrenzende Rolle für die Erzeugung von aktiven 3dT-Stoffwechselprodukten spielt. Somit können die Verbindungen 7–10 als relativ schlechte Substrate für die vermeintliche Carboxyesterase Verantwortung für ihre Hydrolyse gemäß Stoffwechselweg dienen, der für Arylmethoxyalaninylphosphatderivate von Nukleosidanalogen (McIntee et al., 1997 J. Med. Chem. 40:3323-3331) vorgeschlagen wird.

## Beispiel 7

## Anti-HIV-Aktivität von Derivaten von d4T, AZT und 3dT

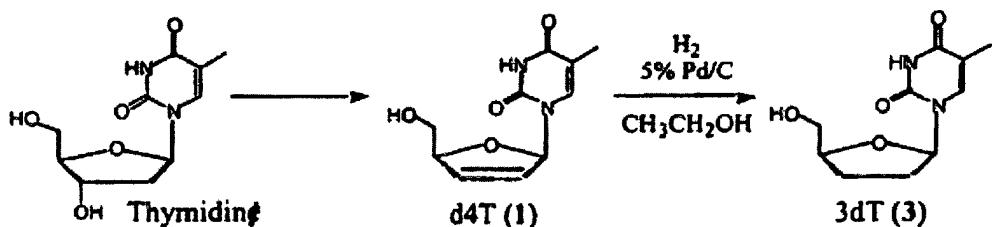
[0042] Wie in Schema 1 gezeigt, wurde d4T 1 aus Thymidin unter Verwendung des Literaturverfahrens (Mansuri et al., 1989, siehe oben) hergestellt. Hydrierung von 1 in Ethanol in Gegenwart von H<sub>2</sub> und katalytischer Menge von 0,5% Pd/C ergab 3dt 3 in 85%-iger Ausbeute (Schema 1).

[0043] AZT 2 wurde aus Thymidin unter Verwendung der Literaturmethoden (Chu et al., US-Patent 4,841,039) hergestellt. Die ddN-Phosphorylierungsmittel, die unterschiedliche Substituenten in ihren Phenoxyresten besitzen, 5a, 5b und 5c, wurden aus den handelsüblichen Phenolen in zweistufigen Verfahren (Schema 2) hergestellt (McGuigan et al., 1992, siehe oben), wo die Verbindungen 4a, 4b, 5a, 5b, 7a und 7b vorher beschrieben wurden. Die Verbindungen 4c und 5c sind neu, und ihre Syntheseverfahren sowie Charaktensierungsdaten sind nachfolgend aufgeführt.

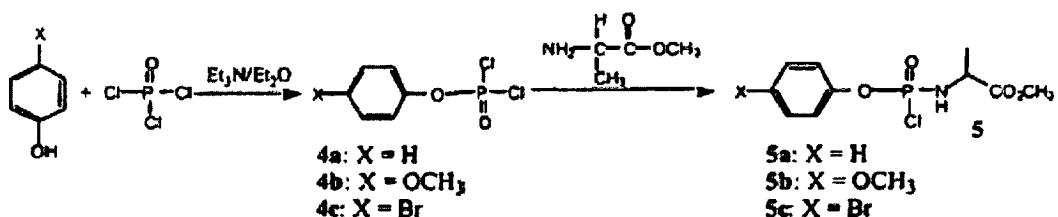
[0044] Die Synthese von Phenylmethoxyalaninylphosphatderivaten von d4T 1, AZT 2 oder 3dT 3 wurde unter den folgenden in der Literatur beschriebenen Bedingungen durchgeführt, wie in Schema 3 gezeigt ist (McGuigan et al., 1992). Die allgemeinen synthetischen Verfahren sind folgende: das geeignete substituierte Phenylmethoxyalaninylphosphorochloridat 5 wurde zu einem Gemisch des erwünschten ddN (1, 2 oder 3) und von 1-Methylimidazol in wasserfreiem THF zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, und dann wurde Lösungsmittel entfernt. Der resultierende Gummi wurde erneut in Chloroform aufgelöst und mit 1 M HCl, gesättigter Natriumbicarbonatlösung und dann mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde durch MgSO<sub>4</sub> getrocknet, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Kieselgel-Säulen-Schnellchromatographie unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches von Methanol und Chloroform zum Eluieren gereinigt und ergab die erwünschten reinen Verbindungen.

gen in guter Ausbeute.

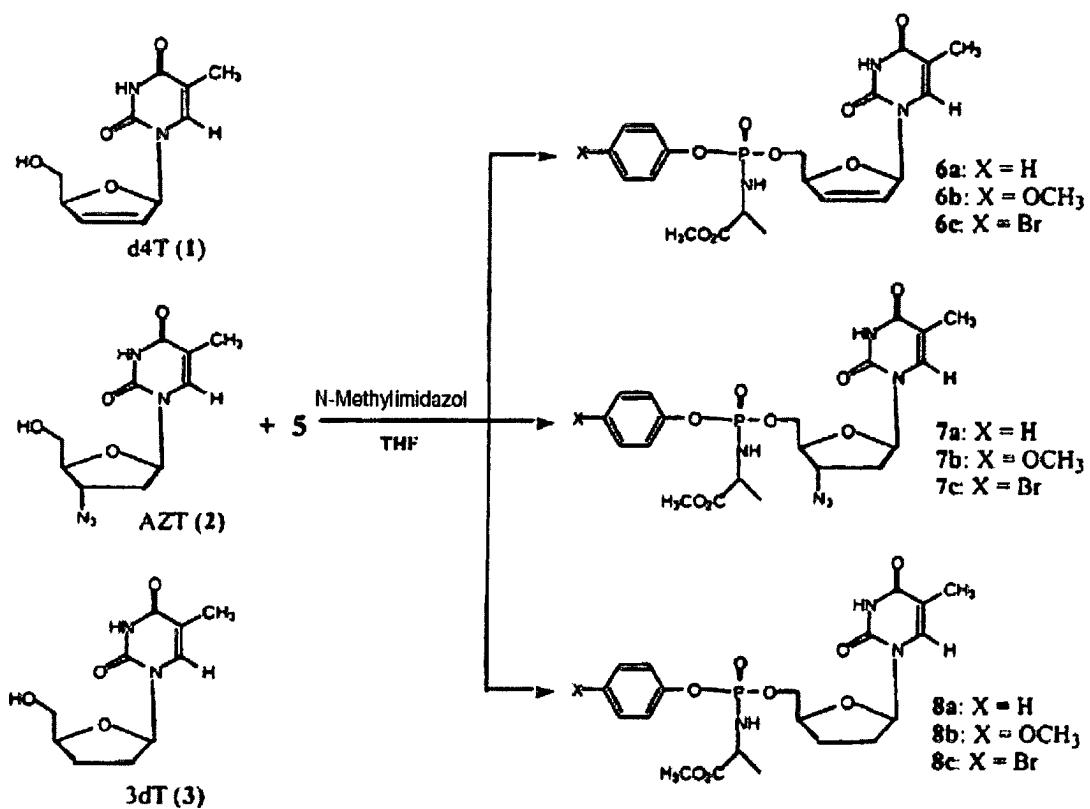
Schema 1. Synthese von d4T und 3dT



Schema 2. Synthese von Phenylmethoxyalaninylphosphorchloridaten



Schema 3. Synthese von Phenylmethoxyalaninylphosphatderivaten von ddN.



p-Bromphenylphosphorodichloridat 4c.

[0045] Nach dem von McGuigan et al., 1993, siehe oben, beschriebenen Verfahren wurde eine Lösung von p-Bromphenol (13,20 g, 76,30 mmol) und destilliertem Triethylamin (10,65 ml) in wasserfreiem Et<sub>2</sub>O (165 ml) tropfenweise zu einer heftig gerührten Lösung von Phosphorylchlorid (8,5 ml, 91,2 mmol) in wasserfreiem Et<sub>2</sub>O (83 ml) bei 0°C während einer Zeitdauer von 3 Stunden unter Stickstoffatmosphäre zugegeben. Nacheinander wurde das resultierende Gemisch allmählich bis zur Raumtemperatur erwärmt, wirksam über Nacht bei Raum-

temperatur gerührt und dann 2 Stunden auf Rückflußbedingungen erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur gekühlt und unter Saugdruck filtriert. Der Niederschlag wurde mit wasserfreiem Et<sub>2</sub>O (2 × 50 ml) gewaschen. Die vereinigten Et<sub>2</sub>O-Schichten wurden zur Trocknung auf einem Rotationsverdampfer eingedampft, um eine Rohausbeute 4c als ein gelbliches Öl zu ergeben, welches dann einer Vakuumdestillation unterzogen wurde, um reines 4c zu ergeben (14,05 g; 63,5%-ige Ausbeute) als ein farbloses viskoses Öl (Kp. 110–115°C/2 mm HG). IR (nackt) 3095, 1481, 1303, 1187, 948, 829cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,50 (2H, d, J = 9,0 Hz), 7,15 (2H, d, J = 9,0 Hz), GC/MS (m/e) 290 (M<sup>+</sup>), 254 (M<sup>+</sup> – Cl) 173 (M<sup>+</sup> – POCl<sub>2</sub>, <sup>81</sup>Br), 171 (M<sup>+</sup> – POCl<sub>2</sub>, <sup>79</sup>Br), 156 (M<sup>+</sup> – PO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, <sup>81</sup>Br), 154 (M<sup>+</sup> – PO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, <sup>79</sup>Br). Br), 355,9 (M<sup>+</sup>, <sup>79</sup>Br), 322,0 (M<sup>+</sup>, <sup>81</sup>Br), 320,0 (M<sup>+</sup> – Cl, <sup>79</sup>Br), 297,9 (M<sup>+</sup> – COOCH<sub>3</sub>, <sup>81</sup>Br), 295,9 (M<sup>+</sup> – COOH<sub>3</sub>), 184,0 (M<sup>+</sup> – BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O).

### p-Bromphenylmethoxyalaninylphosphorchloridat 5c.

**[0046]** Nach dem von McGuigan et al., siehe oben, beschriebenen Verfahren wurde eine Lösung von destilliertem Triethylamin (8,80 ml, 63,14 mmol) in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (180 ml) tropfenweise über einen zusätzlichen Trichter in eine heftig gerührte Lösung von p-Bromphenylphosphorodichloridat 4c (8,69 g, 29,97 mmol) und L-Alaninmethylesterhydrochlorid (4,19 g, 30,02 mmol) in wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 ml) bei –70°C während einer Zeitdauer von 3 Stunden unter Stickstoffatmosphäre zugegeben. Anschließend ließ man das resultierende Gemisch allmählich sich auf Raumtemperatur erwärmen und rührte über Nacht bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wurde auf einem Rotationsverdampfer entfernt. Wassertreies Et<sub>2</sub>O (300 ml) wurde zugegeben, um den Rückstand aufzulösen, und dann wurde unter Saugdruck filtriert, um den weißen Feststoff zu entfernen. Der weiße Feststoff wurde mit wasserfreiem Et<sub>2</sub>O (2 × 60 ml) gespült. Die Et<sub>2</sub>O-Schichten wurden vereinigt und zur Trockene eingedampft und ergaben eine quantitative Ausbeute von 5c (10,7 g) als ein fahl pink-gelbes viskoses Öl. Dieses Produkt wurde dann für die nächste Stufenreaktion ohne weitere Reinigung verwendet. IR (nackt) 3212, 2989, 2952, 1747, 1483, 1270, 1209, 1147, 927, 831, 757 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (1H, br, Ala-NH), 7,48 (2H, d, J = 9,0 Hz), 7,16 (2H, d, J = 9,0 Hz), 3,79 & 3,77 (3H, s & s, -OCH<sub>3</sub>), 1,51 & 1,40 (3H, d & d, Ala-CH<sub>3</sub>). MS (Cl, m/e) 357,9 (M<sup>+</sup>, <sup>81</sup>Br), 355,9 (M<sup>+</sup>, <sup>79</sup>Br), 320,0 (M<sup>+</sup> – Cl, <sup>79</sup>Br), 297,9 (M<sup>+</sup> – COOCH<sub>3</sub>, <sup>81</sup>Br), 295,9 (M<sup>+</sup> COOH<sub>3</sub>), 184,0 (M<sup>+</sup> – BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O).

### Kennzeichnungsdaten von Phenylmethoxyalaninylphosphatderivaten von AZT 1, d4T 2 und 3dT 3

**[0047]** HPLC wurde unter Verwendung von C18 4 × 250 mm LiChrospher-Kolonne mit Wasser/Acetonitril 70:30 bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/Min. eluiert. Die Reinheit der folgenden Verbindungen überschritt 96% durch HPLC. <sup>13</sup>C NMR-Peaks, markiert durch Sterne, wurden infolge von Diastereomeren, die aus den Phosphorstereozentren aufstiegen, gespalten.

Verbindung 6a: Ausbeute: 81%; IR (nackt): 3222, 2985, 2954, 1743, 1693, 1593, 1491, 1456, 1213, 1153, 1039, 931, 769cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 9,30 (br s, 1H), 7,30–7,10 (m, 6H), 6,85–6,82 (m, 1H), 6,36–6,26 (m, 1H), 5,91 – 5,85 (m, 1H), 5,00 (br m, 1H), 4,19–3,68 (m, 4H), 3,72, 3,71 (s, 3H), 1,83, 1,80 (d, 3H), 1,38–1,25 (m, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 173,9, 163,7, 150,7, 149,7, 135,7\*, 133,2\*, 129,6\*, 127,3\*, 125,0\*, 120,0, 111,1, 89,6\*, 85,4\*, 66,9\*, 52,5\*, 50,0\*, 20,9 und 12,3; <sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2,66, 3,20; MALDI-TOF Masse m/e 487,9 (M + Na); HPLC Rückhaltezeit: 5,54 & 5,85 Minuten.

Verbindung 6b: Ausbeute: 92%; IR (nackt): 3223, 3072, 2999, 2953, 2837, 1743, 1693, 1506, 1443, 1207, 1153, 1111, 1034, 937, 837 und 756 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 9,40 (br s, 1H), 7,30–7,00 (m, 5H), 6,83–6,81 (m, 1H), 6,37–6,27 (m, 1H), 5,91–5,86 (m, 1H), 5,00 (br m, 1H), 4,40–4,30 (m, 2H), 4,20–4,10 (m, 2H), 3,95–3,93 (s, 3H), 3,82–3,80 (s, 3H), 3, 82–3,80 (s, 3H), 1,85–1,81 (s, 3H) und 1,39–1,29 (m, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 174,0, 163,9, 156,6, 150,8, 143,5, 135,8\*, 133,3\*, 127,4\*, 121,2\*, 114,5, 111,2, 89,7\*, 84,5, 66,9\*, 55,5, 52,5, 50,6\*, 20,9 und 12,3; <sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 3,82, 3,20; MALDI-TOF Masse m/e 518,2 (M + Na); HPLC Rückhaltezeit: 5,83 & 6,26 Minuten.

Verbindung 6c: Ausbeute: 83%; IR (nackt) 3203, 3070, 2954, 2887, 1743, 1693, 1485, 1221, 1153, 1038, 912, 835, 733 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 9,60–9,58 (br s, 1H), 7,45–7,42 (m, 2H), 7,30–7,09 (m, 4H), 6,37–6,27 (m, 1H), 5,93–5,88 (m, 1H), 5,04–5,01 (br m, 1H), 4,35–4,33 (m, 2H), 4,27–3,98 (m, 2H), 3,71–3,70 (s, 3H), 1,85 – 1,81 (s, 3H), 1,37–1,31 (m, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 173,7, 163,8, 150,8, 149,7\*, 135,6\*, 133,1\*, 127,4\*, 121,9\*, 118,0, 111,2\*, 89,7\*, 84,4\*, 67,8\*, 52,5, 50,0\*, 20,7 und 12,3; <sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 3,41, 2,78; MALDI-TOF Masse m/e 567,1 (M + Na); HPLC Rückhaltezeit: 12,04 & 12,72 Minuten.

Verbindung 7c: Ausbeute: 95%; IR (nackt) 3205,7, 3066,3, 2954,5, 2109,8, 1745,3, 1691,3, 1484,9, 1270,9, 1153,2, 1010,5 und 926,1 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (1H, br, 3-NH), 7,45 (2H, d, J = 9,0 Hz, Aryl H), 7,34 & 7, 32 (1H, s & s, Vinyl H), 7,11 (2H, d, J = 9,0 Hz, Aryl H), 6,18 & 6,13 (1H, t & t, J = 6,6 Hz, Hz bei C-1'), 4,44–3,77 (6H, m, H bei C-3', 4' & 5', Ala-NH und Ala-CH), 3,73 & 3,72 (3H, s & s, -COOCH<sub>3</sub>), 2,51–2,20 (2H, m, H bei C-2'), 2,18 (3H, s, -CH<sub>3</sub> bei C-5), 1,39 & 1,36 (3H, d & d, Ala-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHZ, CDCl<sub>3</sub>) δ 173,6, 163,6, 150,1, 149,2, 149,1, 135,2, 132,4, 121,6, 117,8, 111,1, 85,0, 84,7, 81,9, 81,8, 65,5, 60,1, 59,9, 52,4, 50,0, 49,9, 36,9, 20,6, 20,5, 12,2. MS (Cl, m/e) 589,1 (M<sup>+</sup>, <sup>81</sup>Br) und 587,1 (M<sup>+</sup>, <sup>19</sup>Br).

Verbindung 8a: Ausbeute: 96%; IR (nackt) 3211, 2955, 2821, 1689, 1491, 1265, 1211, 1153, 1043 und 933  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,1 (br s, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,32–7,12 (m, 5H), 6,14–6,08 (m, 1H), 4,41–4,21 (m, 4H), 4,05 – 4,00 (m, 1H), 3,70, 3,69 (s, 3H), 2,37–2,32 (m, 1H), 2,05–1,89 (m, 7H), 1,38–1,35 (dd, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,6\*, 163,8, 150,3, 150,1\*, 135,2, 129,4\*, 124,7, 119,8\*, 110,5\*, 85,7\*, 78,3\*, 67,2\*, 52,3, 50,1\*, 31,6\*, 25,4\*, 20,7\* und 12,4\*;  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,82 & 3,11; MS (MALDI-TOF): 490,4 (M + Na); HPLC Rückhaltezeit = 6,86, 7,35 Minuten.

Verbindung 8b: Ausbeute: 100%; IR (nackt): 3209, 2954, 1743, 1506, 1468, 1265, 1207, 1153, 1036, 937 & 835  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,89 (br s, 1H), 7,49–7,47 (m, 1H), 7,16–7,11 (m, 2H), 6,84–6,80 (m, 2H), 6,15–6,09 (m, 1H), 4,39–4,02 (m, 5H), 3,77, 3,76 (s, 3H), 3,74, 3,73 (s, 3H), 2,38–1,89 (m, 7H), 1,38–1,33 (t, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,7\*, 163,9, 156,3, 150,3, 143,7\*, 135,2, 120,7\*, 114,3\*, 110,5, 85,7\*, 78,4\*, 67,3\*, 55,4, 52,4, 50,1\*, 31,8\*, 25,4\*, 20,8\* und 12,4\*;  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3,27 & 3,52; MS (MALDI-TOF): 521,3 (M + 1 + Na); HPLC Rückhaltezeit = 7,15, 7,66 Minuten.

Verbindung 8c: Ausbeute: 83%; IR (nackt): 3211, 2954, 1743, 1689, 1485, 1265, 1217, 1153, 1010, 9,23 & 833  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,82 (br s, 1H), 7,45–7,41 (m, 3H), 7,15–7,11 (m, 2H), 6,14–6,06 (m, 1H), 4,39–4,00 (m, 5H), 3,71, 3,70 (s, 3H), 2,38–1,89 (m, 7H), 1,39–1,35 (dd, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,6\*, 163,8, 150,3, 148,5\*, 135,2, 132,6\*, 121,8\*, 117,7, 110,6\*, 85,9\*, 78,3\*, 67,2\*, 52,5, 50,2\*, 31,6\*, 25,6\*, 20,8\* und 12,5;  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,83 & 3,05; MS (MALDI-TOF): 570,0 (M + 2 + Na); HPLC Rückhaltezeit = 15,50, 16,57 Minuten.

**[0048]** Zelluläre Tests von Anti-HIV-Aktivität und Zytotoxizität. Anti-HIV-Aktivitäten wurden in AZT-empfindlichem HIV-1 (Stamm: HTL VIIIB)-, AZT- und NNI-resistentem HIV-1 (Stamm: RTMDR-1)-(freundlicherweise von Dr. Brendan Larder, NIH AIDS Forschung- und Bezugsreagenzprogramm, DIV, AIDS, NIAID, NIH; Kat: Nr. 2529) oder HIV-2 (Stamm: CBL-20)-infizierte periphere einkernige Blutzellen (PBMNC) sowie HTLVIIIB-infizierten TK-Mangel-CEM T-Zellen ausgewertet durch Bestimmung der Konzentration der Verbindung, die benötigt wurde, um Virusreplikation um 50%, bezogen auf Revertase-Aktivitätversuche ( $\text{IC}_{50}[\text{RT}]$ ) zu hemmen. Der Prozentsatz von Virushemmung wurde durch Vergleichen der RT-Aktivitätswerte aus den mit der Testsubstanz behandelten infizierten Zellen mit RT-Werten von unbehandelt infizierten Zellen (d.h. Viruskontrollen) berechnet. Die 50%-igen zytotoxischen Konzentrationen der Verbindungen ( $\text{CC}_{50}[\text{MTA}]$ ) wurden mit Mikrokultur-Tetrazoliumversuchen (MTA) unter Verwendung von 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxid (XTT) (Zarling et al., 1990, Erice et al., 1993, Ukkun et al, 1998, siehe oben) gemessen.

Identifizierung von d4T-5'-(para-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat) und AZT-5'-(para-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat) als starkes Anti-HIV-Mittel.

**[0049]** Die d4T-Phenylphosphatderivate waren nicht stärker als die Ursprungsverbindung d4T beim Testen in HIV-1-infiziertem PBMNC. Die Fähigkeit von d4T, HIV-1-Replikation zu hemmen, wurde im wesentlichen in TK-Mangel-CEM-Zellen reduziert. Während der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für eine Hemmung der RT-Aktivität durch d4T mit 40 nM in PBMNC war, war er 2400 nM in TK-Mangel-CEM-Zellen (Tabelle 4 und [Fig. 4A–Fig. 4F](#)). Obwohl alle drei Phenylphosphatderivate stärker als d4T in TK-Mangel-CEM-Zellen waren, war die Verbindung 6c (d4T-5'-[p-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat]) mit para-Bromsubstituent in dem Phenylrest 60mal stärker bei der Hemmung der RT-Aktivität ( $\text{IC}_{50}$ -Werte: 60 nM gegenüber 2400 nM) als d4T (Tabelle 4).

**[0050]** Keine der Verbindungen zeigte irgendeine feststellbare Zytotoxizität für PBMNC- oder CEM-Zellen bei Konzentrationen so hoch wie 10.000 nM, bestimmt durch MTA. Höchst interessant ist, daß die Verbindung 6b mit einem para-Methoxysubstituenten im Phenylrest 5mal geringer wirksam war als die Verbindung 6c bei der Hemmung der RT-Aktivität in HIV-infizierten TK-Mangel-CEM-Zellen ( $\text{IC}_{50}$ -Werte: 300 nM gegenüber 60 nM), obwohl diese zwei Verbindungen ähnliche Aktivität in peripheren einkernigen Blutzellen zeigten ( $\text{IC}_{50}$ -Werte: 30 nM gegenüber 40 nM) (Tabelle 4).

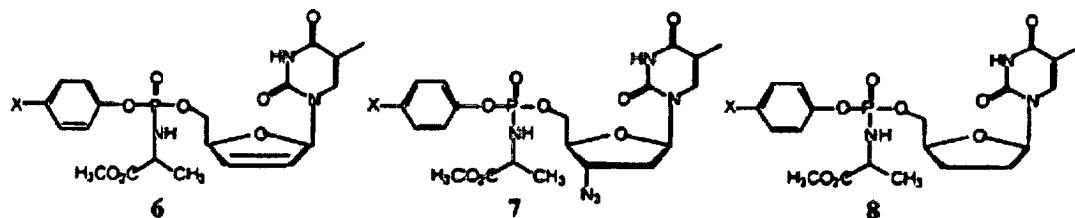
**[0051]** Verbindungen 7a, 7b, 7c und ihre Ursprungsverbindung AZT 2 wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet, HIV-Replikation in PBMNC und TK-Mangel-CEM T-Zellen zu hemmen (Tabelle 4). Die prozentuale Hemmung von Virus-Replikation wurde durch Vergleich der RT-Aktivitätswerte von den testsubstanzbehandelten infizierten Zellen mit jenen von unbehandelten infizierten Zellen berechnet. Parallel wurde die Zytotoxizität der Verbindungen unter Verwendung eines Mikrokultur-Tetrazolium-Assay (MTA) von Zellvermehrung geprüft. Die Fähigkeit von AZT 2 HIV-1-Replikation zu hemmen, wurde wesentlich in TK-Mangel-CEM-Zellen reduziert. Während der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für die Hemmung von RT-Aktivität durch AZT 3 nM in PBMNC war, war er 200 nM in TK-Mangel-CEM-Zellen. Unähnlich zu den entsprechenden d4T-Derivaten waren die unsubstituierten und para-substituierten Phenylphosphatderivate von AZT nicht stärker als die Ursprungsverbindung AZT beim Testen in HIV-1-infizierten TK-Mangel-CEM T-Zellen. Das para-Brom-substituierte Phenylphosphatderivat von AZT,

AZT-5'-(para-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat) 7c, war 5mal wirksamer als AZT bei der Hemmung von HIV-1-Replikation von TK-Mangel-CEM-Zellen ( $IC_{50}$ [RT]-Werte: 0,04  $\mu$ M gegenüber 0,2  $\mu$ M). Keine der Verbindungen zeigte irgendeine feststellbare Zytotoxizität für PBMNC- oder CEM-Zellen bei Konzentrationen so hoch wie 10.000 nM, bestimmt durch MTA.

**[0052]** Verbindungen 8a–c und ihre Ausgangsverbindung 3dT 3 wurden in Vergleichsversuchen Seite an Seite mit d4T 1 bezüglich ihrer Fähigkeit getestet, HIV-1-Replikation in PBMNC und TK-Mangel-CEM T-Zellen zu hemmen. 3dT sowie dessen Derivate waren weniger aktiv als d4T in peripheren einkernigen Blutzellen sowie TK-Mangel-CEM T-Zellen (Tabelle 4). Bemerkenswerterweise waren in peripheren einkernigen Blutzellen die  $IC_{50}$ [RT]-Werte für Verbindungen 8a–c höher als der  $IC_{50}$ [RT]-Wert von 3dt (1,2 bis 3,1 gegenüber 0,7 in Tabelle 4), was zum Vorschlag führte, daß diese Vorarzneimittel ausreichend stabil sind und TK-unabhängige Stufen in ihrem Stoffwechsel haben, vielleicht kann ihre enzymatische Hydrolyse geschwindigkeitsbegrenzend für die Erzeugung von aktiven Stoffen sein. Gemäß den berichteten Ergebnissen in der Literatur bezüglich der biologischen Aktivität von Phenylphosphatderivaten von d4T und AZT waren die Phenylphosphatderivate von 3dT aktiver als die Ursprungsverbindung 3dT bei der Hemmung von HIV-1-Replikation in TK-Mangel-Zellen, obwohl mit noch hohen mikromolaren  $IC_{50}$ [RT]-Werten (Tabelle 4 und [Fig. 4A–Fig. 4F](#)). Da Verbindungen 8a–c weniger aktiv in TK-Mangel-CEM T-Zellen waren als in PBMNC, postulieren wir, daß die Umwandlung von 3dT-Monophosphat in diesen Vorarzneimitteln in ein aktives Triphosphat bei viel langsamerer Geschwindigkeit in Abwesenheit von TK erfolgt.

Tabelle 4

Anti-HIV-Aktivität von Phenylmethoxyalaninylphosphatderivaten von d4T, AZT und 3dT in normalen peripheren einkernigen Bluttrellen (PBMNC) und TK-Mangel-CEM T-Zellen



Verbindung	X	PBMNC		CEM	
		IC <sub>50</sub> [RT]	IC <sub>50</sub> [MTA]	IC <sub>50</sub> [RT]	IC <sub>50</sub> [MTA]
6°	H	N.D.	N-D-	0,1	>10
6b	OCH <sub>3</sub>	0,03	>10	0,3	>10
6c	Br	0,04	>10	0,06	>10
7a	H	N.D.	N.D.	1,7	>10
7b	Ome	0,1	>10	4,1	>10
7c	Br	0,004	>10	0,004	>10
8a	H	2,1	>10	7,5	>10
8b	OMe	1,3	>10	19,7	>10
8c	Br	1,2	>10	22,8	>10
1 (d4T)	-	0,04	>10	2,4	>10
2 (AZT)	-	0,003	>10	0,2	>10
3 (3dT)	-	0,7	>10	91,2	>10

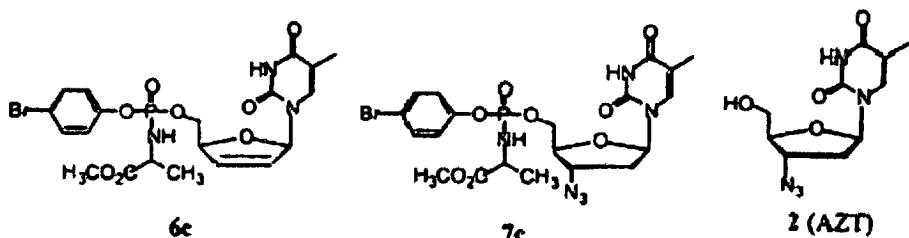
[0053] Aktivität der Bleiverbindungen d4T-5'(para-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat) und AZT-5'-(para-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat) gegenüber HIV-2 und RTMDR-1.

[0054] Die Bleiverbindungen 6c und 7c wurden in einem Vergleich Seite an Seite mit AZT 2 hinsichtlich ihrer Fähigkeit, HIV-Replikation in RTMDR-1, einem AZT- und NNI-resistenten Stamm von HIV-1 sowie HIV-2 in PBMNC (Tabelle 5) getestet. Das neue d4T-Derivat 6c, d4T-5'-(para-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat) hatte starke Antivirus-Aktivität gegenüber RTMDR-1 und mäßige Aktivität gegenüber HIV-2. Das entsprechende para-Brom-substituierte Phenylmethoxyalaninylphosphatderivat von AZT 7c und dem ursprünglichen

AZT-2 waren nicht so wirksam gegenüber AZT-resistantem RTMDR-1 oder wiederum HIV-2.

Tabelle 5

Anti-HIV-Aktivität von Bleiverbindungen 6c und 7c in HIV-2- und RTMDR-1-Zellen.



	HIV-2	RTMDR-1
Verbindung	IC <sub>50</sub> [RT]	IC <sub>50</sub> [RT]
6c	0,4	0,02
7c	3,9	1,50
2 (AZT)	2,4	2,0

**[0055]** Alle Daten sind in  $\mu\text{M}$  wiedergegeben und repräsentieren Konzentrationen, die erforderlich sind, um Virus-Replikation zu hemmen, wie durch Assays von RT-Aktivität um 50% ( $\text{IC}_{50}[\text{RT}]$ ) gemessen wurde.

**[0056]** Verbindungen 6a, 6b und 6c sind alle stärker als die Ursprungsverbindung d4T 1 in TK-Mangel-CEM-Zellen, während diese d4T-Phenylphosphatderivate (6a, 6b und 6c) nicht stärker als das ursprüngliche 4dT 1 in HIV-1-infizierten PBMNC (Tabelle 4) sind. Im Vergleich aller Phenylmethoxyalaninylphosphatderivate, derivatisiertem d4T, d4T-5'-[p-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat] 6c ist das stärkere Anti-HIV-Mittel in TK-Mangel-CEM-Zellen. Diese Beobachtung konnte dem para-Bromsubstituenten in dem Phenylrest von 6c zugeschrieben werden, der die Fähigkeit seines Phosphors, einer Hydrolyse zu unterliegen, infolge der Elektronen abziehenden Eigenschaft des Bromsubstituenten (**Fig. 2**) und in einer Erzeugung von wesentlich höheren Mengen des Schlüsselstoff wechselprodukts d4T-Monophosphat in den TK-Mangel-CEM T-Zellen (McIntee et al, 1997, J. Med. Chem. 40:32333-3331) schluckte.

**[0057]** Die Potenz von Phenyl-, Methoxyphenyl- und Bromphenylphosphat, hergeleitet von AZT in TK-Mangel-CEM-Zellen folgte auch dem gleichen Trend wie 4dT-Derivate, nämlich 7c (Bromphenyl) > 7a (Phenyl) > 7b Methoxyphenyl). Unter den drei Phenylmethoxyalaninylphosphatderivaten von AZT (7a, 7b und 7c) zeigt nur 7c höhere Stärke als AZT in TK-Mangel-CEM-Zellen ( $\text{IC}_{50}$ -Werte 40 nM gegenüber 200 nM). Für Phenylmethoxyalaninylphosphatderivate von 3dT (Tabelle 4) war das Vorhandensein eines Elektronen abziehenden Substituenten in der para-Stellung des Phenylrestes zu erwarten, daß die Hydrolysegeschwindigkeiten der substituierten Phenoxygruppe in der Verbindung 8c (zum Beispiel B zu C in **Fig. 2**) zunehmen. 8c war aber nicht aktiver als die Verbindung 8a ohne para-Substitution oder die Verbindung 8b mit einem Elektronen-donor-para-Substituenten, was die Hypothese stützt, daß die Carboxyesterase-abhängige erste Hydrolysestufe in ihrem Stoffwechsel (zum Beispiel A zu B in **Fig. 2**) eine kritische und geschwindigkeitsbegrenzende Rolle für die Erzeugung von aktiven 3dT-Stoffwechselprodukten spielt. Wir postulieren, daß die Verbindungen 8a, 8b und 8c als relativ schlechte Substrate für die vermutete Carboxyesterase als verantwortlich für ihre Hydrolyse gemäß dem Stoffwechselweg, vorgeschlagen für Phenylmethoxyalaninylphosphatderivate von Nukleosidanalogen (**Fig. 2**), dienen. Die Arylphosphatderivate von 3dT benahmen sich nicht wie etwas, was man aufgrund der veröffentlichten Arbeiten bezüglich des Stoffwechsels und der Aktivität der Vorarzneimittel, die von einem sehr ähnlichen Nukleosidanalogen, d4T, gebildet werden, erwartet hatte. Zu unserer großen Überraschung rie-

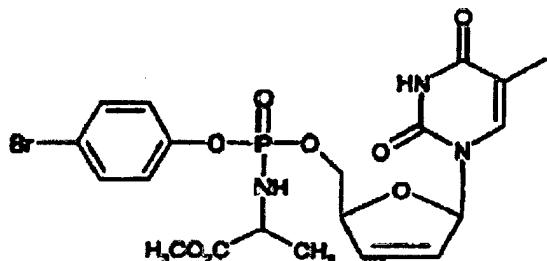
fen die Arylphosphatderivate von 3dT keine Hoffnung für Anti-HIV-Aktivität in HIV-1-infizierten normalen peripheren einkernigen Blutzellen oder TK-Mangel-CEM T-Zellenlinie hervor.

**[0058]** Zusammenfassend wurden d4T-5'-[p-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat] 6c und AZT-5'-[p-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat] 7c als aktive Anti-HIV-Mittel identifiziert, die aktiv HIV-Replikation in TK-Mangel-CEM T-Zellen ohne feststellbare Zytotoxizität hemmen. Außerdem hatten die neuen d4T-Derivate 6c eine starke Antivirus-Aktivität gegen RTMDR-1, einen AZT- und NNI-resistenten Stamm von HIV-1 sowie moderate Aktivität gegenüber HIV-2. Im Gegensatz zu diesen d4T- und AZT-Derivaten zeigte das entsprechende 3dT-Derivat, 3dT-5'[para-Bromphenylmethoxyalaninylphosphat] keine signifikante Anti-HIV-Aktivität in PBMNC oder TK-Mangel-CEM-T-Zellen.

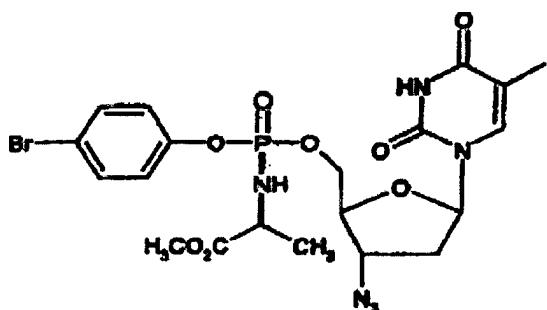
**[0059]** Soweit uns bekannt ist, ist dies der erste umfassende Bericht einer bisher unbekannten Strukturaktivitätsbeziehung, welche die Stärke von Phenylphosphatderivaten von d4T und AZT bestimmt. Weitere Entwicklung der Bleiverbindungen 6c und 7c können die Basis für die Gestaltung wirksamer HIV-Behandlungsstrategien sein, welche die HIV-Replikation in TK-Mangelzellen hemmen kann.

### Patentansprüche

1. Verbindung, ausgewählt unter



und

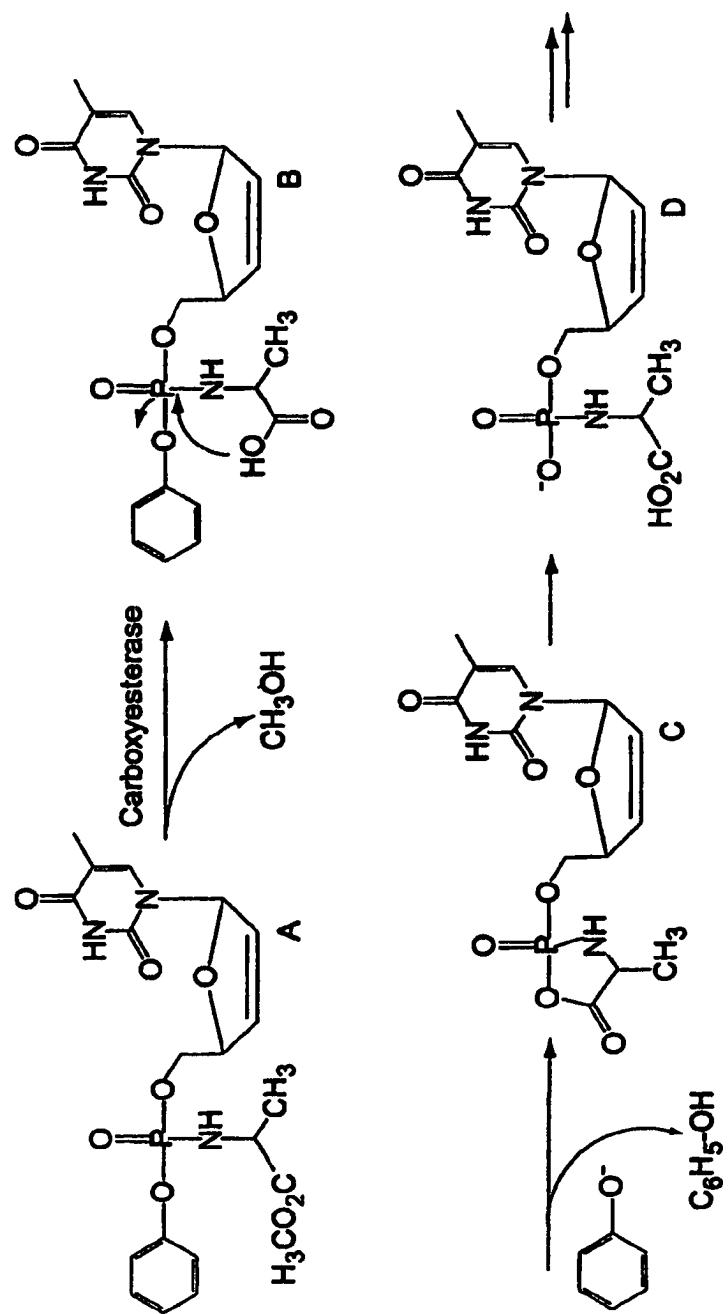


oder einem pharmazeutisch verträglichen Salz oder einem Ester hiervon.

2. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Verbindung nach Anspruch 1 und einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthält.
3. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 1 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Hemmung der HIV-Umkehrtransskriptaseaktivität in Zellen, die mit HIV infiziert sind.
4. Verwendung nach Anspruch 3, bei der das HIV-Multiarzneimittel resistent gegen Umkehrtransskriptaseinhibitor ist.
5. Verwendung nach Anspruch 3, bei der das HIV resistent gegen AZT und nicht-Nukleosid-Inhibitor ist.
6. Verwendung nach Anspruch 3, bei der das HIV der als RTMDR-1 bezeichnete Stamm ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

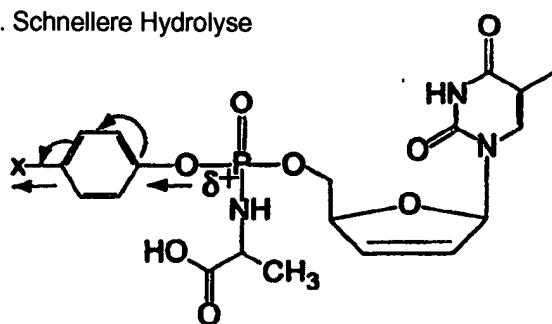
Fig. 1



In der Literatur vorgeschlagener Stoffwechselweg von Arylphosphatderivaten von d4T

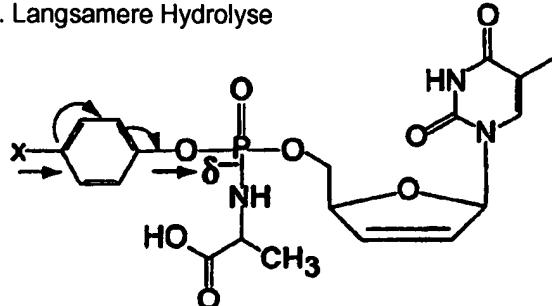
*Fig. 2A*

A. Schnellere Hydrolyse



$X$ = Elektronenanziehende Substitution (z.B. Br)

B. Langsamere Hydrolyse



$X$ =Elektronendonar (z.B. OCH<sub>3</sub>)

*Fig. 2B*

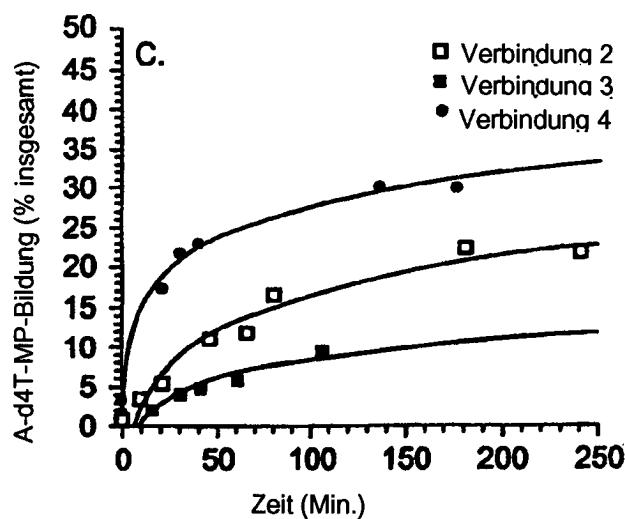


Fig. 2C

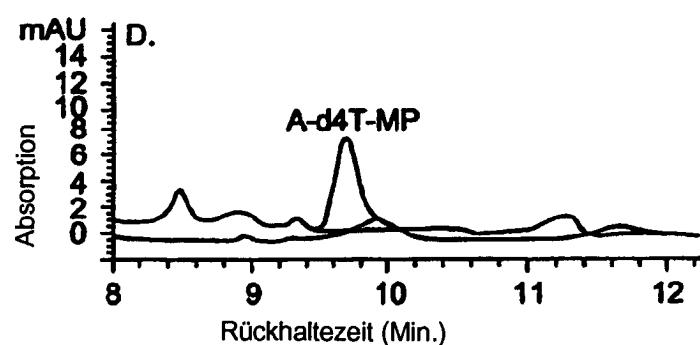
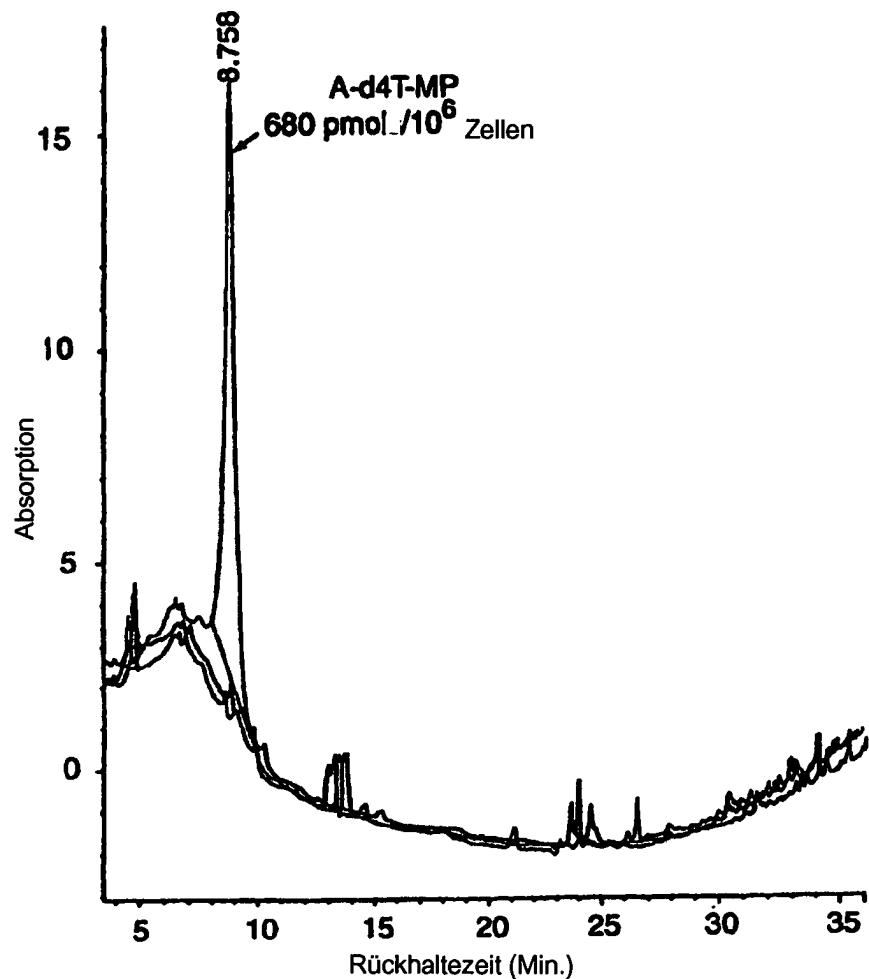
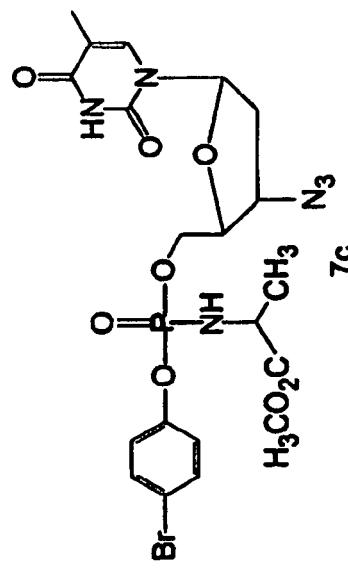


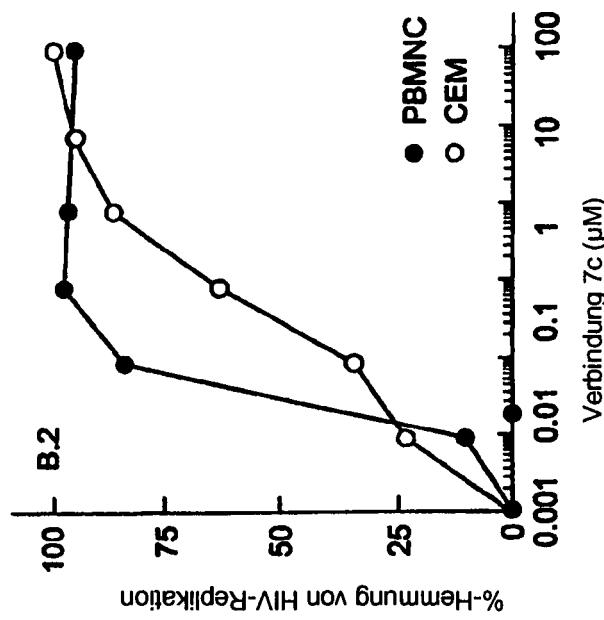
Fig. 2D



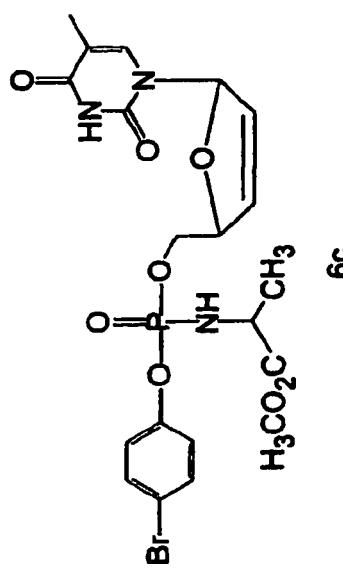
*Fig. 3*



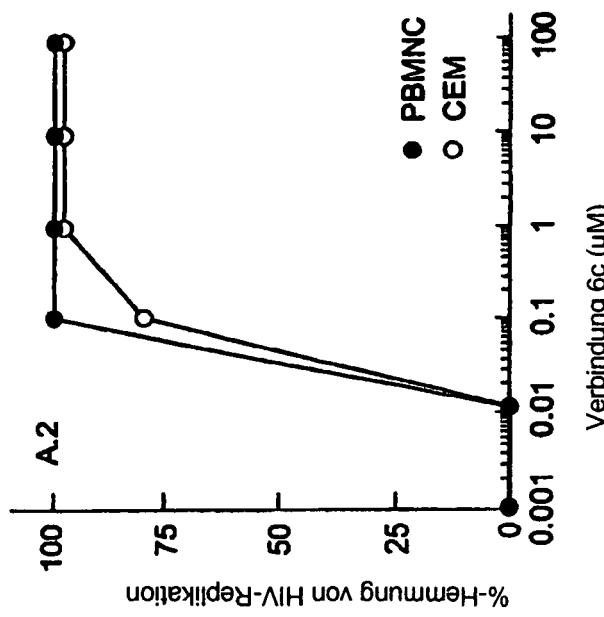
*Fig. 4B*



*Fig. 4D*



*Fig. 4A*



*Fig. 4C*

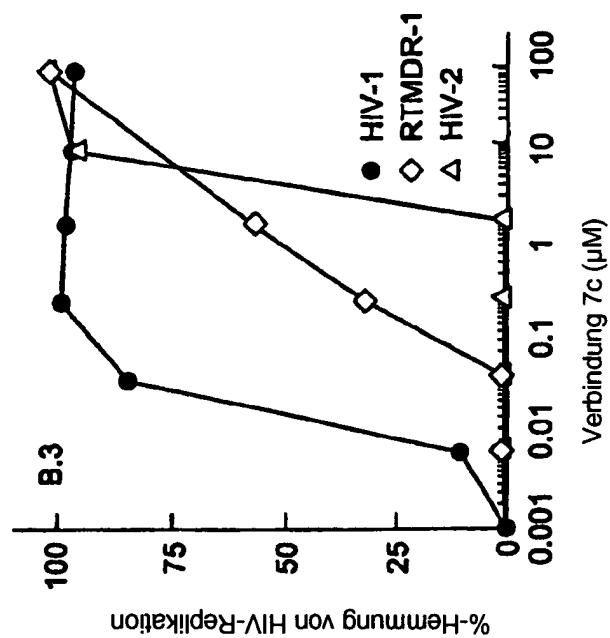


Fig. 4F

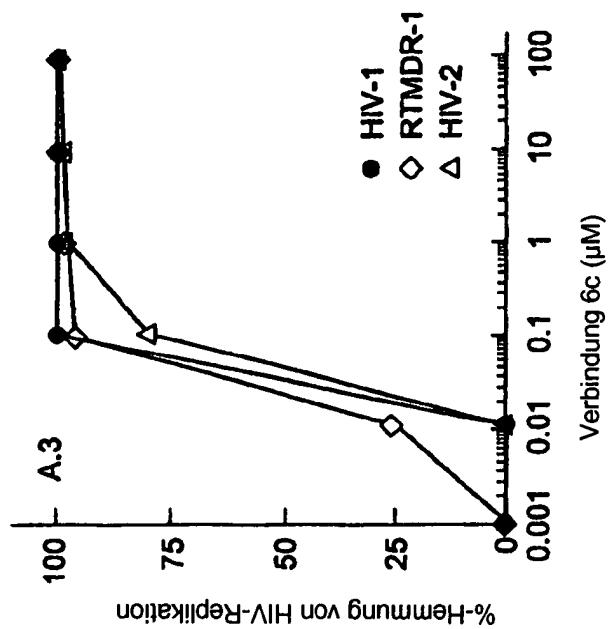
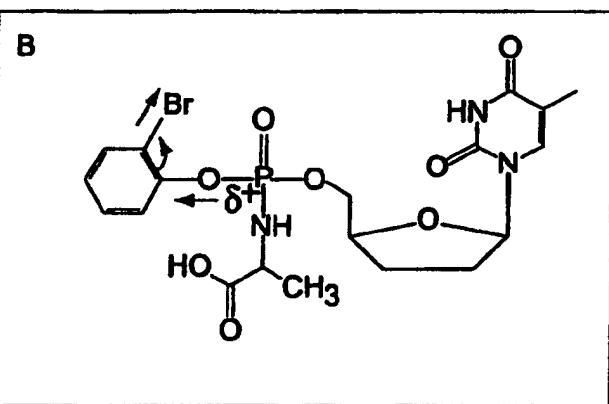
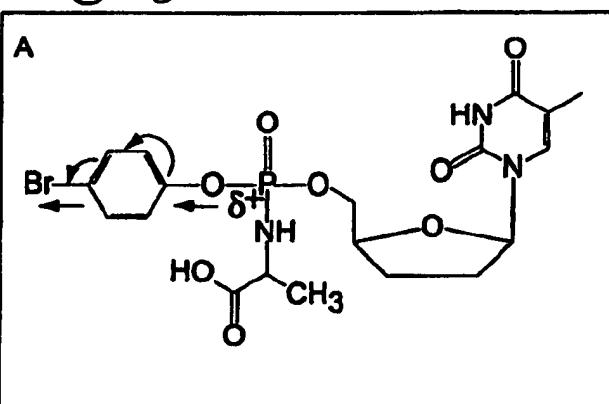


Fig. 4E

*Fig. 5A*



*Fig. 5B*