



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

(11) DD 290 808 A5

5(51) A 61 K 31/70
A 61 K 31:505
C 07 H 19:06

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD A 61 K / 319 023 0 (22) 17.08.88 (44) 13.06.91

- (71) Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE
(72) Matthes, Eckert, Dr. med.; von Janta-Lipinski, Martin, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Scholz, Dieter, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Gaertner, Klaus; Schildt, Jürgen; Lehmann, Christine; Langen, Peter, Prof. Dr. habil. Dipl.-Biol.; Rosenthal, Hans-Alfred, Prof. Dr. Dipl.-Biol., DE
(73) Akademie der Wissenschaften, Zentralinstitut für Molekularbiologie, O - 1115 Berlin; Humboldt-Universität, Institut für Medizinische Virologie der Charité, O - 1080 Berlin, DE
(74) Akademie der Wissenschaften, Zentralinstitut für Molekularbiologie, AG Patent- und Neuererwesen, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin-Buch, DE

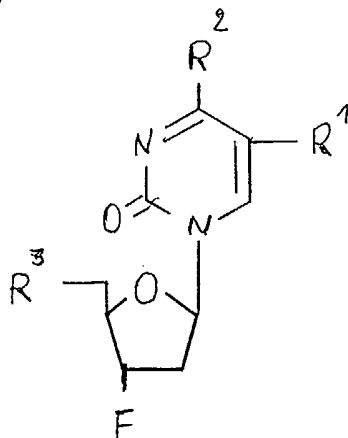
(54) Verfahren zur Herstellung eines Mittels für die Behandlung oder Prophylaxe von durch Retroviren verursachte Infektionen bei Mensch und Tier

(55) Verfahren; Retroviren; Infektionen; Mittel; Pyrimidinnucleoside; pharmazeutisch verträgliche Träger

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Mittels für die Behandlung oder Prophylaxe von durch Retroviren verursachten Infektionen bei Mensch und Tier. Anwendungsgebiet ist die pharmazeutische Industrie und Medizin. Es wurde gefunden, daß modifizierte Pyrimidinnucleoside allein oder mit pharmazeutisch verträglichen Trägerstoffen wirksame Mittel gegen HIV-Infektionen beim Menschen sind.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Mittels für die Behandlung oder Prophylaxe von Retrovirus-Infektionen bei Mensch und Tier, insbesondere die erworbene Immunschwäche AIDS beim Menschen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein oder mehrere Pyrimidinnucleoside der allgemeinen Formel I



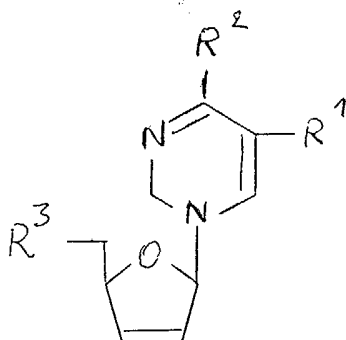
in der

R¹: Wasserstoff, Halogen, die Azidogruppe, eine aliphatische Alkylgruppe mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen, eine Alkenylgruppe mit 2 bis 5 Kohlenstoffatomen

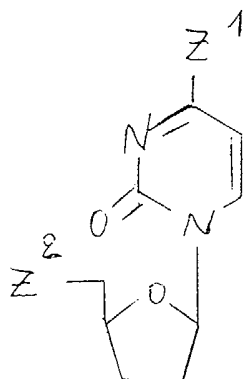
R²: Wasserstoff, die Thio-, Thiomethyl-, Hydroxylamino- bzw. eine Alkylaminogruppe

R³: Hydroxyl, O-Acetyl, O-Palmitoyl, O-Alkoxycarbonyl, Mono-, Di-, Triphosphat (als freie Säure oder Alkali-, Ammonium- oder Alkylammoniumsalze) oder eine Prekursorgruppe für die Hydroxylgruppe bedeuten,

und/oder substituierte Pyrimidinnucleoside der Formel II



in der R¹, R², R³ die o.g. Bedeutung besitzen, und/oder substituierte Pyrimidinnucleoside der allgemeinen Formel III



in der

Z¹: die Thiomethyl-, die Hydroxylamino- bzw. eine Aminoalkylgruppe

Z²: die in der Formel I unter R³ aufgeführten Gruppen bedeuten, mit pharmazeutisch annehmbaren Trägern vermischt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Verbindungen der allgemeinen Formeln I und/oder II bzw. III für eine Verabreichung mittels Injektion anpaßt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Verbindungen der allgemeinen Formeln I und/oder II bzw. III für eine Verabreichung mittels Infusion anpaßt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Verbindungen der allgemeinen Formeln I und/oder II bzw. III für eine orale Verabreichung anpaßt.
5. Verfahren nach Anspruch 1 und 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Verbindungen der allgemeinen Formeln I und/oder II bzw. III in die Form eines Dragees, einer Tablette, einer Kapsel, in die Pulver- oder Granulatform überführt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, 4 und 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß man gegebenenfalls ein Geschmacksmittel zusetzt.
7. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Verbindungen der allgemeinen Formeln I und/oder II bzw. III in die Form eines Zäpfchens überführt.
8. Verfahren nach Anspruch 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Verbindung der allgemeinen Formel I 1-(2',3'-Didesoxy-3'-fluor- β -D-ribofuranosyl)-5-methyl-(2)-pyrimidinon eingesetzt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Verbindung der allgemeinen Formel I 3'-Desoxy-3'-fluor-4-thiothymidin eingesetzt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Verbindung der allgemeinen Formel I 3'-Desoxy-3'-fluor-4-thiomethyl-thymidin eingesetzt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Verbindung der allgemeinen Formel I 3'-Desoxy-3'-fluor-4-hydroxylamino-thymidin eingesetzt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Verbindung der allgemeinen Formel I 2',3'-Didesoxy-3'-fluor-4-thio-5-chloruridin eingesetzt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Verbindung der allgemeinen Formel I 1-(2',3'-Didesoxy-3'-fluor- β -D-ribofuranosyl)-2-pyrimidinon eingesetzt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Verbindung der allgemeinen Formel I 2',3'-Didesoxy-3'-fluor-4-thiouridin eingesetzt wird.
15. Verfahren nach Anspruch 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Verbindung der allgemeinen Formel I 2',3'-Didesoxy-3'-fluor-4-hydroxymethylamino-uridin eingesetzt wird.
16. Verfahren nach Anspruch 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Verbindung der allgemeinen Formel II 2',3'-Didesoxy-4-dimethylamino-uridin eingesetzt wird.
17. Verfahren nach Anspruch 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Verbindung der allgemeinen Formel II 2',3'-Didesoxy-4-hydroxylamino-uridin eingesetzt wird.
18. Verfahren nach Anspruch 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Verbindung der allgemeinen Formel III 2',3'-Didehydro-4-thiothymidin eingesetzt wird.
19. Verfahren nach Anspruch 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Verbindung der allgemeinen Formel III 2',3'-Didehydro-5-methyl-2-pyrimidinon eingesetzt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Mittels für die Behandlung oder Prophylaxe von Retrovirus-Infektionen bei Mensch und Tier, insbesondere die erworbene Immunschwäche AIDS beim Menschen. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Medizin bzw. die pharmazeutische Industrie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

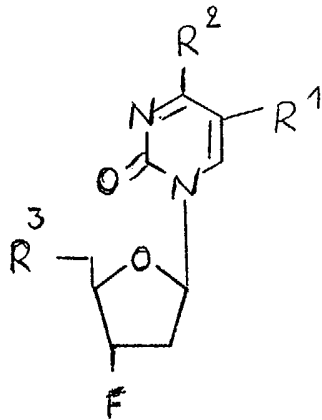
AIDS ist eine seit wenigen Jahren bekannte, durch das HIV (HTLV III/LAV, Human T-Lymphotropic Virus Type III/ Lymphadenopathy-Associated Virus) verursachte und zum Tode führende Infektionskrankheit. Als ursächlich muß die Zerstörung der T-Helfer-Zellen durch das AIDS-Virus angesehen werden. Als Folge der daraus resultierenden Abwehrschwäche treten schwere opportunistische Infektionen, das Kaposi Sarkom und eine sog. AIDS-Enzephalopathie auf. Eine wirksame und verträgliche antivirale Therapie fehlt bisher. Angriffspunkt dafür kann u. a. die Virus-kodierte Reverse Transkriptase sein, ein Enzym, dessen Hemmung die weitere intrazelluläre Virusvermehrung verhindern und damit seine Ausbreitung im Körper stoppen könnte. Die ersten klinisch erprobten Hemmstoffe der HIV-Revertase, wie z. B. Suramin (Germanin[®]) und HPA23 haben die notwendige Verträglichkeit und die erhoffte Wirksamkeit noch nicht erreicht, lediglich das 3-Azidothymidin (N₃TdR) (DE-QS 3500606) besitzt bei AIDS-Patienten mit einer Pneumocystis carinii Pneumonie eindeutig lebensverlängernde Wirkungen, die von Verbesserungen klinischer und neurologischer Befunde sowie der zeitweisen Wiederherstellung bestimmter immunologischer Funktionen begleitet sind (Fischl et al. The New England J. of Medicine 317, 185 [1987]). Demgegenüber machen toxische Nebenwirkungen des 3-Azidothymidins auf das Knochenmark bei etwa 50% der behandelten Patienten Bluttransfusionen erforderlich, was besonders auf die Notwendigkeit nach selektiveren Hemmstoffen der HIV-Reverse Transkriptase hinweist, während auch deren Wirksamkeit zu erhöhen ist.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, wirksamere und besser verträgliche Mittel zur Behandlung und Prophylaxe von Retrovirus-Infektionen bei Mensch und Tier bereitzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß werden ein oder mehrere Pyrimidinnucleoside der allgemeinen Formel I

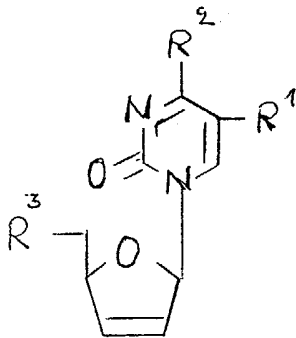


in der

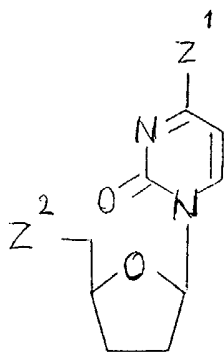
R¹: Wasserstoff, Halogen, die Azidogruppe, eine aliphatische Alkylgruppe mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen, eine Alkenylgruppe mit 2 bis 5 Kohlenstoffatomen

R²: Wasserstoff, die Thio-, Thiomethyl-, Hydroxylamino- bzw. eine Alkylaminogruppe

R³: Hydroxyl, O-Acetyl, O-Palmitoyl, O-Alkoxycarbonyl, Mono-, Di-, Triphosphat (als freie Säure oder Alkali-, Ammonium- oder Alkylammoniumsalze) oder eine Prekursorgruppe für die Hydroxylgruppe bedeuten, und/oder substituierte Pyrimidinnucleoside der Formel II



in der R¹, R², R³ die o.g. Bedeutung haben, und/oder substituierte Pyrimidinnucleoside der allgemeinen Formel III



in der

Z¹: die Thiomethyl-, die Hydroxylamino- bzw. eine Aminoalkylgruppe

Z²: die in der Formel I unter R³ aufgeführten Gruppen bedeuten, mit pharmazeutisch annehmbaren Trägern vermischt.

Verbindungen der Formel I und/oder II und III stellen auch allein (ohne Träger) bereits wirksame Mittel gegen Retrovirus-Infektionen dar. Die erfindungsgemäßen Mittel enthalten eine oder mehrere Wirkkomponenten, entsprechend der allgemeinen Formel I und/oder II und/oder III zusammen mit einem oder mehreren verträglichen Trägern dafür und gegebenenfalls mit anderen therapeutischen Mitteln. Die Mittel werden als Einheitsdosis hergestellt oder so, daß ein Mehrfaches der Wirkkomponenten enthalten ist. Jeder Träger muß verträglich sein, mit den anderen Bestandteilen der Mittel vereinbar und darf für den Patienten nicht schädlich sein.

Die Mittel schließen solche ein, die für orale, rektale, nasale, topische, vaginale oder parenterale (einschließlich subkutane, intramuskuläre, intravenöse und intradermale) Verabreichung geeignet sind. Eine bzw. mehrere Wirkkomponenten werden mit dem Träger, der sich aus einen oder mehreren Begleitbestandteilen zusammensetzt, in Kontakt gebracht und, falls erforderlich, in eine entsprechende Form gebracht.

Die Mittel für eine orale Verabreichung werden in Form von Dragees, Tabletten, Kapseln, als Pulver oder Granulat so hergestellt, daß sie jeweils eine bestimmte Menge des aktiven Bestandteiles enthalten. Ebenso können sie als Lösung oder als Suspension hergestellt werden. Gegenebenenfalls werden Geschmacksmittel oder andere übliche Mittel zugesetzt. Mittel für eine rektale Verabreichung werden als Zäpfchen mit einer geeigneten Base hergestellt. Mittel für eine vaginale Verabreichung werden als Pessare, Tampons, Cremes, Gele, Pasten, Schäume oder Spray-Produkte hergestellt.

Die Mittel für die parenterale Verabreichung können als Einheitsdosis der Wirkkomponente oder als Mehrfachdosis vorgesehen werden. Dafür können sie in Ampullen, Phiolen oder in einem gefriergetrockneten Zustand gelagert werden. Unmittelbar zubereitete Injektionslösungen und Suspensionen können aus sterilen Pulvern, Granulat und Tabletten erhalten werden. Das erfolgt z. B. durch Lösen der Substanz in physiologischer Kochsalzlösung, Glukose oder anderen für die i. v. Injektion bzw. Infusion geeigneten Mitteln.

Folgende Verbindungen erwiesen sich als besonders wirksam:

- 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor- β -D-ribofuranosyl)-5-methyl-(1H)-pyrimidin-2-on (I);
- 3'-Desoxy-3'-fluor-4-thiothymidin (I);
- 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor- β -D-ribofuranosyl)-4-methylmercapto-5-methyl-(1H)-pyrimidin-2-on (I);
- 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor- β -D-ribofuranosyl)-4-hydroxylamino-5-methyl-(1H)-pyrimidin-2-on (I);
- 5-Chlor-1-(2,3-didesoxy-3-fluor- β -D-ribofuranosyl)-4-thiouracil (I);
- 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor- β -D-ribofuranosyl)-4-hydroxylamino-(1H)-pyrimidin-2-on (I);
- 1-(2,3-Didesoxy- β -D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-4-dimethylamino-(1H)-pyrimidin-2-on (II);
- 1-(2,3-Didesoxy- β -D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-4-hydroxylamino-(1H)-pyrimidin-2-on (II);
- 3-Desoxy-4-thiothymidin (III);
- 1-(2,3-Didesoxy- β -D-glycero-pentofuranosyl)-5-methyl-(1H)-pyrimidin-2-on (III).

Die Wirksamkeit einiger der erfindungsgemäßen Verbindungen wird wie folgt belegt:

1. Selektive Hemmung der HIV-assoziierten Reverse Transcriptase (HIV-RT) durch das Triphosphat von 3-Fluor-4-thiothymidin

Für diese Untersuchungen wurde der Effekt der genannten Verbindung auf die Aktivität sowohl der HIV-RT als auch der zellulären DNA Polymerase α und β entsprechend den von Matthes et al. in, Biochem. Biophys. Res. Commun. 148, 78 (1987) beschriebenen Methoden bestimmt. Den Enzymsätzen wurde 3-Fluor-4-thiothymidintriphosphat in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und aus der erhaltenen Hemmkurven die Konzentrationen von 3-Fluor-4-thiothymidintriphosphat bestimmt, die die untersuchten Polymerasen zu jeweils 50% hemmen (ID_{50}). Für die HIV-RT wurde eine ID_{50} von 0,2 μ M, für die DNA Polymerase α , dem für die zelluläre Replikation hauptverantwortlichen Enzym, eine ID_{50} von 140 μ M und für die DNA Polymerase β , dem zellulären DNA Reparatur-Enzym, eine ID_{50} von 7 μ M bestimmt. Damit hemmt 3-Fluor-4-thiothymidintriphosphat die HIV-RT 700mal stärker als die zelluläre DNA Polymerase α und besitzt damit eine weitgehend selektive Wirkung auf die HIV-Replikation.

2. Die Hemmung des zytopathischen Effekts von HIV auf T-Lymphozyten

Eine Infektion von T-Lymphozyten mit HIV führt unter In-vitro-Bedingungen innerhalb weniger Tage ihren Zelltod herbei. Wir benutzen die von Harada et al., Science 229, 563 (1985) beschriebenen MT-4-Zellen in einem Testsystem (Matthes et al., Biochem. Biophys., Res. Commun. 153, 825 [1988]) um zu prüfen, inwieweit die erfindungsgemäßen Nucleoside die zelltötende Wirkung von HIV-1 (HTLV III_g) auf diese T-Zelllinie aufheben können. In der Tabelle sind die Konzentrationen wiedergegeben, die zu einem 50% Schutz der MT-4-Zellen führen. Außerdem ist die antiproliferative Wirksamkeit der untersuchten Nucleoside aufgeführt und zwar als die Konzentration, die die Zellvermehrung der MT-4-Zellen um 50% herabsetzt (CD_{50}).

Tabelle: Vergleich der antiviralen und antiproliferativen Wirksamkeit von Nucleosidanaloga an MT-4-Zellen

untersuchtes Nucleosid	50 % antivirale Dosis (ED_{50} ; μ M)	50 % zytotoxische Dosis (CD_{50} ; μ M)
3'-Fluor-4-thiothymidin	1,8	480
2',3'-Didesoxy-3'-fluor-4-thiouridin	15	130
1-(2,3-Didesoxy-3-fluor- β -D-ribofuranosyl)-4-methylmercapto-5-methylpyrimidin-2-on	> 1 000	> 1 000
1-(2,3-Didesoxy-3-fluor- β -D-ribofuranosyl)-4-methylmercapto-pyrimidin-2-on	12	50
1-(2,3-Didesoxy-3-fluor- β -D-ribofuranosyl)-4-hydroxylamino-5-methylpyrimidin-2-on	110	300
1-(2,3-Didesoxy-3-fluor- β -D-ribofuranosyl)-4-hydroxyl-amino-pyrimidin-2-on	100	100

3. Zytotoxizität von 3'-Fluor-4-thiothymidin gegenüber Zellkulturen in vitro

Die Ergebnisse an den MT-4-Zellen haben gezeigt, daß 3'-Fluor-4-thiothymidin die Zellvermehrung dieser T-Zelllinie kaum beeinflusst. Eine Reihe weiterer menschlicher Zelllinien wurde in die Untersuchung der antiproliferativen Wirkung von 3'-Fluor-4-thiothymidin einbezogen und folgende CD_{50} -Werte gefunden:

- 1. REH, akute lymphatische Leukämie = 500 μ M
- 2. HELF 1, menschliche embryonale Lungenfibroblasten = 700 μ M
- 3. H-9, immortalisierte T-Zelllinie = > 800 μ M
- 4. Molt-4, immortalisierte T-Zelllinie = > 1 000 μ M

Darüber hinaus besitzt 3'-Fluor-4-thiothymidin in Konzentrationen bis 100 μ M, gegenüber den koloniebildenden Zellen des Knochenmarks der Maus (GM-CFU) keinerlei wachstumsbeeinträchtigende Wirkung.

Zusammenfassend kann 3'-Fluor-4-thiothymidin daher als wirksamer Hemmstoff der HIV-Replikation mit sehr geringer Zytotoxizität charakterisiert werden.

Die Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formeln I, II und III erfolgt in Analogie zu an sich bekannten Verfahren. Im Falle der Darstellung der 4-Thioverbindungen erfolgte die Modifizierung des Heterocyclus in Anlehnung an das von J. J. Fox et al. genutzte Verfahren (J. J. Fox, J. Amer. Chem. Soc. 81, 178 [1959]).

Beispiel 1

Darstellung von 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-thiouracil

1,3 mMol 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-uracil werden in 45 ml Pyridin gelöst und mit 1,1 ml Acetanhydrid versetzt. Das Reaktionsgemisch verbleibt über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Lösung eingedunstet, der Rückstand in Toluol gelöst und erneut zur Trockne konzentriert. Der Vorgang wird mehrfach wiederholt. Der schließlich gewonnene Rückstand wird in 30 ml Pyridin gelöst, mit 3,9 mMol Phosphorpentasulfid versetzt und 6 Std. unter Rückfluß erhitzt. Nach dieser Reaktionszeit werden weitere 1,3 mMol Phosphorpentasulfid addiert (J. J. Fox et al., J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 178; G. Kowollik et al. J. Prakt. Chem., 1973, 315, 895) und es wird für 6 Std. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten des Reaktionsgemisches wird der flüssige Anteil abgetrennt und i. Vak. zur Trockne eingedunstet. Der resultierende Rückstand wird an Kieselgel 40 (MERCK) mit Chloroform als Elutionsmittel säulenchromatographisch gereinigt. Aus den entsprechenden Fraktionen wird 1-(5-0-Acetyl-2,3-didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-thiouracil isoliert und ergibt nach dem Umkristallisieren aus 90% Ethanol 97 mg, F. 140–140,5°C. 15 mg (0,06 mMol) dieser Verbindung werden in 2 ml Methanol gelöst und mit 2 ml Methanol, bei 0°C mit Ammoniak gesättigt, versetzt. Nach 24 Std. wird die Lösung zur Trockne eingedunstet. Die Zielverbindung wird als Glas erhalten. MS: m/z 246 (C₉H₁₁N₂O₃FS, M⁺), 128 (C₄H₄N₂OS, Base + H), 119 (C₅H₈O₂ F, Zuckerrest).

Beispiel 2

Darstellung von 1-(5-0-Acetyl-2,3-didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-thiothymine

400 mg (1,4 mMol) 5'-0-Acetyl-3'-fluor-thymidin werden mit 933 mg Phosphorpentasulfid in 32 ml Pyridin für 24 Std. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Vertreiben des Lösungsmittels wird der Rückstand an Kieselgel 40 säulenchromatographisch getrennt und liefert die gewünschte Verbindung als gelbes Öl. MS: m/z 302 (C₁₂H₁₅N₂O₄SF, M⁺), 161 (C₇H₁₀O₃F, Zuckerrest), 142 (C₅H₈N₂OS, Base).

Beispiel 3

Darstellung von 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-thiothymine

18 mg (0,07 mMol) der im Beispiel 2 erhaltenen Verbindung werden in 2 ml Methanol gelöst, das bei 0°C mit Ammoniak gesättigt wurde und verbleiben 24 Std. bei Raumtemperatur. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-thiothymine als glasiger Rückstand isoliert. MS: m/z 260 (C₁₀H₁₃N₂O₃KFS, M⁺), 142 (C₅H₈N₂OS, Base + H), 119 (C₅H₈O₂F, Zuckerrest).

Beispiel 4

Darstellung von 1-(5-0-Acetyl-2,3-didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-hydroxylamino-(1H)-pyrimidin-2-on

70 mg (0,24 mMol) 1-(5-0-Acetyl-2,3-didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-thiouracil werden in 5 ml Methanol gelöst, mit 1 ml Hydroxylamin in 12 ml Methanol versetzt und 4 Std. unter Rückfluß erhitzt. Die dünnstschichtchromatographische Kontrolle der Reaktionslösung zeigt eine vollständige Reaktion des Ausgangsproduktes. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel 40 mit Chloroform (2% Methanol) als Elutionsmittel gereinigt. Aus den entsprechenden Fraktionen werden 60 mg der gewünschten Verbindung erhalten, die aus 90% Ethanol Kristalle ergeben. F. 192–193°C. MS: m/z 287 (C₁₁H₁₄H₃O₅F, M⁺), 161 (C₇H₁₀O₃F, Zuckerrest), 127 (C₄H₅N₂O₃, Base + H).

Beispiel 5

Darstellung von 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-hydroxylamino-(1H)-pyrimidin-2-on

50 mg der in Beispiel 4 erhaltenen Verbindung werden in üblicher Weise mit Ammoniak/Methanol entacetyliert. Die Titelverbindung wird als glasartiger Rückstand isoliert. MS: m/z 245 (C₉H₁₂N₃O₄F, M⁺), 127 (C₄H₅N₂O₃, Base + H), 119 (C₅H₈O₂F, Zuckerrest).

Beispiel 6

Darstellung von 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-methylmercapto-5-methyl-(1H)-pyrimidin-2-on

Eine Lösung von 70 mg (0,23 mMol) 1-(5-0-Acetyl-2,3-didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-thiothymine, 0,23 ml 1 N NaOH-Lösung und 0,044 ml Methyljodid in 4 ml 50%igem Methanol wird 2 Std. bei Raumtemperatur belassen und anschließend mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 5 gebracht. Nach dem Vertreiben des Lösungsmittels werden aus dem Rückstand 45 mg 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-methylmercapto-5-methyl-(1H)-pyrimidin-2-on gewonnen, die nach dem Umkristallisieren aus Ethanol 32 mg des reinen Produktes ergeben. F. 192–194°C. MS: m/z 274 (C₁₁H₁₅N₂O₃FS, M⁺), 156 (C₆H₈N₂OS, Base + H), 119 (C₅H₈O₂F, Zuckerrest).

Beispiel 7

Darstellung von 1-(5-0-Acetyl-2,3-didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-hydroxylamino-5-methyl-(1H)-pyrimidin-2-on

93 mg (0,31 mMol) 1-(5-0-Acetyl-2,3-didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-thiothymine werden mit einer Lösung von 1 ml Hydroxylamin in 15 ml Methanol versehen und 4 Std. unter Rückfluß erhitzt. Der nach dem Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. verbleibende Rückstand wird an 75 g Kieselgel 40 mit Chloroform als Fließmittel säulenchromatographisch gereinigt. Aus den entsprechenden Fraktionen werden insgesamt 51 mg eines Produktes erhalten, das nach dem Umkristallisieren aus Methanol 35 mg 1-(5-0-Acetyl-2,3-didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-hydroxylamino-5-methyl-(1H)-pyrimidin-2-on ergibt. F. 180 bis 181°C. MS: m/s 301 (C₁₂H₁₆N₃O₅F, M⁺), 161 (C₇H₁₀O₃F, Zuckerrest), 141 (C₅H₇N₃O₂, Base + H).

Beispiel 8**Darstellung von 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-hydroxylamino-5-methyl-(1H)-pyrimidin-2-on**

45 mg der im Beispiel 7 dargestellten Verbindung werden in herkömmlicher Weise mit Ammoniak/Methanol behandelt und ergeben nach dem Kristallisieren 27 mg 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-hydroxylamino-5-methyl-(1H)-pyrimidin-2-on.

MS: m/z 259 (C₁₀H₁₄N₃O₄F, M⁺), 141 (C₆H₇N₃O₂, Base + H), 119 (C₆H₈O₂F, Zuckerrest).

Beispiel 9**Darstellung von 1-(5-O-Acetyl-2,3-didesoxy-β-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-4-thiothymin**

Zu einer Lösung von 450 mg (2 mMol) 3'-Desoxy-2'-Thymidinen in 10 ml Pyridin wird 1 ml Acetanhydrid gegeben. Das Reaktionsgemisch verbleibt für 10 Std. bei Raumtemperatur. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. vertrieben. Der verbleibende Rückstand wird in absolutem Ethanol gelöst. Die Lösung wird zur Trockne eingeeengt. Dieser Vorgang des Lösens in Ethanol und Vertreibens des Lösungsmittels wird solange wiederholt, bis ein kristallines Material erhalten wird, das aus Methanol umkristallisiert wird, F. 183°C.

MS: m/z 266 (C₁₂H₁₄N₂O₅, M⁺), 141 (C₇H₉O₃, Zuckerrest), 126 (C₆H₆N₂O₂, Base + H).

Das im Vakuum getrocknete 1-(5-O-Acetyl-2,3-didesoxy-β-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)thymin wird in 25 ml absolutem Pyridin gelöst und mit 2 g Phosphorpentasulfid für 48 Std. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wird vom Unlöslichen dekantiert und die Lösung im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Der resultierende Rückstand wird an Kieselgel 40 mit Chloroform als Elutionsmittel säulenchromatographisch getrennt. Aus den das Produkt enthaltenden Fraktionen werden nach dem Umkristallisieren aus Methanol 265 mg 1-(5-O-Acetyl-2,3-didesoxy-β-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-4-thiothymin gewonnen.

MS: m/z 282 (C₁₂H₁₄N₂O₄S, M⁺), 141 (C₇H₉O₃, Zuckerrest), 142 (C₆H₆N₂OS, Base + H).

Beispiel 10**Darstellung von 1-(2,3-Didesoxy-β-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-4-thiothymin**

Zu 100 mg der im Beispiel 9 synthetisierten Verbindung werden 10 ml Methanol, das bei 0°C mit Ammoniak gesättigt wurde, addiert. Das Reaktionsgemisch verbleibt für 12 Std. bei Raumtemperatur und wird anschließend zur Trockne eingeeengt. Aus Methanol/Ether werden Kristalle erhalten. F. 117–118°C.

MS: m/z 240 (C₁₀H₁₂N₂O₃S, M⁺), 209 (C₉H₉N₂O₂S, M-H₂O), 142 (C₆H₆N₂OS, Base + H).

Beispiel 11**Darstellung von 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-thiothymin-5'-triphosphat**

60 mg 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor-β-D-ribofuranosyl)-4-thiothymin (0,21 mMol) werden in 0,5 ml Trimethylphosphat gelöst und bei 0°C mit 0,0423 ml Phosphoroxychlorid versetzt (Yoshikawa et al., Tetrahedron Lett., 5065 [1967]). Das Reaktionsgemisch verbleibt für 2 Std. bei 0°C, wird anschließend mit 10 ml Eiswasser behandelt und mit Triethylamin neutralisiert. Nach dem Hinzufügen von 300 ml Wasser wird die Reaktionslösung an DEAE-Sephadex säulenchromatographisch mit Triethylammoniumbicarbonat 0–0,3 M als Eluens getrennt. Aus den entsprechenden Fraktionen wird das 5'-Monophosphat isoliert. Dieses Produkt wird mittels DOWEX WX8 (Pyridinium-Form) in das Tri-n-butylammoniumsalz übergeführt, nach der Entfernung des Lösungsmittels mit N,N'-Carbonyldiimidazol aktiviert und mittels Tetra-n-Tributylammoniumpyrophosphat in DMF in bekannter Weise (D. E. Hoard et al., J. Am. Chem. Soc., **87**, 1785 [1965]), in das 5'-Triphosphat gewandelt. Die Verbindung wird an DEAE-Sephadex mit einem Gradienten von Triethylammoniumbicarbonat 0–0,5 M eluiert. Aus den entsprechenden Fraktionen wird ein Produkt erhalten, aus dem nach dem Entfernen des Elutionsmittels mit Natriumjodid in bekannter Weise das Natriumsalz der Titelverbindung gewonnen wird.

Phosphatbestimmung: 16%.