



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 281 346 A5

5(51) A 61 K 31/70

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP A 61 K / 303 489 6

(22) 03.06.87

(44) 08.08.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

(72) Matthes, Eckart, Dr. med.; Lehmann, Christine; Scholz, Dieter, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; von Janta-Lipinski, Martin, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Gaertner, Klaus; Langen, Peter, Prof. Dr. habil. Dipl.-Biol.; Rosenthal, Hans-Alfred, Prof. Dr. Dipl.-Biol., DD

(73) siehe (71)

(54) Verfahren zur Herstellung eines Mittels gegen HIV-Infektionen beim Menschen

(55) Verfahren; Mittel; HIV-Infektionen; pharmazeutische Industrie; substituierte Pyrimidin- oder Purinderivate; pharmazeutische Träger

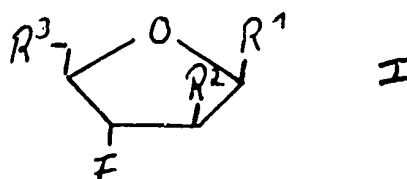
(57) Verfahren zur Herstellung eines Mittels gegen HIV-Infektionen beim Menschen. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die pharmazeutische Industrie bzw. die Medizin. Erfindungsgemäß werden ein oder mehrere substituierte Pyrimidin- oder Purinnucleoside der allgemeinen Formel I mit pharmazeutisch annehmbaren Trägern vermischt. R¹ = Thymin, 5-substituierte Uracile, Uracil, Cytosin, 5-substituierte Cytosinderivate, 2-Fluoradenin, 2,6-Diaminopurin, 2-Aminopurin, 6-Thioguanin oder 7-DeazaadeninR² =

H oder OH

R³ =

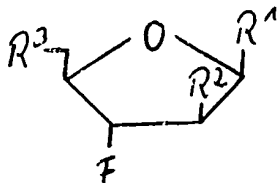
OH, O-Acetyl, O-Palmitoyl, Triphosphat (als freie Säure, bzw. deren Alkali-, Ammonium- bzw. Alkylammoniumsalze) oder eine Prekursor-Gruppe für die Hydroxygruppe.

Formel I



Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Mittels gegen HIV-Infektionen beim Menschen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein oder mehrere substituierte Pyrimidin- oder Purinnucleoside der allgemeinen Formel!



in der

R^1 = Thymin, 5-substituierte Uracile, Uracil, Cytosin, 5-substituierte Cytosinderivate, 2-Fluoradenin, 2,6-Diaminopurin, 2-Aminopurin, 6-Thioguanin oder 7-Deazaadenin

R^2 = H oder OH

R^3 = OH, O-Acetyl, O-Palmitoyl, Triphosphat (als freie Säure, bzw. deren Alkali-, Ammonium- bzw. Alkylammoniumsalze) oder eine Prekursor-Gruppe für die Hydroxygruppe)

bedeuten und pharmazeutisch annehmbare Träger vermischt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man sie für eine Verabreichung mittels Injektion anpaßt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man sie für eine Verabreichung mittels Infusion anpaßt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man sie für eine orale Verabreichung anpaßt.
5. Verfahren nach Anspruch 1 und 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man sie in Form eines Dragees, einer Tablette, einer Kapsel, in Pulverform oder als Granulat überführt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, 4 und 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß gegebenenfalls ein Geschmacksmittel zugesetzt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man sie in Form eines Zäpfchens überführt.
8. Verfahren nach Anspruch 1 und 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Einheitsdosis der Nucleoside oder ein mehrfaches davon zugesetzt wird.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Mittels gegen HIV-Infektionen beim Menschen. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Medizin bzw. die pharmazeutische Industrie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

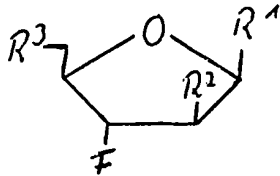
AIDS ist eine seit wenigen Jahren bekannte, durch das HIV (HTLV III/LAV; Human T-Lymphotropic Virus Type III/ Lymphadenopathy-Associated Virus) verursachte und zum Tode führende Infektionskrankheit. Als ursächlich muß die Zerstörung der T-Helfer-Zellen durch das AIDS-Virus angesehen werden. Als Folge 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 HPA 23 haben die notwendige Verträglichkeit und die erhoffte Wirksamkeit noch nicht erreicht, lediglich das 3'-Azidothymidin (N_3Tdr) (DE-OS 3608606) 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 (Mitsuya et al. nature 325, 773 (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 Transcriptase hinweist, während auch deren Wirksamkeit zu erhöhen ist.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein wirksames und verträgliches Mittel gegen HIV-Infektionen bereitzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß werden ein oder mehrere substituierte Pyrimidin- oder Purinnucleoside der allgemeinen Formel I



in der

R^1 = Thymin, 5-substituierte Uracile, Uracil, Cytosin, 5-substituierte Cytosinderivate, 2-Fluoradenin, 2,6-Diaminopurin, 2-Aminopurin, 6-Thioguanin oder 7-Deazaadenin

R^2 = H oder OH

R^3 = OH, O-Acetyl, O-Palmitoyl, Triphosphat (als freie Säure, bzw. deren Alkali-, Ammonium- bzw. Alkylammoniumsalze) oder eine Prekursor-Gruppe für die Hydroxygruppe)

allein oder mit pharmazeutisch verträglichen Trägerstoffen in auf an sich bekannte Weise zu als Injektionen oder Infusionen oder peroral applizierbaren Mitteln gegen HIV-Infektionen überführt.

Als besonders aktiv erwies sich das 2',3'-Dideoxy-3'-fluorthymidin (3'-FTdR). Seine Wirksamkeit wird wie folgt belegt:

1. Hemmung der HIV assoziierten Reverse Transcriptase

Zunächst wurde das Triphosphat (3'-FdTTP) des 3'-FTdR auf seine Fähigkeit untersucht, die Polymerisation eines PolyA. oligodT Templates durch die HIV assoziierte Reverse Transcriptase zu hemmen. Dabei wurde gefunden (Abb. 1), daß die Konzentration, die für eine 50% Hemmung dieses viralen Enzyms erforderlich ist (ID_{50}), bei $0,05 \mu M$ liegt und daß eine komplette Hemmung bei $0,8-1,0 \mu M$ erreicht wird. Damit gehört 3'-FdTTP zu den stärksten bisher gefundenen Hemmstoffen der HIV Reverse Transcriptase. Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus zeigten, daß 3'-FdTTP als kompetitiver Hemmstoff die Bindungsstelle des Substrates besetzt, während sein Einbau in den Primer und ein damit verbundener Kettenabruch – wenn überhaupt – eine untergeordnete Rolle bei der Hemmung spielt.

Im Gegensatz zu 3'-FdTTP hat sich 2',3'-Dideoxy-3'-chlorthymidintriphosphat gegenüber der HIV-assoziierten Reverse Transcriptase in dem gleichen Konzentrationsbereich als völlig unwirksam herausgestellt, was darauf hinweist, daß der 3'-Substituent dieser Nucleotidanaloga sehr spezifische Funktionen am Enzym zu erfüllen hat und nicht beliebig austauschbar ist, wenn eine hohe Wirksamkeit erhalten bleiben soll.

2. Wirkung von 3'-FdTTP auf zelluläre DNA Polymerasen α und β

Die starke Hemmwirkung von 3'-FdTTP gegenüber der HIV Reverse Transcriptase läßt sich therapeutisch nur ausnutzen, wenn die zellulären DNA Polymerasen, insbesondere die für die Replication der zellulären DNA zuständige DNA Polymerase α , weitgehend unbeeinflusst bleiben. Die Untersuchungen zeigen, daß das für die DNA Polymerase α auch zutrifft (Abb. 2). Eine 50% Hemmung dieses zellulären Enzyms wird auch bei $200 \mu M$ 3'-FdTTP noch nicht erreicht, d. h. die DNA Polymerase α ist mehr als 4000 mal weniger empfindlich als die HIV Reverse Transcriptase.

Für die DNA Polymerase β , die für die zelluläre DNA-Reparatur verantwortlich gemacht wird, beträgt die ID_{50} etwa $2,2 \mu M$, d. h. für eine 50% Hemmung dieses Enzyms ist eine 44mal höhere Konzentration erforderlich als für die HIV.

3. Die intrazelluläre Phosphorylierung von 3'-FTdR

Entscheidend für die Wirksamkeit von 3'-FTdR ist die Fähigkeit der infizierten Zelle, die nur als Nucleoside anwendbaren Substanzen zu den Triphosphaten zu phosphorylieren. Eine Species-abhängige Phosphorylierung von 3'-modifizierten Desoxynucleosiden kann durchaus wie im Falle des 2',3'-Dideoxythymidins die Wirksamkeit einer im HIV-Revertase-Test hoch effektiven Verbindung stark herabsetzen. Die Phosphorylierung von 3'-FTdR wurde daher an Zellen verschiedener Species untersucht. Wie die Tabelle 1 zeigt, wird $1 \mu M$ FTdR von den untersuchten Zellen während einer 4stündigen Inkubation mit sehr unterschiedlicher Effektivität zum Triphosphat umgesetzt. Obwohl für einen quantitativen Vergleich auch unterschiedliche Zellzyklus-Zeiten zu berücksichtigen sind und nur der während der 4stündigen Inkubation in der G_1 - bzw. S-Phase des Zellzyklus befindliche Anteil der Zellen zur Phosphorylierung in der Lage ist, sind die für die menschlichen Zelllinien REH und MT-4 gefundene Triphosphat-Mengen von $1-2 \text{ pmole}/10^6$ Zellen als völlig ausreichend anzusehen. Auch für uninfizierte bzw. HTLV-III_B infizierte H9-Zellen und LAV-1 infizierte CEM-Zellen liegen die ermittelten 3'-dFTTP Konz. in diesem Bereich, so daß eine AIDS-Virus-Infektion von T-Zellen die Phosphorylierbarkeit von 3'-FTdR offenbar nicht verändert. Im Vergleich dazu wird die Phosphorylierung einer $50 \mu M$ N_3 -TdR-Lösung zum Triphosphat durch HTLV-III_B infizierte H9-Zellen während einer 24 stündigen Inkubation mit nur $0,9 \text{ pmole}/10^6$ Zellen angegeben (Furman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8333 (1986)). Gleichzeitig kommt es zu einem erheblichen Anstieg von N_3 -TdR-monophosphat ($460 \text{ pmole}/10^6$ Zellen), was auf eine starke Hemmung der Thymidylat-Kinase hinweist und erhebliche, die zelluläre DNA-Synthese beeinträchtigende Veränderungen des Desoxynucleosidtriphosphat-Substanzpools nach sich zieht (Furman et al. s. o.). 3'-FTdR fehlt dieser gravierende Effekt auf die Thymidylat-Kinase (s. Tab. 1), so daß die starken zellulären Pool-Veränderungen nicht zu erwarten sind, obwohl 3'-FTdR gegenüber N_3 -TdR eindeutig besser phosphoryliert wird.

4. Resistenz von 3'-FTdR gegenüber phosphorolytischer Spaltung

Einige Thymidin-Antimetabolite wie Joddesoxyuridin, Bromdesoxyuridin oder Bromvinyl-desoxyuridin werden von der menschlichen Thymidin-Phosphorylase in großem Umfang zu unwirksamen Pyrimidinbasen und Zuckerphosphaten gespalten, so daß ihre systemische Anwendung problematisch werden kann. 3'-FTdR wurde daher auf seine Spaltbarkeit durch die Thymidin-Phosphorylase aus der menschlichen Milz untersucht. Dabei hat sich gezeigt, daß eine 1 mM 3'-FTdR-

Lösung innerhalb von 3 Std. nur zu etwa 3-5% gespalten wird und damit im Vergleich zu Thymidin (90% Spaltung in 2 Std.) als nahezu resistent gegenüber diesem Enzym anzusehen ist.

5. Die Hemmung des zytopathischen Effekts von HIV auf MT-4-Zellen

Um die tatsächliche zelluläre Wirksamkeit von 3'-FTdR zu ermitteln, wurde untersucht, inwieweit 3'-FTdR den zytopathischen Effekt von HIV aufheben kann. Dazu wurden etwa 40 000 MT-4-Zellen (Harada et al. Science **229**, 563 [1985]) in 200 µl RPMI-Medien und 10% fetalem Kälberserum mit HIV infiziert (Titer: 0,013 ml) und nach 5-tägiger Inkubation die lebenden von den toten Zellen mittels Trypanblaufärbbarkeit unterschieden und gezählt. Die Konzentration, die für eine 50% Hemmung des zelltötenden Effekts des Virus erforderlich ist (ED_{50}), beträgt 3,8 nM für 3'-FTdR und im direkten Vergleich 6,4 nM für N_3 -TdR. Für 2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxythymidin ist eine ED_{50} von 10 nM und für 2',3'-Didesoxycytidin eine ED_{50} von 60 nM angegeben worden (M. Baba et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. **142**, 128 [1987]). Damit ist 3'-FTdR in dem beschriebenen MT-4-Zellsystem als die derzeit wirksamste Verbindung anzusehen.

6. Zytotoxizität von 3'-FTdR in menschlichen Zellkulturen

3'-FTdR wurde ursprünglich als Zytostatikum entwickelt (P. Langen et al. Acta biol. med. germ. **23**, 759 [1969]) und ist daher in umfangreichen Studien auf zytostatische Wirkungen hin geprüft worden. Eigene Untersuchungen und Testungen im NCI-Programm der USA (gegen 9 verschiedene Tiertumoren) haben für 3'-FTdR jedoch nur schwache zytostatische Wirkungen ergeben. Eine Ausnahme stellen Ehrlich-Mäuse-Ascites-Tumorzellen dar, was möglicherweise mit ihrem hohen Phosphorylierungsvermögen für 3'-FTdR zusammenhängt (10fach höher als bei menschlichen Zellen). Dabei ist die schnelle Reversibilität der zytostatischen Wirkungen an EMAC-Zellen als Besonderheit dieser Verbindungen registriert worden (P. Langen et al. Europ. J. Cancer **14**, 349 [1978]). Unter dem Aspekt einer möglichen Anwendung dieser Verbindung am Menschen wurden die antiproliferativen Wirkungen von 3'-FTdR und im Vergleich dazu von N_3 -TdR an menschlichen Zelllinien getestet. Die Tabelle 2 zeigt anhand der ID_{50} -Werte, daß der Einfluß sowohl von 3'-FTdR als auch von N_3 -TdR auf die Zellproliferation verschiedener Zelllinien sehr unterschiedlich ist. Vergleicht man 3'-FTdR mit N_3 -TdR, sind die Effekte sehr ähnlich, jedoch für N_3 -TdR in jedem Fall etwas geringer als durch FTdR.

Die Vorteile von 3'-FTdR lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Doppelte Wirksamkeit gegenüber N_3 -TdR im zellulären Test
2. Bessere Phosphorylierung als N_3 -TdR durch menschliche T-Zelllinien
3. Resistenz gegenüber TdR-Phosphorylase
4. Geringere Effekte auf TMP-Kinase und damit auf die dNTP-Substratpools als N_3 -TdR
5. Veritbare insbesondere reversible zelluläre Toxizität.

Weitere wirksame Verbindungen sind u. a.:

2',3'-Dideoxy-3'-fluor-5-bromuridin, 2',3'-Dideoxy-3'-fluor-cytidin, 2',3'-Dideoxy-3'-fluor-5-ethyluridin, 3'-Desoxy-3'-fluorarabinosylcytosin, 2',3'-Dideoxy-3'-fluor-2-fluoradenosin, 2',3'-Dideoxy-3'-fluor-6-thioguanosin, 2',3'-Dideoxy-3'-fluor-2,6-diaminopuriniiribosid, 2',3'-dideoxy-3'-fluor-2-aminopuriniribosid, 3'-Desoxy-3'-fluorarabinosyladenin.

Die erfundungsgemäßen Mittel enthalten eine oder mehrere Wirkkomponenten, entsprechend der allgemeinen Formel I, 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 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 einem 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. Gegebenenfalls werden Geschmacksmittel oder andere übliche Mittel zugesetzt.

Mittels für eine rektale Verabreichung werden als Zäpfchen mit einer geeigneten Base hergestellt.

Mittels 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 sein. 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 Medien. Zur Behandlung von AIDS-Patienten wird aus 3'-FTdR und physiologischer Kochsalzlösung die erforderliche Menge einer 0,3% Lösung hergestellt, die sterilisiert und den Patienten innerhalb einer Stunde intravenös infundiert wird. Die Infusion wird alle 4-8 Stunden wiederholt und mindestens 8-10 Tage fortgesetzt.

Ausführungsbeispiele

1. Beispiel

Injektionslösung

Aus 3'-FTdR und physiologischer Kochsalzlösung bereitet man die erforderliche Menge einer 0,3%igen Lösung.

2. Beispiel

Tabletten oder Dragees

Pulverisiertes 3'-FTdR wird mit einem oder mehreren der üblichen Trägerstoffe wie Stärke, Talk, Mg-stearat, K-stearat, Stearinsäure, Paraffin, Cetylalkohol, Pectin, Saccharose, Gummi arabicum, Dextrin zu Tabletten oder Dragees verarbeitet.

Tabelle 1: Bildung von Nucleotiden aus $1 \mu\text{M } ^3\text{H-3'-FTdR}$ in Zellen verschiedener Species nach 4stündiger Inkubation

	Zelllinie	pmole/ 10^6 Zellen		
		FTMP	FTDP	FTTP
Mensch	MT-4	2,9	0,2	1,3
	REH	3,5	0,35	2,5
Ratte	Zajdela	3,0	3,6	8,8
	Hepatom			
Maus	EMAC	1,2	4,4	19,2

Tabelle 2: Die Hemmung der Proliferation menschlicher Zelllinien durch FTdR und N_3TdR

Zelllinie	$\text{ID}_{50}, \mu\text{M}$	
	FTdR	N_3TdR
K-562	45	50
REH	150	150 ^a
K-37	100 ^b	100 ^c
MT-4	1,8	3,5 ^d

a) 30% Hemmung bei $150 \mu\text{M}$.

b) 35% Hemmung bei $100 \mu\text{M}$.

c) 23% Hemmung bei $100 \mu\text{M}$.

d) Angabe von M. Baba et al. BBRC 142, 128 (1987).

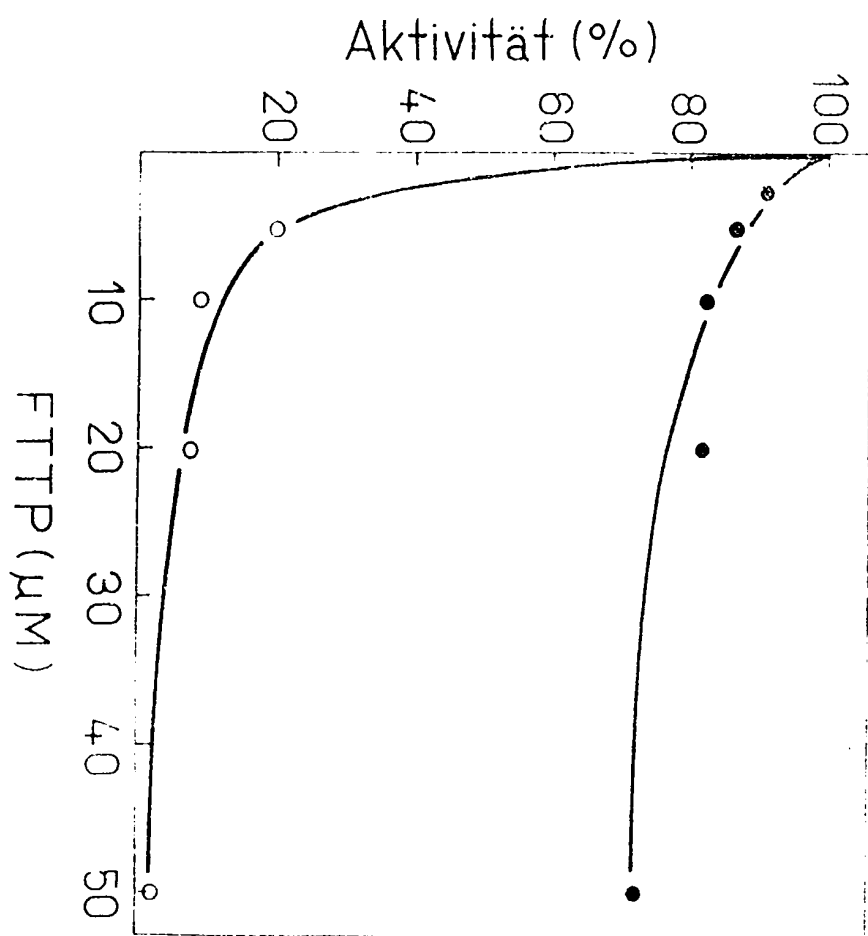


Abb. 2

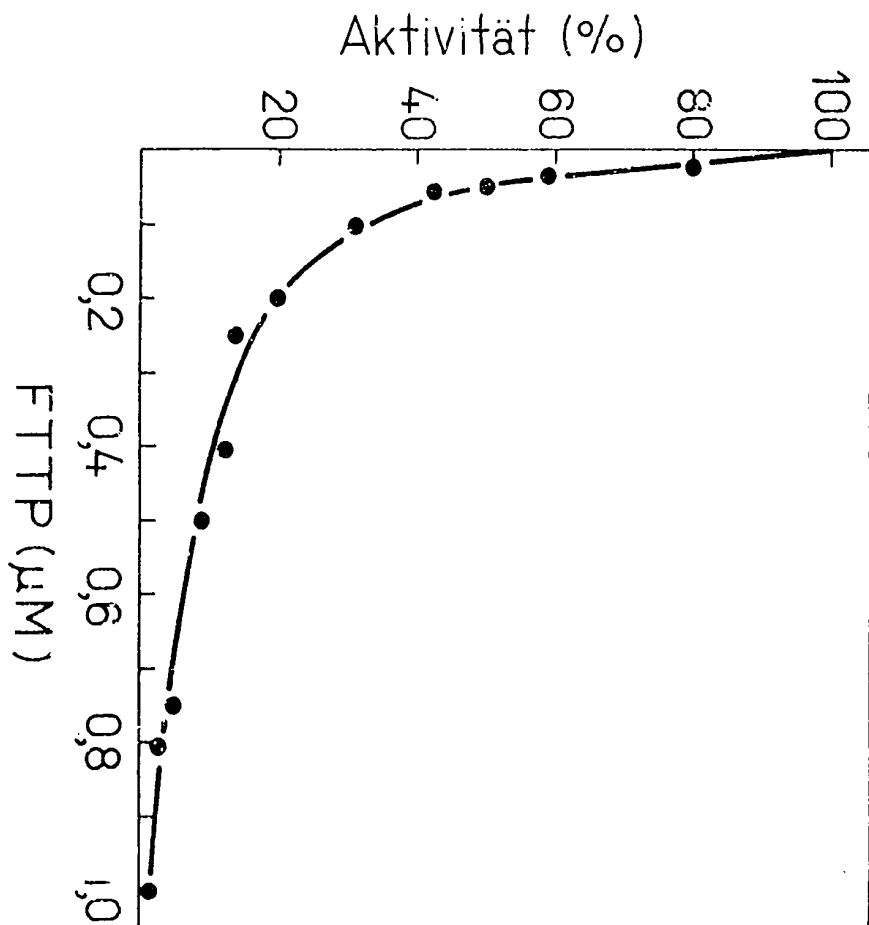


Abb. 1