



(19) Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer:

390 000 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 683/86

(51) Int.Cl.⁵ : A61K 31/70
A61K 31/505, //C07H 19/073

(22) Anmeldetag: 14. 3.1986

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 8.1989

(45) Ausgabetag: 26. 2.1990

(30) Priorität:

16. 3.1985 GB 8506869 beansprucht.
9. 5.1985 GB 8511774 beansprucht.
27. 9.1985 GB 8523881 beansprucht.
12. 2.1986 GB 8603450 beansprucht.
17. 9.1985 US 776899 beansprucht.

(73) Patentinhaber:

THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED
N.W.1. LONDON (GB).

(56) Entgegenhaltungen:

PROC.NAT.ACAD.SCI., BD. 71, S. 4980-4985 (1974);
CHEMICAL COMMUNICATIONS 1970, SEITEN 915 UND 916;
THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, BD. 29, SEITEN
2076-2078 (1964)

(54) VERWENDUNG VON 3'-AZIDO-3'-DESOXYTHYMIDIN ODER EINES PHARMAZEUTISCH ANNEHMBAREN DERIVATS HIEVON
ZUR HERSTELLUNG VON MEDIKAMENTEN

(57) 3'-Azido-3'-desoxythymidin und dessen pharmazeutisch annehmbare Derivate werden zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung oder Prophylaxe einer menschlichen Retrovirusinfektion, insbesondere einer HTLV-I- und HTLV-III-Infektion verwendet.

B

390 000
AT

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von 3'-Azido-3'-desoxythymidin oder eines pharmazeutisch annehmbaren Derivates hievon zur Herstellung von Medikamenten.

3'-Azido-3'-desoxythymidin und dessen pharmazeutisch annehmbare Derivate werden zur Behandlung oder Prophylaxe von Retrovirusinfektionen bei Menschen verwendet.

5 Retroviren bilden eine Untergruppe von RNA-Viren, die zur Replikation zuerst die RNA ihres Genoms in DNA "umgekehrt transkribieren" müssen ("Transkription" beschreibt herkömmlicherweise die Synthese von RNA aus DNA). Wenn es einmal in Form der DNA ist, ist das Virusgenom in das Wirtszellengenom einverlebt, was es ihm ermöglicht, die Wirtszelltranskriptions/Translationsmaschinerie für die Zwecke der Replikation 10 voll auszunützen. Wenn sie einmal einverlebt ist, ist die virale DNA tatsächlich von der Wirt-DNA nicht zu unterscheiden und in diesem Zustand kann das Virus so lange, wie die Zelle lebt, bestehen bleiben. Da es in dieser Form tatsächlich unangreifbar ist, muß jede Behandlung auf einen anderen Zustand des Lebenszyklus gerichtet werden und muß unbedingt fortgesetzt werden, bis alle virustragenden Zellen abgestorben sind.

10 HTLV-I und HTLV-II sind beide Retroviren und sind als Verursacher von Leukämie bei Menschen bekannt. HTLV-I-Infektionen sind besonders weit verbreitet und sind weltweit für viele Todesfälle in jedem Jahr verantwortlich.

15 Eine Species von Retrovirus wurde nun reproduzierbar von Patienten mit Aids isoliert. Obwohl es weitgehend charakterisiert worden ist, gibt es bis jetzt keinen übereinstimmenden Namen für das Virus und es ist derzeit entweder als menschliches T-Zellen-lymphotropes Virus III (HTLV III), als mit Aids assoziiertes Retrovirus (ARV) oder als mit Lymphadenopathie assoziiertes Virus (LAV) bekannt. Man hofft, daß der Name, 20 auf den man sich international einigt, "Aquired Immune Deficiency Virus" (erworrene Immunschwäche-Virus, AIDV) ist. Es hat sich gezeigt, daß dieses Virus (hier mit AIDV bezeichnet) vorzugsweise T-Zellen infiziert und zerstört, die den OKT⁴-Oberflächenmarkierer tragen, und es wird nunmehr allgemein als der Verursacher von Aids angesehen. Der Patient verliert fortschreitend diese Gruppe von T-Zellen, was das Gesamtgleichgewicht des Immunsystems durcheinanderbringt, seine Fähigkeit, andere Infektionen zu bekämpfen, vermindert, und ihn für 25 mögliche Infektionen, die sich häufig als tödlich erweisen, anfällig macht. Somit ist die übliche Todesursache bei Aids-Opfern eine mögliche Infektion, wie Pneumonie oder viral induzierter Krebs, aber nicht die direkte Folge von AIDV-Infektion.

30 Vor kurzem wurde AIDV auch aus anderen Gewebearten gewonnen, einschließlich der B-Zellen, die den T⁴-Markierer zur Expression bringen, Makrophagen und nicht mit Blut assoziiertem Gewebe im zentralen Nervensystem (CNS). Diese letztere Infektion wurde in Patienten entdeckt, die klassische Aids-Symptome zeigen, und ist mit progressiver Demyelinisation, die zu Schwindesucht führt, und solchen Symptomen, wie Encephalopathie, progressiver Dysarthrie, Ataxie und Desorientiertheit, verbunden.

35 Es gibt zumindest vier klinische Manifestationen von AIDV-Infektion. Im Anfangs-"träger"-stadium ist die einzige Indikation der Infektion die Anwesenheit von Anti-AIDV-Antikörpern im Blutstrom. Es wird angenommen, daß derartige "Träger" imstande sind, die Infektion weiterzuleiten, z. B. durch Bluttransfusion, sexuellen Verkehr oder verwendete Spritzenadeln. Der Trägerzustand kann oft niemals in das zweite Stadium fortschreiten, das durch anhaltende generalisierte Lymphadenopathie (PGL) gekennzeichnet ist. Es wird laufend festgestellt, daß etwa 20 % von PGL-Patienten einen fortgeschrittenen Zustand erreichen, der als "mit Aids verwandter Komplex" (ARC) bekannt ist. Physische Symptome, die mit ARC verbunden sind, können generelles Unwohlsein, erhöhte Temperatur und chronische Infektionen sein. Dieser Zustand schreitet gewöhnlich zum Endzustand, dem tödlichen Aids-Zustand, voran, wenn der Patient vollständig die Fähigkeit verliert, gegen Infektion anzukämpfen.

40 Die Existenz dieser menschlichen Retroviren und anderer wurde erst vor kurzem erkannt und, da die Krankheiten, mit denen sie verbunden sind, von lebensbedrohender Art sind, besteht ein dringender Bedarf an der Entwicklung von Wegen, diese Viren zu bekämpfen.

45 Es wurden nun verschiedene Arzneimittel als "Heilmittel" für Aids vorgeschlagen. Diese sind Antimonwolframat, Suramin, Ribavirin und Isoprinosin, die entweder etwas toxisch sind oder von denen sich gezeigt hat, daß sie keine bemerkenswerte Antiretroviruswirksamkeit besitzen. Da das AIDV-Genom nach Infektion in die Wirtszellen-DNA einverlebt ist und in diesem Zustand tatsächlich unangreifbar ist, besteht es so lange, wie die Wirtszelle überlebt, was in der Zwischenzeit neue Infektion verursacht. Somit müßte jede Behandlung von Aids während eines längeren Zeitraumes, möglicherweise des ganzen Lebens, durchgeführt werden, was Substanzen mit annehmbarer Toxizität erfordert.

50 Berichte beschrieben die Untersuchung von Verbindungen gegen verschiedene Retroviren, beispielsweise Friend-Leukämievirus (FLV), ein Mäuseretrovirus. Beispielsweise haben Krieg et al. (Exp. Cell Res., 116 (1978), 21-29) gefunden, daß 3'-Azido-3'-desoxythymidin bei in vitro-Experimenten gegen FLV aktiv ist, und Ostertag et al. (Proc.Nat.Acad.Sci. (1974), 71, 4980-85) haben angegeben, daß auf Grund der antiviralen Wirksamkeit in bezug auf FLV und eines Mangels an zellulärer Toxizität 3'-Azido-3'-desoxythymidin "in günstiger Weise Bromdesoxyuridin für die medizinische Behandlung von durch DNA-Viren verursachte Krankheiten ersetzen könnte". Jedoch haben De Clerq et al. (Biochem. Pharm. (1980), 29, 1849-1851) sechs Jahre später festgestellt, daß 3'-Azido-3'-desoxythymidin gegen irgendwelche in ihren Untersuchungen verwendete Viren, einschließlich Vaccinia-, HSVI- und Varicella Zoster-Virus (VZV), keine nennenswerte Wirksamkeit

aufwies. Glinski et al. (J.Org.Chem. (1973), 38, 4299-4305) offenbaren bestimmte Derivate von 3'-Azido-3'-desoxythymidin (infra) und ihre Fähigkeit, Säugerexoribonukleaseaktivität zu blockieren.

Es wurde nun gefunden, daß 3'-Azido-3'-desoxythymidin eine überraschend potente Wirksamkeit gegen menschliche Retroviren aufweist mit einer besonders hohen Wirksamkeit gegen AIDV, wie durch die im nachstehenden angeführten Versuchsdaten gezeigt wird. Eine derartige Wirksamkeit macht die Verbindung in der Therapie von Retrovirusinfektionen bei Menschen verwendbar.

Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung von 3'-Azido-3'-desoxythymidin oder eines pharmazeutisch annehmbaren Derivates hieron, insbesondere von Salzen oder Estern hieron, zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung oder Prophylaxe einer menschlichen Retrovirusinfektion, insbesondere einer HTLV-I- und HTLV-III-Infektion.

Die Wirksamkeit von 3'-Azido-3'-desoxythymidin gegen menschliche Retroviren wurde in verschiedenen *in vitro*-Untersuchungssystemen festgestellt. Beispielsweise wird die Infektion der menschlichen H9-Lymphoblastoid-Zelllinie durch AIDV durch so niedrige Konzentrationen von 3'-Azido-3'-desoxythymidin wie 0,013 mcg/ml bis zu 20 h nach Infektion wirksam verhindert. AIDV-Infektion von menschlichen U937-Lymphoblastoidzellen, PHA-stimulierten weißen Blutkörperchen und kultivierten peripheren Blutzymphozyten wird ebenfalls bei ähnlich niedrigen Konzentrationen verhindert. Weiterhin zeigten 10 Tage lang dauernde Immunitätstest-Untersuchungen unter Verwendung von bis zu 5000 AIDV-Virionen pro Zelle und gekloneten T⁴, Tetanuspezifischen T-Helferlymphozyten keine Abnahme von Zellen, die mit 3'-Azido-3'-desoxythymidin behandelt worden waren, während unbehandelte Zellen um das 5-fache verminder waren. Zytopathische Wirkungen waren in der gleichen Zelllinie ebenfalls völlig blockiert, die durch HTLV-I transformiert und mit AIDV-überinfiziert worden war.

Andere Untersuchungen unter Verwendung von gereinigter AIDV reverser Transkriptase haben gezeigt, daß die Wirksamkeit dieses Enzyms durch das Triphosphat von 3'-Azido-3'-desoxythymidin durch einen konkurrierenden Hemmungsmechanismus blockiert ist.

Klinische Untersuchungen der Phase I haben auch gezeigt, daß 3'-Azido-3'-desoxythymidin imstande ist, in klinisch wirksamen Quantitäten die Blut/Gehirnbarriere zu durchqueren. Diese Eigenschaft ist sowohl ungewöhnlich als auch wertvoll für die Behandlung und Prophylaxe von CNS-Infektionen, die durch menschliche Retroviren hervorgerufen wurden.

Die Fähigkeit von 3'-Azido-3'-desoxythymidin, den Verlauf von retrovirus-induzierter Malignität zu modifizieren, wurde an einem Mausmodell demonstriert, bei dem die Verabreichung von 3'-Azido-3'-desoxythymidin Splenomegalie verhinderte, die durch intravenös verabreichtes Rauscher-Mäuseleukämie-Virus, das Mäuseäquivalent von HTLV-I, hervorgerufen worden war. Bei weiteren Versuchen hat sich gezeigt, daß 3'-Azido-3'-desoxythymidin die *in vitro*-Replikation von HTLV-I in so niedrigen Konzentrationen wie 0,8 mcg/ml inhibiert.

Beispiele von menschlichen Retrovirusinfektionen, die mit 3'-Azido-3'-desoxythymidin oder einem pharmazeutisch annehmbaren Derivat hieron behandelt oder verhütet werden können, sind die T-Zellenlymphotropen Retroviren (HTLV), insbesondere HTLV-I, HTLV-II und AIDV (HTLV-III). Klinische Zustände, die behandelt oder verhindert werden können, sind Aids, der mit Aids verwandte Komplex und HTLV-I positive Leukämie und Lymphom. Geeignete Patienten zur Behandlung sind auch jene mit Antikörpern gegen AIDV, AIDV CNS-Infektionen, PGL und ARC.

Unter einem "pharmazeutisch annehmbaren Derivat" ist jedes pharmazeutisch annehmbare Salz, Ester oder Salz eines derartigen Esters oder irgendeine andere Verbindung zu verstehen, die bei Verabreichung an einen Menschen imstande ist, (direkt oder indirekt) 3'-Azido-3'-desoxythymidin oder einen antiretroviral aktiven Metaboliten oder Rest hieron vorzusehen. Ein Beispiel einer Nichtesterverbindung ist das Derivat, worin die 5'-C- und 2'-C-Atome durch ein Sauerstoffatom unter Bildung einer Anhydrogruppe verbunden sind.

Bevorzugte Ester der Verbindung der Formel (I) sind Carbonsäureester, worin der Nichtcarbonylteil der Estergruppe ausgewählt ist aus gerad- oder verzweigtkettigem Alkyl, Alkoxyalkyl (z. B. Methoxymethyl), Aralkyl (z. B. Benzyl), Aryloxyalkyl (z. B. Phenoxyethyl), Aryl (z. B. Phenyl gegebenenfalls substituiert durch Halogen, C₁₋₄-Alkyl oder C₁₋₄-Alkoxy); Sulfonatester, wie Alkyl- oder Aralkylsulfonyl (z. B. Methansulfonyl); und Mono-, Di- oder Triphosphatester. Hinsichtlich der oben beschriebenen Ester enthält, wenn nichts anderes angegeben ist, jede in derartigen Estern vorhandene Alkylgruppe vorteilhafterweise 1 bis 18 C-Atome, insbesondere 1 bis 4 C-Atome. Jede in derartigen Estern vorhandene Arylgruppe weist vorteilhafterweise eine Phenylgruppe auf. Jede Bezugnahme auf eine der obigen Verbindungen umfaßt auch eine Bezugnahme auf ein pharmazeutisch annehmbares Salz hieron.

Versuche haben gezeigt, daß 3'-Azido-3'-desoxythymidin durch die Wirkung von zellulären Enzymen *in vivo* in das 5'-Monophosphat überführt wird. Das Monophosphat wird dann durch andere Enzyme unter Bildung des Triphosphats über das Diphosphat weiter phosphoryliert und andere Untersuchungen haben gezeigt, daß es die Triphosphatform von 3'-Azido-3'-desoxythymidin ist, von der angenommen wird, daß sie der wirksame Kettenterminator bei der reversen Transkription von AIDV ist, wie durch ihre Wirkung auf Vogelmyeloblastosevirus und Moloney-Mäuseleukämievirus bewiesen. Diese Form hemmt auch AIDV-reverse Transkriptase *in vitro*, während sie eine vernachlässigungbare Wirkung auf menschliche DNA-Polymeraseaktivität

hat.

Beispiele von pharmazeutisch annehmbaren Salzen von 3'-Azido-3'-desoxythymidin und seiner pharmazeutisch annehmbaren Derivate umfassen Basensalze, z. B. von einer geeigneten Base stammend, wie Alkalimetall- (z. B. Natrium), Erdalkalimetall- (z. B. Magnesium) salze, Ammonium- und NX_4^+ - Salze (worin X C₁₋₄-Alky ist).

Spezifische Beispiele von pharmazeutisch annehmbaren Derivaten von 3'-Azido-3'-desoxythymidin, die erfundungsgemäß verwendet werden können, sind das Mononatriumsalz und die folgenden 5'-Ester: Monophosphat, Dinatriummonophosphat, Diphosphat, Triphosphat, Acetat, 3-Methylbutyrat, Oktanoat, Palmitat, 3-Chlorbenzoat, Benzoat, 4-Methylbenzoat, Hydrogensuccinat, Pivalat und Mesylat.

3'-Azido-3'-desoxythymidin oder ein pharmazeutisch annehmbares Derivat hierfür (im folgenden als Wirkstoff bezeichnet) kann Menschen zur Prophylaxe oder Behandlung von retroviren Infektionen auf jede geeignete Weise, nämlich oral, rektal, nasal, topisch (einschließlich bukkal und sublingual), vaginal und parenteral (einschließlich subkutan, intramuskulär, intravenös und intradermal) verabreicht werden. Es ist klar, daß die bevorzugte Weise mit dem Zustand und Alter des Empfängers, der Art der Infektion und dem gewählten Wirkstoff variiert.

Im allgemeinen liegt eine geeignete Dosis im Bereich von 3,0 bis 120 mg/kg Körpermasse des Patienten pro Tag, vorzugsweise im Bereich von 6 bis 90 mg/kg Körpermasse pro Tag, und am meisten bevorzugt im Bereich von 15 bis 60 mg/kg Körpermasse pro Tag. Die erwünschte Dosis wird vorzugsweise in zwei, drei, vier, fünf, sechs oder mehr Unterdosen in geeigneten Intervallen über den Tag hindurch gegeben. Diese Unterdosen können in Einheitsdosierungsformen verabreicht werden, beispielsweise mit einem Gehalt von 10 bis 1500 mg, vorzugsweise 20 bis 1000 mg, und am meisten bevorzugt 50 bis 700 mg Wirkstoff pro Einheitsdosierungsform.

Versuche mit 3'-Azido-3'-desoxythymidin legen nahe, daß eine Dosis verabreicht werden soll, um Spitzenplasmakonzentrationen des Wirkstoffs von 1 bis 75 μM , vorzugsweise 2 bis 50 μM , am meisten bevorzugt etwa 3 bis 30 μM , zu erzielen. Dies kann beispielsweise durch intravenöse Injektion einer 0,1 bis 5 %igen Lösung des Wirkstoffs, gegebenenfalls in Kochsalzlösung, oder oral verabreicht als Bolus enthaltend etwa 1 bis 100 mg/kg des Wirkstoffs erreicht werden. Erwünschte Blutspiegel können durch eine kontinuierliche Infusion, um etwa 0,01 bis etwa 5,0 mg/kg/h zu gewährleisten, oder durch intermittierende Infusionen, enthaltend etwa 0,4 bis etwa 15 mg/kg des Wirkstoffs, aufrechterhalten werden.

Den Wirkstoff enthaltende pharmazeutische Formulierungen weisen zumindest einen Wirkstoff, wie oben definiert, zusammen mit einem oder mehreren annehmbaren Trägern hierfür und gegebenenfalls anderen therapeutischen Mitteln auf. Jeder Träger muß "annehmbar" in dem Sinne sein, daß er mit den anderen Bestandteilen der Formulierung verträglich und für den Patienten nicht schädlich ist. Formulierungen umfassen jene, die für orale, rektale, nasale, topische (einschließlich bukkale und sublinguale), vaginale oder parenterale (einschließlich subkutane, intramuskuläre, intravenöse und intradermale) Verabreichung geeignet sind. Die Formulierungen können zweckmäßigerweise in Einheitsdosierungsform gegeben werden und können nach jedem Verfahren hergestellt werden, das in der Pharmazie bekannt ist. Derartige Verfahren umfassen den Schritt des Vereinigens des Wirkstoffs mit dem Träger, der aus einem oder mehreren Hilfsbestandteilen besteht. Im allgemeinen werden die Formulierungen hergestellt, indem der Wirkstoff mit flüssigen Trägern oder fein verteilten festen Trägern oder beiden gleichmäßig und innig vereinigt wird, worauf, wenn notwendig, das Produkt geformt wird. Formulierungen, die für orale Verabreichung geeignet sind, können als einzelne Einheiten, wie Kapseln, Cachets oder Tabletten jeweils enthaltend einen vorherbestimmten Anteil des Wirkstoffs; als Pulver oder Granulat; als Lösung oder Suspension in einer wässrigen oder nicht-wässrigen Flüssigkeit; oder als eine Öl-in-Wasser-Emulsion oder eine Wasser-in-Öl-Emulsion gegeben werden. Der Wirkstoff kann auch als Bolus, Latwerge oder Paste gegeben werden. Orale Formulierungen können weiters andere herkömmliche Mittel enthalten, wie Süßstoffe, Aromatisierungsmittel und Verdickungsmittel.

Eine Tablette kann durch Komprimieren oder Formen, gegebenenfalls mit einem oder mehreren Hilfsbestandteilen, hergestellt werden. Komprimierte Tabletten können durch Komprimieren des Wirkstoffs in freifließender Form, wie als Pulver oder Granulen, gegebenenfalls in Mischung mit einem Bindemittel (z. B. Povidon, Gelatine, Hydroxypropylmethylzellulose), Gleitmittel, inerten Verdünnungsmittel, Konservierungsmittel, Desintegrermittel (z. B. Natriumstärkeglykolat, vernetztem Povidon, vernetzter Natriumcarboxymethylzellulose), oberflächenaktiven Mittel oder Dispergiermittel, in einer geeigneten Maschine hergestellt werden. Geformte Tabletten können durch Formen einer Mischung der pulvelförmigen Verbindung, die mit einem inerten flüssigen Verdünnungsmittel angefeuchtet ist, in einer geeigneten Maschine hergestellt werden. Die Tabletten können gegebenenfalls überzogen oder gekerbt werden und sie können so formuliert werden, daß sie eine langsame oder regulierte Freisetzung des Wirkstoffs darin vorsehen, beispielsweise unter Verwendung von Hydroxypropylmethylzellulose in variierenden Anteilen, um das gewünschte Freisetzungprofil zu ergeben.

Formulierungen, die für topische Verabreichung in den Mund geeignet sind, sind Lutschtabletten, die den Wirkstoff in einer aromatisierten Grundlage, gewöhnlich Saccharose und Akaciengummi oder Tragant aufweisen; Pastillen, die den Wirkstoff in einer inerten Basis, wie Gelatine und Glycerin oder Saccharose und Akaciengummi, aufweisen; und Mundwäschen, die den Wirkstoff in einem geeigneten flüssigen Träger aufweisen.

Formulierungen für rektale Verabreichung können als Suppositorien mit einer geeigneten Grundlage, wie beispielsweise Kakaobutter oder einem Salicylat, dargereicht werden.

Formulierungen, die für vaginale Verabreichung geeignet sind, können als Pessarien, Tampons, Cremen, Gele, Pasten, Schäume oder Sprühformulierungen gegeben werden, die außer dem Wirkstoff Träger enthalten, von denen bekannt ist, daß sie geeignet sind.

Formulierungen, die für parenterale Verabreichung geeignet sind, umfassen wässrige und nicht-wässrige isotonische sterile Injektionslösungen, die Antioxidantien, Puffer, bakteriostatische Mittel und löslich gemachte Stoffe enthalten können, die die Formulierung mit dem Blut des Empfängers isotonisch machen; und wässrige und nicht-wässrige sterile Suspensionen, die Suspendiermittel und Verdickungsmittel aufweisen können. Die Formulierungen können in verschlossenen Einheitsdosis- oder Mehrfachdosisbehältern dargereicht werden, beispielsweise Ampullen und Phiole, und können in gefriergetrocknetem (lyophilisiertem) Zustand gelagert werden, der nur den Zusatz des sterilen flüssigen Trägers, beispielsweise Wasser für Injektionen, unmittelbar vor der Verwendung erfordert. Extemporäre Injektionslösungen und Suspensionen können aus sterilen Pulvern, Granülen und Tabletten der oben beschriebenen Art hergestellt werden.

Bevorzugte Einheitsdosierungsformen sind jene, die eine tägliche Dosis oder Einheit, tägliche Unterdosis, wie oben angegeben, oder eine geeignete Fraktion hievon eines Wirkstoffes enthalten.

Die verabreichten Bestandteile können in der Therapie in Verbindung mit anderen Medikamenten, wie 9-[[2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl)-äthoxy]-methyl]-guanin, 9-(2-Hydroxyäthoxymethyl)-guanin (Acyclovir), 2-Amino-9-(2-hydroxyäthoxymethyl)purin, Interferon, z. B. Alpha-Interferon, Interleukin II und Phosphonformiat (Foscarnet), oder in Verbindung mit einer anderen immunmodulierenden Therapie einschließlich Knochenmark- oder Lymphozytentransplantationen oder Medikationen, wie Levamisol oder Thymosin, die je nach Bedarf die Lymphozytenzahl und/oder Funktion erhöhen sollen, verwendet werden.

Es dürfte klar sein, daß außer den speziell oben erwähnten Bestandteilen die Formulierungen andere Mittel enthalten können, die auf dem Gebiet der Formulierungen herkömmlich sind.

3'-Azido-3'-desoxythymidin und seine pharmazeutisch annehmbaren Derivate können auf herkömmliche Weise hergestellt werden, beispielsweise wie in folgenden Literaturstellen angegeben, oder nach analogen Verfahren: J.R. Horwitz et al., J.Org.Chem. 29, (Juli 1964), 2076-78; M. Imazawa et al., J.Org.Chem., 43 (15) (1978), 3044-3048; K.A. Watanabe et al., J.Org.Chem., 45, 3274 (1980); und R.P. Glinski et al., J.Chem.Soc. Chem.Commun., 915 (1970), und nach den in den Beispielen beschriebenen Verfahren.

3'-Azido-3'-desoxythymidin und seine pharmazeutisch annehmbaren Derivate können auch dadurch hergestellt werden, daß man

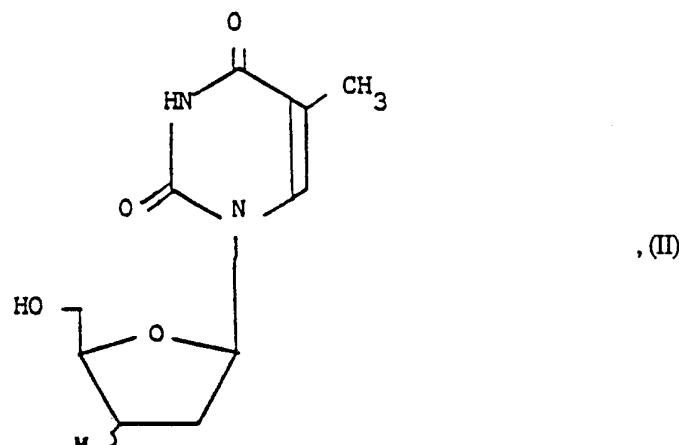
(A) eine Verbindung der Formel

35

40

45

50

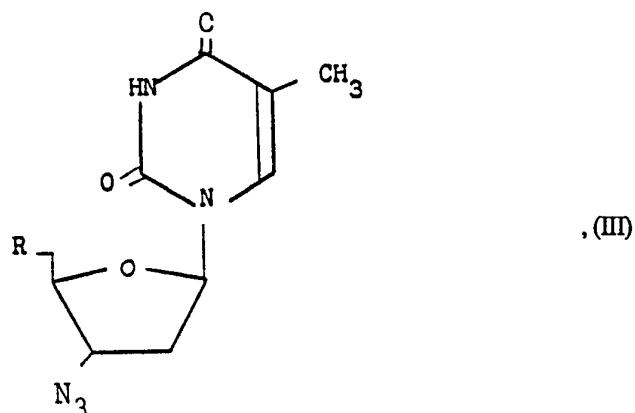


55 worin M eine Vorläufergruppe der 3'-Azidogruppe darstellt, oder ein Derivat, z. B. einen Ester oder ein Salz, hievon mit einem Mittel oder unter Bedingungen, die dazu dienen, die Vorläufergruppe in die gewünschte Azidogruppe überzuführen, umsetzt; oder

60

(B) eine Verbindung der allgemeinen Formel

5



10

15

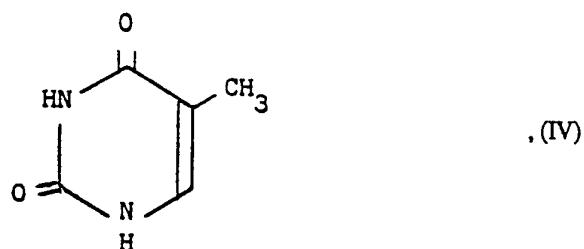
20

worin R eine Vorläufergruppe für die Hydroxygruppe oder für eine pharmazeutisch annehmbare Derivatgruppe hievon darstellt, mit einem Mittel oder unter Bedingungen, die dazu dienen, die Vorläufergruppe in die entsprechende erwünschte Gruppe überzuführen, umsetzt; oder

25

(C) eine Verbindung der Formel

30



35

40

oder ein funktionelles Äquivalent hievon mit einer Verbindung, die den erwünschten Ribofuranosyrling in Stellung 1 der Verbindung der Formel (IV) einführen soll, umsetzt; oder

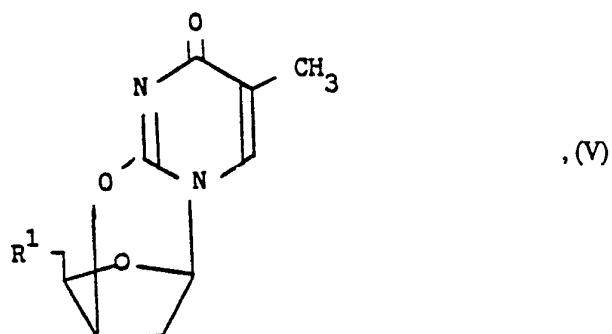
45

(D) eine Verbindung der Formel

50

55

60



worin R¹ Hydroxy oder R, wie oben definiert, darstellt, mit einem Mittel oder unter Bedingungen, die dazu dienen, diese Verbindung in einen erfundungsgemäß verwendeten Werkstoff überzuführen, umsetzt, und danach oder gleichzeitig damit eine oder mehrere der folgenden gegebenenfalls möglichen Umwandlungen durchführt:

(i) wenn 3'-Azido-3'-desoxythymidin gebildet wird, Überführen desselben in ein pharmazeutisch annehmbares Derivat hievon,

(ii) wenn ein pharmazeutisch annehmbares Derivat von 3'-Azido-3'-desoxythymidin gebildet wird, Überführen dieses Derivates in 3'-Azido-3'-desoxythymidin oder ein anderes Derivat hievon.

Es ist klar, daß die Vorläuferverbindungen der Formel (II) und (III) sowie die oberwähnten Mittel und Bedingungen aus jenen ausgewählt werden, die auf dem Gebiet der Nukleosidsynthesechemie bekannt sind. Beispiele derartiger Überführungsverfahren sind im nachfolgenden beschrieben und es dürfte klar sein, daß sie auf herkömmliche Weise entsprechend der erwünschten modifiziert werden können. Insbesondere wenn eine Überführung beschrieben wird, die sonst in einer unerwünschten Reaktion von labilen Gruppen resultieren würde, können derartige Gruppen auf herkömmliche Weise geschützt werden, worauf die Schutzgruppen nach Beendigung der Überführung entfernt werden.

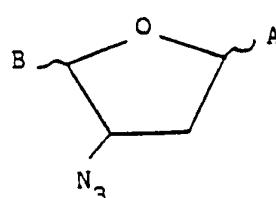
So kann in Verfahren (A) die Gruppe M in der Verbindung der Formel (II) beispielsweise Halogen (z. B. Chlor), Hydroxy oder Organosulfonyloxy, z. B. Trifluormethylsulfonyloxy, Methansulfonyloxy oder p-Toluolsulfonyloxy, darstellen.

Für die Herstellung von 3'-Azido-3'-desoxythymidin kann eine Verbindung der Formel (II), worin die Gruppe M Halogen (z. B. Chlor) bedeutet, in der threo-Konfiguration (in der die 5'-Hydroxygruppe vorteilhafterweise geschützt ist, z. B. mit einer Tritylgruppe) beispielsweise mit Lithium- oder Natriumazid behandelt werden. Das 3'-threo-Halogen (z. B. Chlor)-Ausgangsmaterial kann beispielsweise durch Reaktion der entsprechenden 3'-erythro-Hydroxyverbindung mit beispielsweise Triphenylphosphin und Tetrachlorkohlenstoff oder andererseits durch Behandlung mit Organosulfonylhalogenid (z. B. Trifluormethansulfonylchlorid) unter Bildung einer entsprechenden 3'-erythro-Organosulfonyloxyverbindung, die dann halogeniert wird, erhalten werden. Andererseits kann eine 3'-threo-Hydroxyverbindung der Formel (II) beispielsweise mit Triphenylphosphin, Tetrabromwasserstoff und Lithiumazid unter Bildung der entsprechenden 3'-erythro-Azidoverbindung behandelt werden. Die Entfernung jeder Schutzgruppe kann anschließend bewirkt werden, z. B. wie oben beschrieben.

Hinsichtlich des Verfahrens (B) kann R eine geschützte Hydroxygruppe, z. B. eine Estergruppe der oben angeführten Art, insbesondere Acetoxy, oder eine Äthergruppe, wie Trialkylsilyloxy, z. B. tert.Butyldimethylsilyloxy, oder eine Aralkoxygruppe, z. B. Triphenylmethoxy, sein. Derartige Gruppen können beispielsweise durch Hydrolyse in die gewünschte Hydroxygruppe überführt oder durch Umesterung in eine andere Estergruppe von 3'-Azido-3'-desoxythymidin überführt werden.

Hinsichtlich des Verfahrens (C) kann dieses beispielsweise durch Behandeln des geeigneten Pyrimidins der Formel (IV) oder eines Salzes oder geschützten Derivates hievon mit einer Verbindung der Formel

35



40

45

worin A eine abspaltbare Gruppe, z. B. Acetoxy oder Benzyloxy oder Halogen, wie Chlor, darstellt und B eine gegebenenfalls geschützte Hydroxygruppe, z. B. p-Toluolsulfonyloxy, bedeutet, und anschließendes Entfernen der Schutzgruppen bewirkt werden.

Was Verfahren (D) betrifft, kann R¹ eine Vorläufergruppe sein, wie oben für R in Formel (III) beschrieben. 3'-Azido-3'-desoxythymidin kann dann beispielsweise durch Umsetzung mit einem Alkalimetallazid, z. B. Lithiumazid, vorteilhafterweise in einem geeigneten Lösungsmittel, wie feuchtem DMF, gefolgt von Säure- oder Basenhydrolyse, vorteilhafterweise unter milden Bedingungen, erhalten werden.

3'-Azido-3'-desoxythymidin kann durch Umsetzen mit einem Phosphorylierungsmittel, z. B. POCl₃, oder einem geeigneten Veresterungsmittel, z. B. einem Säurehalogenid oder Anhydrid, in ein pharmazeutisch annehmbares Phosphat oder einen anderen Ester überführt werden. 3'-Azido-3'-desoxythymidin sowie seine Ester, können auf herkömmliche Weise, z. B. durch Behandlung mit einer geeigneten Base, in pharmazeutisch

annehmbarer Salze hierauf überführt werden. Ein Ester oder Salz von 3'-Azido-3'-desoxythymidin kann beispielsweise durch Hydrolyse in die Stammverbindung überführt werden.

Die folgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung näher erläutern, ohne daß diese hierauf beschränkt sein soll. Der Ausdruck "Wirkstoff" bezieht sich auf 3'-Azido-3'-desoxythymidin oder ein pharmazeutisch annehmbares Derivat hierauf.

Beispiel 1

Herstellung von Tablettenformulierungen

10 Die folgenden Formulierungen A bis C wurden durch Naßgranulieren der Bestandteile mit einer Povidonlösung, gefolgt vom Zusatz von Magnesiumstearat und Komprimieren hergestellt.

<u>Formulierung A</u>	<u>mg/Tablette</u>	<u>mg/Tablette</u>
-----------------------	--------------------	--------------------

15	(a) Wirkstoff	250	250
	(b) Lactose B.P.	210	26
	(c) Povidon B.P. (Polyvinylpyrrolidon)	15	9
	(d) Natriumstärkeglykolat	20	12
	(e) Magnesiumstearat	5	3
20		500	300

<u>Formulierung B</u>	<u>mg/Tablette</u>	<u>mg/Tablette</u>
-----------------------	--------------------	--------------------

25	(a) Wirkstoff	250	250
	(b) Lactose	150	-
	(c) Avicel PH 101 (mikrokristalline Zellulose; American Viskose Corp.)	60	26
	(d) Povidon B.P.	15	9
	(e) Natriumstärkeglykolat	20	12
30	(f) Magnesiumstearat	5	3
		500	300

<u>Formulierung C</u>	<u>mg/Tablette</u>
-----------------------	--------------------

35	Wirkstoff	100
	Lactose	200
	Stärke	50
	Povidon	5
40	Magnesiumstearat	4
		359

45 Die folgenden Formulierungen D und F wurden durch direktes Komprimieren der gemischten Bestandteile hergestellt. Die in Formulierung E verwendete Lactose war vom direkten Kompressionstyp (Dairy Crest I "Zeparox").

<u>Formulierung D</u>	<u>mg/Tablette</u>
-----------------------	--------------------

50	Wirkstoff	250
	vorgelatinisierte Stärke NF15	150
		400

<u>Formulierung E</u>	<u>mg/Tablette</u>
-----------------------	--------------------

55	Wirkstoff	250
	Lactose	150
	Avicel	100
		500

60 Formulierung F (Formulierung mit regulierter Freisetzung)

Die Formulierung wurde durch Naßgranulieren der nachstehenden Bestandteile mit einer Povidonlösung

gefolgt vom Zusatz von Magnesiumstearat und Komprimieren hergestellt.

mg/Tablette

5	(a) Wirkstoff	500
	(b) Hydroxypropylmethylzellulose (Methocel K4M Premium) (Dow)	112
	(c) Lactose B.P.	53
	(d) Povidon B.P.	28
10	(e) Magnesiumstearat	<u>7</u> 700

Die Arzneimittelfreisetzung erfolgte während eines Zeitraumes von etwa 6 bis 8 h und war nach 12 h beendet.

15 Beispiel 2
Herstellung von Kapselformulierungen

Formulierung A

20 Eine Kapselformulierung wurde durch Mischen der Bestandteile der Formulierung D des obigen Beispiels 1 und Füllen in eine zweiteilige Hartgelatinekapsel hergestellt. Die Formulierung B (nachstehend) wurde auf ähnliche Weise hergestellt.

	<u>Formulierung B</u>	<u>mg/Kapsel</u>
25	(a) Wirkstoff	250
	(b) Lactose B.P.	143
	(c) Natriumstärkeglykolat	25
	(d) Magnesiumstearat	<u>2</u> 420

30

	<u>Formulierung C</u>	<u>mg/Kapsel</u>
35	(a) Wirkstoff	250
	(b) Macrogol 4000 BP (Polyethylenglykol, durchschnittlicher Polymerisationsgrad 4000)	<u>350</u> 600

40 Kapseln wurden durch Schmelzen von Macrogol 4000 BP, Dispergieren des Wirkstoffes in der Schmelze und Füllen der Schmelze in zweiteilige Hartgelatinekapseln hergestellt.

	<u>Formulierung D</u>	<u>mg/Kapsel</u>
45	Wirkstoff	250
	Lecithin	100
	Arachisöl	<u>100</u> 450

50 Kapseln wurden durch Dispergieren des Wirkstoffes in Lecithin und Arachisöl und Füllen der Dispersion in elastische Weichgelatinekapseln hergestellt.

Formulierung E (Kapsel mit regulierter Freisetzung)

55 Die folgende Kapselformulierung mit regulierter Freisetzung wurde durch Extrudieren der Bestandteile a, b und c unter Verwendung eines Extruders gefolgt von Kugelchenbildung des Extrudats und Trocknen hergestellt. Die getrockneten Pellets wurden dann mit der die Freigabe regulierenden Membran (d) überzogen und in zweiteilige Hartgelatinekapseln gefüllt.

60

mg/Kapsel

5	(a) Wirkstoff (b) mikrokristalline Zellulose (c) Lactose B.P. (d) Äthylzellulose	250 125 125 <u>13</u> 513
---	---	---------------------------------------

10 Beispiel 3

Herstellung einer injizierbaren Formulierung

Formulierung A

15	Wirkstoff Salzsäurelösung 0,1 M q.s. auf pH Natriumhydroxidlösung 0,1 M q.s. auf pH steriles Wasser	0,200 g 4,0 bis 7,0 4,0 bis 7,0 10 ml
----	--	--

20 Der Wirkstoff wurde im Großteil des Wassers (35 bis 40 °C) gelöst und der pH mit der Salzsäure oder dem Natriumhydroxid, wie geeignet, auf 4,0 bis 7,0 eingestellt. Die Charge wurde dann mit Wasser auf das Volumen aufgefüllt und durch ein steriles Mikropore-Filter in eine sterile bernsteinfarbene 10 ml-Glasphiole (Typ 1) gefüllt und mit sterilen Verschlüssen und darüber befindlichen Abdichtungen verschlossen.

25 Formulierung B

	Wirkstoff steriler pyrogenfreier pH 7 Phosphatpuffer q.s. auf	0,125 g 25 ml.
--	--	-------------------

30 Beispiel 4

Herstellung einer intramuskulären Injektion

35	Wirkstoff Benzylalkohol Glycofurool 75 (Tetrahydrofurfurylpolyäthylenglykoläther) Wasser für Injektion q.s. auf	0,20 g 0,10 g 1,45 g 3,00 ml
----	--	---------------------------------------

40 Der Wirkstoff wurde im Glycofurool gelöst. Der Benzylalkohol wurde dann zugesetzt und gelöst und Wasser auf 3 ml wurde zugesetzt. Die Mischung wurde dann durch ein steriles Mikropore-Filter filtriert und in sterilen bernsteinfarbenen 3 ml-Glasphiolen (Typ 1) verschlossen.

Beispiel 5

Herstellung eines Sirups

45	Wirkstoff Sorbitlösung Glycerin Natriumbenzoat Aroma, Pfirsich 17.42.3169 gereinigtes Wasser q.s. auf	0,2500 g 1,5000 g 2,0000 g 0,0050 g 0,01225 ml 5.0000 ml
----	--	---

55 Der Wirkstoff wurde in einer Mischung von Glycerin und dem Großteil des gereinigten Wassers gelöst. Eine wässrige Natriumbenzoatlösung wurde dann zu dieser Lösung zugesetzt, gefolgt vom Zusatz der Sorbitlösung und schließlich des Aromastoffes. Das Volumen wurde mit gereinigtem Wasser aufgefüllt und es wurde gut gemischt.

Beispiel 6
Herstellung eines Suppositoriums

5

mg/Suppositorium

Wirkstoff (63 µm)*	250
Hartfett B.P. (Witepsol H15 - Dynamit Nobel)	1770
	2020

10

* Der Wirkstoff wurde als Pulver verwendet, worin zumindest 90 % der Teilchen einen Durchmesser von 63 µm oder weniger aufwiesen.

15

1/5 des Witepsol H15 wurde in einer Pfanne mit Dampfmantel bei maximal 45 °C geschmolzen. Der Wirkstoff wurde durch ein 200 µm-Sieb gesiebt und zu der geschmolzenen Grundlage unter Mischen zugesetzt, wobei eine Silverson-Vorrichtung, die mit einem Schneidkopf versehen war, verwendet wurde, bis eine glatte Dispersion erhalten war. Während die Mischung bei 45 °C gehalten wurde, wurde das restliche Witepsol H15 zu der Suspension zugesetzt und es wurde gerührt, um eine homogene Mischung zu gewährleisten. Die gesamte Suspension wurde durch ein rostfreies 250 µm-Stahlsieb geleitet und unter kontinuierlichem Rühren wurde auf 40 °C abkühlen gelassen. Bei einer Temperatur von 38 bis 40 °C wurden 2,02 g der Mischung in geeignete Kunststoffformen gefüllt. Die Suppositorien wurden auf Raumtemperatur abkühlen gelassen.

20

Beispiel 7
Herstellung von Pessarien

25

mg/Pessar

Wirkstoff 63 µm	250
wasserfreie Dextrose	380
Kartoffelstärke	363
Magnesiumstearat	7
	1000

30

Die obigen Bestandteile wurden direkt gemischt und die Pessarien durch direktes Komprimieren der resultierenden Mischung hergestellt.

Im folgenden werden Herstellungsbeispiel zur Herstellung von 3'-Azido-3'-desoxythymidin ausgegeben.

40

Herstellungsbeispiel 13'-Azido-3'-desoxy-5'-O-oktanoylthymidin

Zu einer Lösung von 3'-Azido-3'-desoxythymidin in Pyridin (0 °C) wurden 1,2 Äquivalente Oktanoylchlorid zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur erwärmen gelassen. Als TLC ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$; 20:1, auf Silikagel) vollständige Reaktion anzeigen, wurde die Lösung auf Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wurde dekantiert. Das erhaltene Öl wurde auf Silikagel chromatographiert, wobei mit $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ eluiert wurde. Die Titelverbindung wurde durch Abdampfen des Lösungsmittels von den geeigneten Fraktionen als Öl erhalten.

50

CHN: berechnet	C 54,95	H 6,92	N 17,80
gefunden	C 54,82	H 6,96	N 17,66.

Delta7,46(d,1H,J_{5,6}=1Hz,6H), Delta6,13(t,1H,1'H), Delta4,5-4,2(m,3H,3'H und 5'CH₂), Delta4,0-3,8(m,1H,4'H), Delta2,3-2,1(m,4H,2'H und (CH₂)l von Oktanoyl), Delta1,8(d,3H,J_{5,6}=1,0Hz,5CH₃), Delta1,5-0,6(m,13H,5'Oktanoyl (CH₂)₅CH₃).

55

Herstellungsbeispiel 25'-Acetyl-3'-azido-3'-desoxythymidin

60

Zu einer Lösung von 20 g 3'-Azido-3'-desoxythymidin in 50 ml Pyridin wurden bei Umgebungstemperatur 2,1 Äquivalente Acetylchlorid zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 h gerührt und 20 h bei 0 bis 5 °C gehalten. Sie wurde unter Rühren auf Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wurde dekantiert. Das ölige

5 Produkt wurde in Wasser gelöst und fünfmal mit Wasser, 0,5n Salzsäure und zweimal mit Wasser extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Lösung wurde filtriert und im Vakuum eingedampft. Das verbleibende Öl wurde in Chloroform gelöst, auf eine Silikagelsäule aufgebracht und unter Verwendung von 2 % Methanol in Chloroform blitzchromatographiert. Fraktionen mit Produkt wurden eingedampft und das Öl wurde wiederum unter Verwendung von Äthylacetat:Hexan (6:4 V/V) chromatographiert. Fraktionen mit Produkt wurden im Vakuum zu einem weißen Feststoff eingedampft, Fp. 96-98°C.

10 Berechnet C 46,60 H 4,89 N 22,65
gefunden C 46,67 H 4,94 N 22,59.

Herstellungsbeispiel 3

Die folgenden Verbindungen wurden nach dem Verfahren der Herstellungsbeispiele 1 oder 2 aus dem geeigneten Säurehalogenid oder Anhydrid hergestellt:

15 3'-Azido-5'-O-(3-chlorbenzoyl)-3'-desoxythymidin, Fp. 54-59 °C
berechnet C 53,68 H 4,77 N 18,41
gefunden C 53,81 H 4,72 N 18,46.

20 3'-Azido-3'-desoxy-5'-O-pivaloylthymidin, Fp. 99-100 °C
berechnet C 51,27 H 6,03 N 19,93
gefunden C 51,07 H 6,05 N 19,83.

25 3'-Azido-3'-desoxy-5'-O-(3-methylbutyryl)-thymidin
berechnet C 50,24 H 6,13 N 19,53
gefunden C 50,27 H 6,11 N 19,49

30 Delta7,46(d,1H,J_{5,6}=1,2Hz,6H), Delta6,13(t,1H,1'H), Delta4,55-4,15(m,3H,3'H und 5'CH₂),
Delta3,8-4,15(m,1H,4'H), Delta2,4-1,78(m,3H,2'H und 5'-Methin), Delta1,80(d,3H,J_{5,6}=1,2Hz,5CH₃),
Delta0,9(d,6H,J=6,4Hz, Methyle auf 5'Butyryl).

35 3'-Azido-3'-desoxy-5'-O-palmitoylthymidin
berechnet C 61,67 H 8,57 N 13,85
gefunden C 61,85 H 8,59 N 13,75

40 Delta7,45(d,1H,J_{5,6}=1,0Hz,6H), Delta6,12(t,1H,1'H), Delta4,5-4,05(m,3H,3'H und 5'CH₂),
Delta4,0-3,8(m,1H,4'H), Delta2,35-2,11(m,4H,2'H und (CH₂)l von Palmitoyl),
Delta1,8d,3H,J_{5,6}=1,0Hz,5CH₃) Delta1,35-0,6(m,29H,5'Palmitoly(CH₂)₁₃CH₃)

45 3'-Azido-3'-desoxy-5'-O-tolylthymidin, Fp. 73 °C
berechnet C 56,10 H 4,97 N 18,17
gefunden C 55,88 H 5,00 N 18,09

50 NMR genommen in DMSO-d₆
NMR: Delta7,95-7,29 (m,5H; bH,cH,6H), Delta6,16 (t, 1H,1'H), Delta4,6-4,4(m,3H,3'H,5'H),
Delta4,2-4,0(m,1H,4'H), Delta2,39(s,3H,dCH₃), Delta1,63(s,3H,5CH₃)

55 3'-Azido-3'-desoxythymidin-5'-O-(hydrogensuccinat)
berechnet C 44,98 H 4,83 N 17,96
gefunden C 44,90 H 4,77 N 17,85

50 NMR genommen in DMSO-d₆
NMR: Delta7,46(s,1H,6H), Delta6,13(m,1H,1'H), Delta4,48-4,40(m,1H,3'H), Delta4,34-4,20(m,2H,5'H),
Delta3,99-3,94(m,1H,4'H), Delta1,78(s,3H,5CH₃)

55 3'-Azido-3'-desoxy-5'-mesylthymidin, Fp. 253°C (Zers.)
berechnet C 38,25 H 4,37 N 20,28 S 9,28
gefunden C 38,15 H 4,38 N 20,19 S 9,30

NMR genommen in DMSO-d₆

NMR: Delta7,49(d,1H,J_{6,5}=1,0Hz,6H), Delta6,15(t,1H,J_{1',2'}=6,6Hz, 1'H), Delta4,54-4,41 (m,3H,3'H,5'H), Delta4,14-4,02(m,1H,4'H), Delta3,24(s,3H,5'-Mesyl CH₃), Delta1,79(d,3H,J_{5,6}=1,0 Hz, 5CH₃)

5 **3'-Azido-5'-O-(3-chlorbenzoyl)-3'-desoxythymidin**

berechnet	C 50,31	H 3,97	N 17,26	Cl 8,74
gefunden	C 50,16	H 4,03	N 17,13	Cl 8,66

NMR genommen in DMSO-d₆

10 NMR: Delta11,37(s,1H,3-NH), Delta7,98-7,43(m,5H;5'-Phenyl,6H), Delta6,17(dd,1H;J_{1',2'}=6,1Hz,J_{1',2b}=7,2Hz, 1'H), Delta4,68-4,48(m,3H;3'H,5'H), Delta4,14-4,11(m,1H,4'H), Delta2,48-2,41(m,2H,2'H), Delta1,64 (d,3H,J_{5,6}=1,2Hz, 5CH₃).

15 **Herstellungsbeispiel 4**

2,5'-O-Anhydro-3'-azido-3'-azido-3'-desoxythymidin

3,0 g (11,2 mMol) 3'-Azido-3'-desoxythymidin wurden durch Zugabe von 2,7 ml Methansulfonylchlorid zu einer Lösung des Ausgangsmaterials in 2 ml trockenem Pyridin mesyliert. Die Reaktion wurde 1 h bei 5 °C ablaufen gelassen und dann auf Eiswasser gegossen. Der Niederschlag wurde durch Filtrieren gesammelt. Das Produkt (3'-Azido-5'-mesylthymidin) wurde mit 0,78 g (5,6 mMol) Kaliumcarbonat in 75 ml DMF umgesetzt. 20 Die Reaktanten wurden 6 h in einem 80 °C Ölbad erhitzt und dann in Eiswasser gegossen. Das Produkt wurde mit Äthylacetat von Wasser befreit. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das resultierende Öl auf Silikagel durch Eluieren mit CHCl₃:MeOH (9:1 V/V) blitzchromatographiert. Die Titelverbindung wurde nach Abdampfen des Lösungsmittels aus den geeigneten Fraktionen als Feststoff erhalten, Fp. 184-186 °C.

25 **Herstellungsbeispiel 5**

3'-Azido-3'-desoxythymidin

a) 2,3'-Anhydrothymidin

30 85,4 g (0,353 Mol) Thymidin wurden in 500 ml trockenem DMF gelöst und zu 100,3 g (0,529 Mol) N-(2-Chlor-1,1,2-trifluoräthyl)-diäthylamin (hergestellt nach dem Verfahren von D.E. Ayer, J.Med.Chem. 6, 608 (1963)) zugesetzt. Diese Lösung wurde 30 min auf 70 °C erhitzt und dann unter heftigem Rühren in 950 ml Äthanol (ÄtOH) gegossen. Das Produkt fiel aus dieser Lösung aus und wurde filtriert. Die ÄtOH-überstehende Flüssigkeit wurde im Kühlschrank gehalten und dann filtriert, wobei die Titelverbindung erhalten wurde, Fp. 228-230°C.

35 b) 3'-Azido-3'-desoxythymidin

25 g (0,1115 Mol) 2,3'-O-Anhydrothymidin und 29 g (0,446 Mol) NaN₃ wurden in einer Mischung von 250 ml DMF und 38 ml Wasser suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde 5 h am Rückfluß gehalten, worauf sie in 1 l Wasser gegossen wurde.

40 Die wässrige Lösung wurde dreimal mit je 700 ml ÄtOAc extrahiert. Die ÄtOAc-Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert und das ÄtOAc wurde im Vakuum entfernt, wobei ein viskoses Öl erhalten wurde. Dieses Öl wurde mit 200 ml Wasser gerührt, wobei die Titelverbindung als ein Feststoff erhalten wurde, der durch Filtrieren gesammelt wurde, Fp. 116-118 °C.

45 **Herstellungsbeispiel 6**

Mononatriumsalz von 3'-Azido-3'-desoxythymidin

Ungefähr 1 g 3'-Azido-3'-desoxythymidin wurde in 50 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH wurde mit 1n NaOH auf 12 eingestellt. Ungefähr die Hälfte der Lösung wurde gefriergetrocknet. Die Titelverbindung wurde als gefriergetrocknetes Pulver erhalten.

50 Analyse: Berechnet für C₁₀H₁₂N₅NaO₄·6/10 N₂O:

C 40,03	H 4,43	N 23,34	Na 7,66	
gefunden:	C 39,88	H 4,34	N 23,23	Na 7,90.

Herstellungsbeispiel 7

Herstellung des 5'-Monophosphats von 3'-Azido-3'-desoxythymidin

0,5 g (1,87 mMol) 3'-Azido-3'-desoxythymidin wurden in 5 ml Triäthylphosphat gelöst und die Mischung auf -5 °C gekühlt. 0,685 ml (7 mMol) Phosphoroxychlorid wurden auf einmal zu der rasch gerührten Lösung zugesetzt, die dann 22 h bei -10 °C gehalten wurde. Ein aliquoter Teil wurde entfernt und zu

konz. Ammoniumhydroxid zugesetzt. Die Analyse dieser Probe auf TLC (Zellulose, n-PrOH:H₂O 7:3 V/V) zeigte kein zurückgebliebenes Ausgangsmaterial und einen einzigen fluoreszierenden Fleck mit geringerer Mobilität als das Nukleosid. Die Reaktionsmischung wurde auf 20 ml Eis und Wasser gegossen. Diese wurde in ein Eisbad gegeben und der pH der Lösung durch Zusatz von 2n NaOH auf einen Wert von 7,5 eingestellt. Die basische Mischung wurde einmal mit Chloroform und einmal mit Äther extrahiert. Die wässrige Schicht wurde wieder auf einen pH von 7,5 eingestellt und im Vakuum konzentriert, um restliches organisches Lösungsmittel zu entfernen. Das Material wurde bei -10 °C gelagert, bis es wie folgt gereinigt wurde:

Deaktivierte Kohle wurde durch Waschen von Kokosnusskohle (0,074-0,297 mm, 100 g) mit 500 ml 1n HCl, 3 l Wasser, 35 ml 3 % Toluol in 95 % Äthanol, 600 ml 95 %-igem Äthanol und schließlich gründlich mit Wasser hergestellt. Deaktivierte Kohle (12 ml gesetzte Naßkohle) wurde unter Rühren zu 0,72 g (1,8 mMol, 30 ml) der Monophosphatlösung zugesetzt. Die überstehende Flüssigkeit wurde dekantiert und die Kohle mit 150 ml Wasser gewaschen. Das Nukleotid wurde von der Kohle durch Waschen mit 120 ml 1,5 M Ammoniumhydroxid in 50 % Äthanol eluiert. Diese Lösung wurde durch ein 0,22 µm-Filter filtriert, im Vakuum auf 10 ml eingeengt, durch eine Amicon Centriflo CF-25 Membran filtriert und gefriergetrocknet, wobei das Diammonium-3'-azido-3'-desoxythymidin-5'-monophosphat als Feststoff erhalten wurde. Diese Verbindung wurde durch die Fähigkeit von 5'-Nukleotidase zum Abbauen zum Nukleosid als ein Nukleosid-5'-monophosphat charakterisiert.

Herstellungsbeispiel 8

3'-Azido-5'-triphosphat-3'-desoxythymidin und 3'-Azido-5'-diphosphat-3'-desoxythymidin

a) Bis-(tri-n-butylammonium)-pyrophosphat
 Eine Säule von DOW 50 (Dowex-Ionenaustauscherharz der Dow Chemical Laboratories)-Pyridiniumharz wurde hergestellt, indem 40 ml Harz in eine Säule mit einem Durchmesser von 25 cm gegossen wurden und mit Wasser gewaschen wurde, bis keine Farbe mehr eluiert wurde. 1,12 g (2,51 mM) Pyrophosphatdekahydrat wurden in 30 ml Wasser gelöst und auf die Säule aufgebracht. Die Säule wurde mit Wasser eluiert. Eine 125 ml-Fraktion des Eluats, das UV-absorbierendes Material enthielt, wurde gesammelt. Das Volumen wurde im Vakuum auf 10 ml vermindert und 1,2 ml Tri-n-butylamin wurden zugesetzt. Das Volumen wurde im Vakuum vermindert und der Rückstand durch Mitabdampfen mit Pyridin (viermal) getrocknet. Das Produkt wurde in einem Gefrierschrank (-5 °C) gelagert.

b) Hydrogenform von 3'-Azido-5'-monophosphat-3'-desoxythymidin
 Die Hydrogenform des Monophosphats wurde hergestellt, indem 0,1 g (0,283 mMol) des in Herstellungsbeispiel 7 erhaltenen Ammoniumsalzes, gelöst in 6 ml Wasser, durch eine 1,5 ml (10 Äqu.) Säule von DOW 50 H⁺ geleitet wurde.

c) Phosphormorpholidatderivat von 3'-Azido-3'-desoxythymidin
 In 9 ml Wasser wurden 0,283 mMol der Hydrogenform des in Stufe b) erhaltenen Monophosphats gelöst. 99 µl (1,13 mMol, 4 Äqu.) Morpholin wurden zugesetzt und die Lösung am Rückfluß erhitzt. 0,234 g (1,13 mMol, 4 Äqu.) Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in 5 ml tert.Butanol, wurden während eines Zeitraums von 3 h zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht am Rückfluß gehalten. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert und die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Äthanol wurde zugesetzt und es wurde viermal im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst und das Phosphormorpholidat fiel durch Ätherzusatz aus. Der Niederschlag wurde viermal mit Äther zerrieben und auf einem Rotationsverdampfer getrocknet. Es wurde die Titelverbindung erhalten.

d) 3'-Azido-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat
 Das in Stufe c) erhaltene Phosphormorpholidatderivat wurde durch viermaliges Entfernen von Pyridin im Vakuum getrocknet. Das in Stufe a) erhaltene Bis-(n-Bu)₃N-Pyrophosphat wurde ebenfalls durch Entfernen von Pyridin im Vakuum getrocknet. Das Phosphormorpholidat wurde in 5 ml Pyridin gelöst und zu dem das Pyrophosphateagens enthaltenden Behälter zugesetzt. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur fortschreiten gelassen. Das Pyridin wurde im Vakuum entfernt. Wasser wurde zum Rückstand zugesetzt und dreimal im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde gefroren.

Der Rückstand wurde aufgetaut und in 50 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf eine 1 x 10 cm Säule von DEAE Sephadex A-25 aufgebracht, die mit 50 mM Ammoniumbicarbonat äquilibriert worden war. Die Phosphate wurden mit 300 ml linearem Gradienten von 50-800 mM Ammoniumbicarbonat eluiert. Die das Diphosphatnukleotid enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt sowie jene, die das Triphosphatnukleotid enthielten. Die vereinigten Diphosphat- und Triphosphatfraktionen wurden jeweils im Vakuum getrocknet, wieder in Wasser gelöst, wieder getrocknet, wieder in Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

Herstellungsbeispiel 9Enzymatische Synthese von 3'-Azido-5'-triphosphat-3'-desoxythymidin

Das 5'-Triphosphat wurde aus dem 5'-Diphosphat unter Verwendung von Pyruvatkinase und Nukleosiddiphosphatkinase synthetisiert. Die Reaktionsmischung enthielt 6 mM 3'-Azido-TDP, 12 mM Adenosintriphosphat, 40 mM MgCl₂, 40 mM Kaliumpiperazin-N,N'-bis-(2-äthansulfonsäure), PIPES-Puffer (pH 6,8), 30 mM Phosphoenolpyruvat, 40 IE/ml Nukleosiddiphosphatkinase und 100 IE/ml Pyruvatkinase in einem Endvolumen von 5 ml. Die Reaktionsmischung wurde 5 Tage bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde auf eine 2,5 x 10 cm-Säule von DEAE Sephadex A-25 aufgebracht, die mit Ammoniumbicarbonat äquilibriert worden war. Die Nukleotide wurden mit einem Gradienten von 100-1000 mM Ammoniumbicarbonat eluiert. Das Triphosphat enthaltende Fraktionen wurden zusammengegeben und im Vakuum zur Trockene eingedampft. Die Verbindung wurde unter Verwendung einer präparativen HPLC-Säule (Whatman, Inc., Magnum 9 SAX) weiter gereinigt, wobei mit einem Gradienten von 10-100 mM Kaliumphosphat, pH 3,5, eluiert wurde. Die resultierende Verbindung wurde unter Verwendung einer DEAE-Sephadex A-25-Säule wie oben weiter gereinigt. Die das Tetraammonium-3'-azido-3'-desoxythymidin-5'-triphosphat enthaltenden Fraktionen wurden zusammengegeben, im Vakuum getrocknet, in Wasser wieder gelöst und gefriergetrocknet, wobei die Titelverbindung erhalten wurde.

Antivirale Wirksamkeit:

20 (a) (i) Retrovirus-induzierte Malignität

3'-Azido-3'-desoxythymidin wurde an weibliche BALB/c-Mäuse verabreicht, die mit $1,5 \times 10^4$ Pfu des RVB3-Stammes des Rauscher-Mäuseleukämievirus infiziert waren. Die Behandlung begann 4 h nach der Infektion in Dosierungen von 80 mg/kg intraperitoneal alle 8 h oder von 0,5 oder 1,0 mg/ml oral in Trinkwasser. Es wurde gefunden, daß eine derartige Behandlung die Infektion von Milzzellen und nachfolgende Entwicklung von Splenomegalie verhinderte und auch Virämie unterdrückte.

(ii) HTLV-I TM-11 Zellen (T-Zellenklon, anfällig für HTLV-I-Infektion) wurden gemeinsam mit bestrahlten HTLV-I-Bildner-MJ-Tumorzellen wie folgt kultiviert:

- a) nur TM-11 Zellen,
- b) TM-11 Zellen und MJ-Tumorzellen,
- c) TM-11 Zellen, MJ-Tumorzellen und 3'-Azido-3'-desoxythymidin (3 µM),
- d) TM-11 Zellen, MJ-Tumorzellen und 3'-Azido-3'-desoxythymidin (9 µM),
- e) TM-11 Zellen, MJ-Tumorzellen und 3'-Azido-3'-desoxythymidin (27 µM).

Am 18. Tag wurde die gesamte DNA aus jeder Kultur extrahiert und mit Bam H1 digeriert, um ein Fragment des HTLV-I-Genoms unabhängig von jeder wirtsflankierenden Sequenz und mit einer Standardmolmasse von 3,3 kD zu erzeugen. Das Digest wurde dann mit radiomarkiertem Alpha-MT-2, einer Standardsonde, die das Bam H1-Fragment von HTLV-I erkennt, untersucht.

Für a) wurde keine Hybridation festgestellt, was ein Fehlen des Virus in der nichtinfizierten Kontrolle anzeigt. Ein starkes Signal wurde für b), die unbehandelte, infizierte Kontrolle, festgestellt. Ein schwaches Signal wurde mit c) festgestellt, was die unvollständige Vernichtung des Virus anzeigt, und keine Hybridation wurde in d) oder e) festgestellt, was völlige Vernichtung des Virus anzeigt.

Jede Kultur wurde auch mit einer Sonde auf T-Zellen-rezeptor-Beta-kette geprüft, wobei ein starkes Signal für alle Kulturen erzeugt wurde, was die dauernde Anwesenheit von TM-11 während der Dauer des Versuches zeigt.

(b) AIDV

45 (i) Reverse Transkriptase-Wirksamkeit

3'-Azido-5'-triphosphat-3'-desoxythymidin wurde *in vitro* gegen AIDV-Transkriptase (AIDV RT) untersucht.

AIDV RT wurde aus pelletisiertem und extrahiertem AIDV durch Eluieren durch DEAE- und Phosphozellulosesäulen gereinigt. Die Enzymaktivität war während 60 min linear und zumindest 2 Monate stabil bei Lagerung in 60 % Glycerin und 1 mg Rinderserumalbumin pro ml. Unter Verwendung von rA-odT₍₁₂₋₁₈₎ als

50 der Templatprimer hatte AIDV RT ein pH-Optimum von 7,0 bis 7,3, ein MnCl₂-Optimum von 0,3 mM und ein MgCl₂-Optimum von 5 mM. Die Aktivität in Anwesenheit von 5 mM MgCl₂ war 10-mal stärker als die Aktivität in Anwesenheit von 0,3 mM MnCl₂. Maximale Enzymaktivität wurde auch in 80 und 140 mM KCl und 60 bis 100 mM NaCl gefunden. Die Einverleibung von [³H]dTTP war in bezug auf die Enzymkonzentration linear. Bei der Untersuchung wurde gefunden, daß 3'-Azido-5'-triphosphat-3'-desoxythymidin ein kompetitiver Inhibitor von AIDV RT ist, der ein Ki von 0,04 µM ergibt, wenn rA-odT₍₁₂₋₁₈₎ als der Templatprimer verwendet wird. Das Enzym hatte einen k_m für dTTP von 2,81 µM, was vermuten läßt, daß 3'-Azido-5'-triphosphat-3'-desoxythymidin enger an das Enzym gebunden wird als dTTP. Weitere Versuche mit den RT's von Vogelmyeloblastosevirus, Moloney-Mäuseleukämievirus und AIDV zeigten, daß 3'-Azido-5'-triphosphat-3'-desoxythymidin ein Terminator der DNA-Kettenverlängerung ist.

(ii) In vitro-Anti-AIDV-Aktivität

3'-Azido-3'-desoxythymidin wurde untersucht und es wurde gefunden, daß es eine Wirksamkeit bei einer Reihe von in vitro-Untersuchungssystemen aufweist. Arzneimittelleffekte wurden durch Untersuchen der reversen Transkriptase (RT)-Aktivität in den überstehenden Flüssigkeiten von infizierten, nichtinfizierten und arzneimittelbehandelten Zellen gemessen. 3'-Azido-3'-desoxythymidin blockierte wirksam die Infektion durch AIDV der menschlichen H9 und U937 Lymphoblastoidzelllinien in Konzentrationen von 2,7 bis 0,0013 mcg/ml. Ähnlich wurde die Infektion von normalen pH-A-stimulierten weißen Blutkörperchen und kultivierten peripheren Blutlymphozyten bei so niedrigen Arzneimittelkonzentrationen wie 0,013 mcg/ml inhibiert. Arzneimittelzusatz- und -entzugsversuche in H9-Zellen zeigten, daß 3'-Azido-3'-desoxythymidin am wirksamsten war, als es zur Zeit der Virusinfektion von anfälligen Zellen vorhanden war, aber noch den Großteil seiner antiviralen Wirksamkeit sogar noch beibehielt, als es erst nach 20 h nach der Anfangsinfektion mit AIDV zugegeben wurde. Die Inhibition von Virusreplikation war auch ersichtlich, als das Arzneimittel in den Medien nur während des 20 h-Zeitraumes der Virusabsorption vorhanden war. Wirkungen waren bei 0,13 und 0,013 mcg/ml zu ersehen. 3'-Azido-3'-desoxythymidin zeigte keine direkte Anti-RT-Aktivität gegen gereinigte AIDV-Virionen. Ähnlich hatte das Arzneimittel wenig oder gar keine Wirkung auf die Produktion und Freisetzung von Virionen aus der chronisch infizierten H9 AIDV-Zelllinie.

(iii) Verhütung von Infektion durch AIDV

Die Fähigkeit von 3'-Azido-3'-desoxythymidin, Infektion von Zellen durch AIDV zu blockieren, wurde wie folgt festgestellt:

Geklonnte T4 positive tetanusspezifische T-Helferlymphozyten wurden mit einer Kombination von AIDV-Isolaten (in Reizdosen von bis zu 5000 Virionen/Zelle) infiziert und das Zellenüberleben nach Infektion wurde am Monitor beobachtet. Nach 10 Tagen in Kultur waren in infizierten T-Zellen, die mit 8,8 und 1,3 mcg/ml 3'-Azido-3'-desoxythymidin behandelt worden waren, keine viralen zytopathischen Wirkungen ersichtlich, während unbehandelte infizierte Zellen um das 5-fache vermindert waren. Das Zellenüberleben wurde auch in einer HTLV-I transformierten, AIDV-überinfizierten Zelllinie, die von den obigen Zellen stammt, untersucht. 3'-Azido-3'-desoxythymidin blockierte in Konzentrationen von 2,7, 0,27 und 0,13 mcg/ml zytopathische Effekte in 7 Tagen zur Gänze. Schutzeffekte waren bei Infektionen ersichtlich, die sowohl durch zellfreie Virionen als auch mit Zellen verbundenem Virus induziert waren. 3'-Azido-3'-desoxythymidin verhinderte in einer Konzentration von 0,27 mcg/ml auch wirksam zytopathische Effektinduktion durch ein weniger verwandtes Haitisches Isolat von AIDV.

Toxizitätsuntersuchung:

3'-Azido-3'-desoxythymidin wurde sowohl an Mäuse als auch an Ratten verabreicht. Der LD₅₀-Wert betrug bei beiden Arten mehr als 750 mg/kg.

PATENTANSPRÜCHE

40

- 45 1. Verwendung von 3'-Azido-3'-desoxythymidin oder eines pharmazeutisch annehmbaren Derivates hieron, insbesondere von Salzen oder Estern hieron, zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung oder Prophylaxe einer menschlichen Retrovirusinfektion, insbesondere einer HTLV-I- und HTLV-III-Infektion.
- 50 2. Verwendung von 5 bis 1500 mg 3'-Azido-3'-desoxythymidin oder eines pharmazeutisch annehmbaren Derivates hieron für den im Anspruch 1 angegebenen Zweck.
- 55 3. Verwendung von 10 bis 1000 mg 3'-Azido-3'-desoxythymidin oder eines pharmazeutisch annehmbaren Derivates hieron für den im Anspruch 1 angegebenen Zweck.
- 55 4. Verwendung von 20 bis 700 mg 3'-Azido-3'-desoxythymidin oder eines pharmazeutisch annehmbaren Derivates hieron für den im Anspruch 1 angegebenen Zweck.

60