



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 15 945 T2 2005.11.03**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 165 560 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 15 945.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/06250**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 913 872.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/53603**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.03.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **14.09.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **17.11.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.11.2005**

(51) Int Cl.7: **C07D 473/16**

**C07D 473/18, A61K 31/52, A61K 31/522,
A61P 31/18, A61P 31/22**

(30) Unionspriorität:

267839 12.03.1999 US

(73) Patentinhaber:

The Regents of the University of Michigan, Ann Arbor, Mich., US; The Board of Governors of Wayne State University, Detroit, Mich., US

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

ZEMLICKA, Jiri, Warren, US; QIU, Yao-Ling, Detroit, US; DRACH, C., John, Ann Arbor, US; PTAK, G., Roger, Saline, US

(54) Bezeichnung: **2-HYDROXY METHYLCYCLOPROPYLIDENMETHYLPURINE ALS ANTIVIRALE WIRKSTOFFE**

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

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

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein neue Purin- und Pyrimidinverbindungen, die eine antivirale Wirksamkeit aufweisen, und Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Viren sind die ätiologische Ursache vieler lebensbedrohlicher, menschlicher Krankheiten. Von besonderer Bedeutung sind Herpes Viren, wie Herpes simplex 1 (HSV-1), Herpes simplex 2 (HSV-2), das Cytomegalievirus (CMV), das Epstein-Barr-Virus (EBV), das Varicella-Zoster-Virus (VZV) und das menschliche Herpesvirus 6 (HHV 6), die mit vielen üblichen viralen Krankheiten verbunden sind. Die HSV-1- und HSV-2-Infektionen sind durch Fieberbläschen der Haut, des Munds oder des Genitalbereichs gekennzeichnet. Nach der Erstinfektion wird das Virus in Nervenzellen aufgenommen und kann später im Leben eines Patienten wieder auftauchen. Die Infektion mit menschlichem CMV (HCMV) stellt ein lebenslanges Leiden dar, das zu Morbidität und Mortalität führen kann. Diese Krankheitserscheinungen schließen Mikrozephalie, Hepatosplenomegalie, Ikterus, Enzephalitis, Infektionen von neugeborenen Säuglingen oder Föten im Uterus und Infektionen von abwehrgeschwächten Wirten ein. Die HCMV-Infektion ist für Retinitis, Gastritis und Pneumonitis bei AIDS-Patienten verantwortlich, und durch HCMV ausgelöste Pneumonien oder Hepatitis sind häufige und schwerwiegende Komplikationen bei Knochenmarktransplantaten. EBV ruft eine infektiöse Mononukleose hervor, und wird als ätiologischer Erreger von nasopharyngealem Krebs, immunoblastischem Lymphom, Burkitt-Lymphom und Haarleukoplakie angesehen. VZV ruft Windpocken und Gürtelrose hervor. Obwohl bei Kindern Windpocken in der Regel keine tödlich verlaufende Krankheit ist, kann die rezidivierende Form dieser Infektion, Gürtelrose, im fortgeschrittenen Stadium zu einer Lähmung, Krämpfen und schließlich zum Tod führen. Außerdem stellt die Infektion mit VZV bei abwehrgeschwächten Patienten eine schwerwiegende Komplikation dar. Das menschliche Herpesvirus 6 (HHV-6), das gewöhnlich mit einem Hautausschlag bei Kindern verbunden ist, wurde auch bei Patienten mit dem erworbenen Immunschwächesyndrom (AIDS) identifiziert, und es kann ein Co-faktor bei der Pathogenese von AIDS in Wirten, die mit dem menschlichen Immundefektvirus (HIV) infiziert sind, sein. Levine, A. J., *Viruses*, Kap. 4, W. H. Freeman & Co., New York, S. 67–85 (1992); *Human Herpesvirus Infections*, Raven Press, New York (1986).

[0003] HIV ist die zugrundeliegende Ursache von AIDS, einer weltweiten Epidemie mit tödlichen Folgen. Gemäß der Weltgesundheitsorganisation wurden Ende 1994 über 4,5 Millionen AIDS-Fälle registriert, und 19,5 Millionen Menschen waren mit HIV infiziert. Es wird geschätzt, dass bis zum Jahr 2000 30 bis 40 Millionen mit HIV infiziert sind, mit 10 Millionen Fällen von voll entwickeltem AIDS. Schätzungen der Global AIDS Policy Coalition sind beträchtlich höher – bis zu 110 Millionen HIV-Infektionen und 25 Millionen AIDS-Fälle. *The Relationship between the Human Immunodeficiency Virus and the Acquired Immunodeficiency Syndrome*, The National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, S. 1–3 (1995).

[0004] Es wurde festgestellt, dass verschiedene Alkylderivate von Purinen und Pyrimidinen und Analoga davon eine antivirale Wirksamkeit aufweisen. Vor allem sind Acyclovir (Zovirax) und Ganciclovir (Cytovene), die zu dieser Gruppe von Verbindungen gehören, zugelassene Arzneistoffe gegen durch HSV-1, HSV-2, VZV und HCMV hervorgerufene Infektionen. *Acyclovir Therapy for Herpesvirus Infections* (Baker, Hrsg.), M. Dekker, New York (1990); *Ganciclovir Therapy for Cytomegalovirus Infection* (Spector, S. S., Hrsg.), M. Dekker, New York (1991). Ein beträchtlicher Aufwand wurde in die Konstruktion, Synthese und biologische Untersuchung von Analoga dieser Arzneistoffe sowie in die Entwicklung neuer antiviraler Mittel gesteckt. Larsson, A. et al., *Antimicrob. Agents & Chemother.* 30:598–605 (1986); Ashton, W. T. et al., *J. Med. Chem.* 31:2304–2315 (1988).

[0005] Gebräuchliche Arzneistoffe gegen AIDS schließen AZT (Zidovudin, Retrovir), ddI (Didanosin, Videx), ddC (Zalcitabin, Hivid) und d4T (Stavudin, Zerit) ein. De Clercq, E., *J. Med. Chem.* 38:2491–2517 (1995). Al-lennucleosidanaloga, wie Adenallen und Cytallen, sind Beispiele von Mitteln gegen HIV, die einen ungesättigten Alkylrest enthalten. U.S.-Patent Nr. 4,935,427; Zemlicka, J., *Allenols Derived from Nucleic Acid Bases - a New Class of Anti-HIV Agents: Chemistry and Biological Activity in Nucleosides and Nucleotides as Antitumor and Antiviral Agents* (Chu, C. K.; Baker, D. C., Hrsg.), Plenum Press, New York, S. 73–100 (1993).

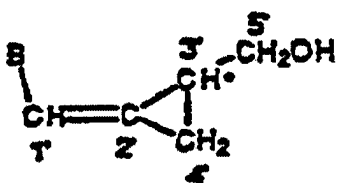
[0006] WO 98/30563 offenbart 2-Amino-6-alkoxy-substituierte Purine als antivirale Mittel.

[0007] Es ist somit wünschenswert, neue Verbindungen bereitzustellen, die gegen Viren, einschließlich HCMV, HSV-1, HSV-2, HHV-6, HIV, Hepatitis-B-Virus (HBV) und anderer Säugerviren, wirksam sind.

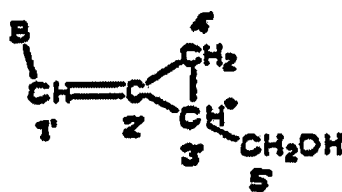
ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0008] Die vorliegende Erfindung stellt neue 2-Hydroxymethylcyclopropylidenmethyl-derivate von heterocyclischen Verbindungen, Prodrugs und pharmakologisch verträgliche Säuresalze davon bereit. Es wurde festgestellt, dass diese Verbindungen als antivirale Mittel verwendbar sind und gegen HCMV, HSV-1, HSV-2, HHV-6, HIV, EBV und HBV sowie gegen andere Säugerviren wirksam sind.

[0009] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung weisen die folgenden Formeln auf:



Formel 1

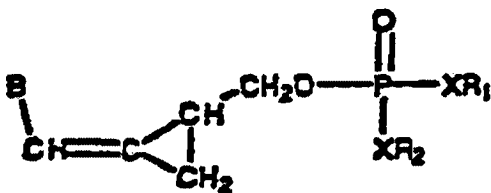


Formel 2

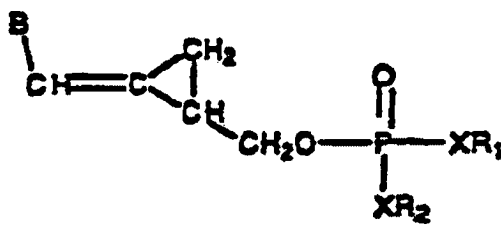
wobei B ein 2-Amino-6-azidopurin ist.

[0010] Prodrugs der antiviralen Nucleosidanaloga der vorliegenden Erfindung schließen lipophile Phosphatester oder Amidate ein, welche die Zellmembran durchdringen können. Für Fachleute ist es selbstverständlich, dass das Ziel von Prodrugs die Bereitstellung von wirksamen therapeutischen Mitteln gegen resistente Stämme von Viren (McGuigan, C. et al., J. Med. Chem. 36:1048–1052 (1993)) oder die Aktivierung von inaktiven Analoga ist. Franchetti, P. et al., J. Med. Chem. 37:3534–3541 (1994).

[0011] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung schließen daher auch Prodrugs der neuen Verbindungen ein, wobei die Prodrugs die folgenden Formeln aufweisen:



Formel 3



Formel 4

wobei B ein heterocyclischer Ring ist, wie vorstehend für die Formeln 1 und 2 definiert; X gleich O ist; und R₁ und R₂ Alkyl oder Aryl sind. Der Rest R₁X oder R₂X kann auch ein Aminosäurerest mit X als NH sein.

[0012] Zusammensetzungen, die zur Behandlung von viralen Infektionen, wie HCMV, HSV-1, HSV-2, HHV-6, HIV, EBV und HBV, verwendbar sind, enthalten eine wirksame Menge von mindestens einer Verbindung der Formeln 1 bis 4 oder einem pharmazeutisch verträglichen Salz davon.

[0013] Die vorliegende Erfindung schließt auch Verfahren zur Synthese von Verbindungen der Formeln 1 und 2 ein, wobei B ein 2-Amino-6-azidopurin ist.

[0014] Die vorliegende Erfindung stellt auch Verfahren zur Synthese von Prodrugs der Verbindungen, wie in den Formeln 3 und 4 dargestellt, bereit.

[0015] Die vorliegende Erfindung stellt auch Verfahren zur Synthese von im Wesentlichen enantiomer reinen R- und S-Enantiomeren der Verbindungen der vorliegenden Erfindung bereit.

[0016] Zusätzliche Aufgaben, Vorteile und Merkmale der vorliegenden Erfindung gehen aus der folgenden Beschreibung hervor, die mit den Begleitzeichnungen zusammengefasst wird.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

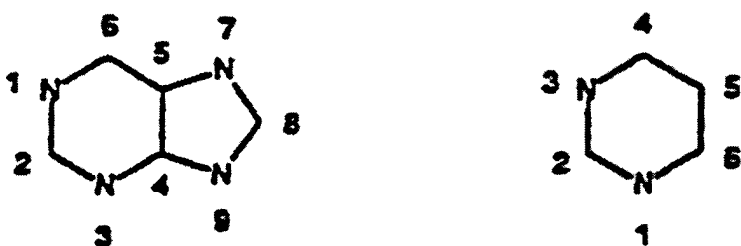
[0017] Die verschiedenen Vorteile der vorliegenden Erfindung werden einem Fachmann durch Lesen der folgenden Beschreibung und durch Bezugnahme auf die folgenden Zeichnungen offensichtlich, wobei:

[0018] [Fig. 1](#) die Synthese von Purin-2-hydroxymethylcyclopropylidenmethylpurinen und -pyrimidinen der Formeln 1 und 2 zeigt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0019] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung, von denen festgestellt wurde, dass sie gegen Herpesviren, das menschliche Immunschwächevirus und das Hepatitis-B-Virus wirksam sind, sind die Verbindungen der Formeln 1 bis 4, wobei B ein 2-Amino-6-azidopurin darstellt.

[0020] Die Nomenklatur der Verbindungen der vorliegenden Erfindung folgt Standardkonventionen. Die Nummerierung der Cyclopropylidenmethaneinheit, die an den heterocyclischen Ring B gebunden ist, ist in den Formeln 1 und 2 gezeigt. Die Purin- und Pyrimidinringe sind, wie nachstehend gezeigt, nummeriert:



[0021] Es ist selbstverständlich, dass heterocyclische Ringe, die Hydroxy- und Aminogruppen enthalten, mit den entsprechenden Oxo- und Iminoverbindungen tautomer sind.

[0022] Bevorzugte Verbindungen der vorliegenden Erfindung schließen auch die R- und S-Enantiomere der Verbindungen der Formeln 1 bis 4 ein. Die durch die Formeln 1 bis 4 beschriebenen Verbindungen enthalten ein asymmetrisches Kohlenstoffatom, das in den Formeln 1 und 2 mit einem Sternchen markiert ist. Die Verbindungen der Formel 1 und 2 der vorliegenden Erfindung sind daher racemische Gemische aus zwei optischen Antipoden, die durch herkömmliche Verfahren, wie Chromatographie oder fraktionierte Kristallisation geeigneter diastereoisomerer Derivate, wie Salze oder Ester mit optisch aktiven Säuren (Campher-10-sulfonsäure, Methoxyessigsäure, Dibenzoylweinsäure, 6-Methoxy-2-naphthyl-2-propansäure etc.), durch eine enantioselective Enzymsynthese von Estern eines Antipoden, wie Acetaten oder Butyraten, oder durch eine enantioselective Enzymhydrolyse von Estern der Verbindungen der Formeln 1 und 2, wie Acetaten oder Butyraten, aufgetrennt werden können. Die geeigneten Enzyme schließen Lipasen, wie Lipase AK, Lipase P30 oder Esterasen, wie Schweineleberesterase, ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Racemische Verbindungen, die eine Adenineinheit enthalten, können auch durch die Wirkung von Adenosindeaminase getrennt werden. In einer anderen Ausführungsform können die R- und S-Enantiomere, wie in den Beispielen 20 bis 25 beschrieben, durch Syntheseverfahren unter Verwendung von enantiomer reinen Ausgangsmaterialien erhalten werden.

[0023] Die Verbindungen 3 und 4, die sich von den racemischen Analoga 1 und 2 ableiten, sind Gemische aus vier Diastereoisomeren, mit der Maßgabe, dass der Rest R_1X nicht der gleiche wie der Rest R_2X ist.

[0024] Die Synthesen der Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind in den [Fig. 1](#) bis 7 zusammengefasst. Im Allgemeinen können Alkyl-cis- und -trans-2-halogen-2-halogenmethylcyclopropan-1-carboxylate als geeignete Alkylierungsmittel verwendet werden. Ethyl-cis- und -trans-2-chlor-2-chlormethylcyclopropan-1-carboxylate wurden früher beschrieben. Dyakonov, I. A. et al., J. Gen. Chem. USSR (englische Übersetzung) 25:1435-1440 (1955). Die reaktiveren cis- und trans-2-Brom-2-brommethylcyclopropan-1-carboxylate 6 und 7, welche die bevorzugten Reagenzien sind, wurden wie folgt hergestellt: die Zugabe von Ethyldiazoacetat zu 2,3-Dibrompropen (5) in Gegenwart eines geeigneten Katalysators, z.B. Dirhodiumtetraacetat (Doyle, M. P. et al., J. Org. Chem. 46:5094-5102 (1981)), und eines organischen Lösungsmittels, wie Dichlormethan, ergab, wie in [Fig. 1](#) beschrieben, ein Gemisch (1,5 : 1) aus den Ethyl-cis- und -trans-2-brom-2-brommethylcyclopropan-1-carboxylaten (6 und 7). Das so erhaltene Gemisch wird dann, wie in [Fig. 2](#) beschrieben, zur Alkylierung von Heterocyclen B-H (8, B = Purin- oder Pyrimidineinheit) in Gegenwart einer geeigneten Base, z.B. Kaliumcarbonat oder Natriumhydrid, in einem organischen Lösungsmittel, z.B. N,N-Dimethylformamid, verwendet, wobei sich ein Gemisch aus den cis- und trans-1-Brom-2-(carbethoxy)cyclopropylmethylpurinen oder -pyrimi-

dinen 9 und 10 in einem Verhältnis von 1,5 : 1 ergibt.

[0025] Ein Gemisch aus den Bromestern 9 und 10 wurde, wie in **Fig. 2** gezeigt, unter Verwendung einer starken Base, z.B. Kalium-tert.-butoxid, in einem geeigneten Lösungsmittel, wie N,N-Dimethylformamid, in ein Gemisch aus den syn- und anti-2-Carboethoxycyclopropylidenmethylpurinen 11 und 12 ($R = C_2H_5$) umgewandelt.

[0026] Wahlweise können die Alkylierung und Eliminierung in einem Einzelschritt kombiniert werden. Somit wird, wie in **Fig. 2** gezeigt, die Reaktion des Heterocyclus B-H (8, B = Purin) mit den Ethyl-2-brom-2-brommethylcyclopropan-1-carboxylaten (6 und 7) mit Kaliumcarbonat in N,N-Dimethylformamid bei erhöhter Temperatur durchgeführt, wobei sich direkt ein Gemisch aus den gewünschten syn- und anti-2-Carboethoxycyclopropylidenmethylpurinen 11 und 12 ($R = C_2H_5$) ergibt. Eine Aufarbeitung des Reaktionsgemisches mit Methanol führt zur Umesterung, wobei sich die Methylester 11 und 12 ($R = CH_3$) ergeben.

[0027] Die Reduktion der Carboethoxy- oder Carbomethoxygruppe mit einem geeigneten Reduktionsmittel, z.B. Diisobutylaluminiumhydrid, und einem organischen Lösungsmittel, wie Tetrahydrofuran, ergibt, wie in **Fig. 2** beschrieben, die Verbindungen der vorliegenden Erfindung, die syn- und anti-2-Hydroxymethylcyclopropylidenmethylpurine oder -pyrimidine 1 und 2. Das Gemisch aus den Verbindungen 1 und 2 wird dann durch Kristallisation oder Chromatographie auf Silicagel entweder direkt oder nach einer geeigneten Derivatisierung getrennt.

[0028] Ein Gemisch aus den syn- und anti-N⁹-(2-Hydroxymethylcyclopropylidenmethyl)adeninen 1 und 2 (B = Adenin-N⁹-yl) (das nicht von der vorliegenden Erfindung umfasst wird) wird zum Beispiel, wie in **Fig. 3** beschrieben, durch die Reaktion mit N,N-Dimethylformamidmethylacetal (Zemlicka, J. et al., Collect. Czech. Chem. Commun. 32:3159-3168 (1967)) in einem geeigneten Lösungsmittel, wie N,N-Dimethylformamid, in die entsprechenden N⁶-Dimethylaminomethylen-derivate 1 und 2 (B = N⁶-Dimethylaminomethylenadenin-N⁹-yl) umgewandelt. Die Verbindungen 1 und 2 (B = N⁶-Dimethylaminomethylenadenin-N⁹-yl) werden dann durch Chromatographie auf Silicagel getrennt, und von jedem Isomer wird mit Ammoniak in Methanol die Schutzgruppe abgespalten, wobei sich die Verbindungen der vorliegenden Erfindung, Synadenol (1, B = Adenin-N⁹-yl) und das anti-Isomer 2 (B = Adenin-N⁹-yl), ergeben.

[0029] Das syn- und anti-2-Amino-6-chlor-N⁹-(2-hydroxymethylcyclopropylidenmethyl)purin 1 und 2 (B = 2-Amino-6-chlorpurin-N⁹-yl) werden durch Säulenchromatographie auf Silicagel getrennt. Die syn- und anti-Isomere 1 und 2 (B = 2-Amino-6-chlorpurin-N⁹-yl) werden, wie in **Fig. 4** beschrieben, mit 80 %iger Ameisensäure hydrolysiert (Hamden, M. R. et al., J. Med. Chem. 33:187-196 (1990)), wobei sich die Verbindungen der vorliegenden Erfindung, Synguanol (1, B = Guanin-N⁹-yl) und das anti-Isomer 2 (B = Guanin-N⁹-yl), ergeben.

[0030] Die Ammonolyse des syn-2-Amino-6-chlor-N⁹-(2-hydroxymethylcyclopropylidenmethyl)purins 1 (B = 2-Amino-6-chlorpurin-N⁹-yl) ergibt, wie in **Fig. 4** gezeigt, das syn-2,6-Diamino-N⁹-(2-hydroxymethylcyclopropylidenmethyl)purin 1 (B = 2,6-Diaminopurin-N⁹-yl).

[0031] Die Reaktion des syn-2-Amino-6-chlor-N⁹-(2-hydroxymethylcyclopropylidenmethyl)purins 1 (B = 2-Amino-6-chlorpurin-N⁹-yl) mit Cyclopropylamin ergibt, wie in **Fig. 4** gezeigt, das syn-2-Amino-6-cyclopropylamino-N⁹-(2-hydroxymethylcyclopropylidenmethyl)purin 1 (B = 2-Amino-6-cyclopropylaminopurin-N⁹-yl).

[0032] Das Gemisch aus den syn- und anti-N¹-(2-Hydroxyinethylcyclopropylidenmethyl)cytosinen 1 und 2 (B = Cytosin-N¹-yl) wird, wie in **Fig. 5** beschrieben, mit einem geeigneten Benzoylierungsmittel, wie Benzoesäureanhydrid, in einem geeigneten Lösungsmittel, wie Ethanol, benzoyliert (Otter, B. A. et al., N-Acyl Derivatives of 2'-Deoxycytidine in Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry, Bd. 1, John Wiley & Sons, New York, S. 285-287 (1967)), wobei sich die syn- und anti-(N⁴-Benzoyl)-N¹-(2-hydroxymethylcyclopropylidenmethyl)cytosine 1 und 2 (B = N⁴-Benzoylcytosin-N¹-yl) ergeben, die durch Chromatographie auf Silicagel getrennt werden. Die getrennten Isomere werden mit Ammoniak in Methanol debenzoyliert, wobei sich das syn- und anti-N¹-(2-Hydroxymethylcyclopropylidenmethyl)cytosin 1 und 2 (B = Cytosin-N¹-yl) ergeben.

[0033] Prodrugs der syn- und anti-N⁹-(2-Hydroxymethylcyclopropylidenmethyl)adenine 3 und 4 (B = Adenin-N⁹-yl) wurden, wie in den **Fig. 6** und **7** beschrieben, durch die Reaktion von 1 und 2 (B = Adenin-N⁹-yl) mit Phenylmethoxyalaninylphosphorochloridat (13) (McGuigan, C. et al., Antiviral Res. 17:311-321 (1992)) unter Verwendung eines geeigneten Katalysators, z.B. N-Methylimidazol, in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, wie Tetrahydrofuran und Pyridin, hergestellt.

[0034] Die R- und S-Enantiomere der Verbindungen der Formeln 1 bis 4 können unter Verwendung von (R)-

und (S)-Methylenecyclopropan-carbonsäuren hergestellt werden.

[0035] Die Zusammensetzungen innerhalb des Umfangs der Erfindung schließen diejenigen ein, die eine neue Verbindung der vorliegenden Erfindung in einer wirksamen Menge, um den beabsichtigten Zweck zu erreichen, umfassen. Die Bestimmung einer wirksamen Menge und des beabsichtigten Zwecks liegt innerhalb des Fachwissens. Bevorzugte Dosierungen, die zum Beispiel von der Schwere der Infektion und der Reaktion des einzelnen Patienten auf die Behandlung abhängen, können von etwa 0,01 bis etwa 100 mg/kg Körpergewicht reichen, wobei sich eine Konzentration im Blut im Bereich von etwa 0,05 µg bis etwa 5 mg pro ml Vollblut ergibt.

[0036] Der hier verwendete Begriff "pharmazeutisch verträgliche Salze" soll Salze der Verbindungen der vorliegenden Erfindung mit pharmazeutisch verträglichen Säuren, z.B. anorganischen Säuren, wie Schwefelsäure, Salzsäure, Phosphorsäure etc., oder organischen Säuren, wie Essigsäure, bedeuten.

[0037] Pharmazeutisch verträgliche Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können auch geeignete Träger einschließen, die Exzipienten und Hilfsstoffe umfassen, welche die Verarbeitung der Wirkstoffe in Zubereitungen, die pharmazeutisch verwendet werden können, erleichtern. Derartige Zubereitungen, bevorzugt diejenigen, die oral verabreicht werden können, schließen Tabletten, Dragees und Kapseln ein. Weitere bevorzugte Zubereitungen sind diejenigen, die rektal verabreicht werden können, wie Suppositorien, sowie geeignete Lösungen zur Verabreichung durch Injektion oder oral, die etwa 0,1 bis etwa 99 % und bevorzugt etwa 25 bis etwa 85 % des Wirkstoffs der vorliegenden Erfindung zusammen mit dem Exzipienten enthalten.

[0038] Die Arzneimittelzubereitungen der vorliegenden Erfindung werden auf eine Art und Weise, die selbst bekannt ist, z.B. unter Verwendung der herkömmlichen Misch-, Granulierungs-, Drageeherstellungs-, Lösungs- oder Lyophilisierungsverfahren, hergestellt. Somit können Arzneimittelzubereitungen zur oralen Verwendung erhalten werden, indem die Wirkstoffe mit festen Exzipienten vereinigt werden, das so erhaltene Gemisch gegebenenfalls gemahlen wird, und das Gemisch aus Granulatkörnern nach der Zugabe geeigneter Hilfsstoffe, falls gewünscht oder notwendig, verarbeitet wird, wobei Tabletten oder Drageekerne erhalten werden.

[0039] Geeignete Exzipienten sind im besonderen Füllstoffe, wie Zucker, z.B. Lactose oder Saccharose, Mannit oder Sorbit, Cellulosezubereitungen und/oder Calciumphosphate, z.B. Tricalciumdiphosphat oder Calciumhydrogenphosphat, sowie Bindemittel, wie Stärkekaste, unter Verwendung von z.B. Maisstärke, Weizenstärke, Reisstärke, Kartoffelstärke, Gelatine, Tragantgummi, Methylcellulose und/oder Polyvinylpyrrolidon. Falls gewünscht, können Sprengmittel, wie die vorstehend erwähnten Stärken und auch Carboxymethylstärke, vernetztes Polyvinylpyrrolidon, Agar oder Alginsäure oder ein Salz davon, wie Natriumalginat, zugegeben werden. Hilfsstoffe sind vor allem Fließregulierungsmittel und Gleitmittel, z.B. Siliciumdioxid, Talkum, Stearinsäure oder Salze davon, wie Magnesiumstearat oder Calciumstearat, und/oder Polyethylenglycol. Drageekerne werden mit geeigneten Überzügen bereitgestellt, die, falls gewünscht, gegen Magensaft resistent sind. Zu diesem Zweck können konzentrierte Zuckerlösungen verwendet werden, die gegebenenfalls Gummi arabicum, Talkum, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenglycol und/oder Titandioxid, Lacklösungen und geeignete organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische enthalten können. Um gegenüber Magensaft resistente Überzüge herzustellen, werden Lösungen geeigneter Cellulosezubereitungen, wie Acetylcellulosephthalat oder Hydroxypropylmethylcellulosephthalat, verwendet. Farbstoffe oder Pigmente können z.B. zur Identifikation oder, um verschiedene Kombinationen von Wirkstoffdosen zu kennzeichnen, zu den Tabletten oder Drageeüberzügen gegeben werden.

[0040] Andere Arzneimittelzubereitungen, die oral verwendet werden können, schließen aus Gelatine hergestellte Stechkapseln sowie aus Gelatine hergestellte weiche, versiegelte Kapseln und einen Weichmacher, wie Glycerin oder Sorbit, ein. Die Stechkapseln können die Wirkstoffe in Form von Granulatkörnern enthalten, die mit Füllstoffen, wie Lactose, Bindemitteln, wie Stärken, und/oder Gleitmitteln, wie Talkum oder Magnesiumstearat, und gegebenenfalls Stabilisatoren gemischt werden können. In Weichkapseln sind die Wirkstoffe bevorzugt in geeigneten Flüssigkeiten, wie fetten Ölen, flüssigem Paraffin oder flüssigen Polyethylenglycolen, gelöst. Ferner können Stabilisatoren verwendet werden.

[0041] Mögliche Arzneimittelzubereitungen, die rektal verwendet werden können, schließen z.B. Suppositorien ein, die aus einer Kombination der Wirkstoffe mit einem Suppositoriengrundstoff bestehen. Geeignete Suppositoriengrundstoffe sind z.B. natürliche oder synthetische Triglyceride, Paraffinkohlenwasserstoffe, Polyethylenglycole oder höhere Alkanole. Es ist auch möglich, Rektalkapseln aus Gelatine, die aus einer Kombination der Wirkstoffe mit einem Grundstoff bestehen, zu verwenden. Mögliche Grundstoffmaterialien schließen z.B. flüssige Triglyceride, Polyethylenglycole oder Paraffinkohlenwasserstoffe ein.

[0042] Für die parenterale Verabreichung geeignete Formulierungen schließen wässrige Lösungen der Wirkstoffe in wasserlöslicher Form, z.B. wasserlösliche Salze, ein. Ferner kann eine Suspension der Wirkstoffe als geeignete ölige Injektionssuspensionen verabreicht werden. Geeignete lipophile Lösungsmittel oder Träger schließen fette Öle, wie Sesamöl, oder synthetische Fettsäureester, z.B. Ethyloleat oder Triglyceride, ein. Wässrige Injektionssuspensionen können Substanzen, welche die Viskosität der Suspension erhöhen, wie Natriumcarboxymethylcellulose, Sorbit und/oder Dextran, enthalten. Gegebenenfalls kann die Suspension auch Stabilisatoren enthalten.

[0043] In einer anderen Ausführungsform können die Wirkstoffe der vorliegenden Erfindung in Form von Liposomen, Arzneimittel, in denen der Wirkstoff entweder dispergiert enthalten ist oder verschiedenartig in Kapseln vorliegt, bestehend aus Schichten eines wässrigen Konzentrats, die an der hydrophoben Lipidschicht haften, verabreicht werden. Der Wirkstoff kann sowohl in der wässrigen Schicht als auch in der Lipidschicht oder in einem nicht-homogenen System, das allgemein als lipophile Suspension bekannt ist, vorliegen.

[0044] Es ist selbstverständlich, dass die Wirkstoffe der vorliegenden Erfindung in Kombination mit bekannten antiviralen Mitteln, z.B. Acyclovir, Ganciclovir, Zidovudin, AZT, ddI, ddC, 3TC und d4T, verabreicht werden können.

[0045] Die folgenden Beispiele beschreiben die Verbindungen der vorliegenden Erfindung und die Syntheschemata zu ihrer Herstellung weiter.

BEISPIEL 1 – Synthese der cis- und trans-Ethyl-2-brom-2-brommethylcyclopropan-1-carboxylate (6 und 7)
(Zwischenverbindungen)

[0046] Ethyldiazoacetat (90 % in Dichlormethan, 23,3 ml, 0,20 mol) wurde mit Hilfe einer Spritzenpumpe mit einer Geschwindigkeit von 1,1 ml/Stunde unter Rühren bei Raumtemperatur in eine Lösung von Dirhodiumtetraacetat (22,1 mg, 0,05 mmol) in 2,3-Dibrompropen (5,97 %, 68,0 g, 0,34 mol) und CH_2Cl_2 (3 ml) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum destilliert, und das Destillat wurde bei -78°C aufgefangen, um nicht-umgesetztes 2,3-Dibrompropen (20 g, 29 %) wiederzugewinnen. Wasser (100 ml) wurde zu dem öligen Rückstand gegeben, gefolgt von einer portionsweisen Zugabe von pulverisiertem Kaliumpermanganat bei 0°C unter Rühren. Insgesamt wurden 30 g Permanganat verbraucht. Der Überschuss an Permanganat wurde durch die Zugabe von festem Natriumthiosulfat entfernt. Das Gemisch wurde unter Verwendung eines Celite-Kissens filtriert, und die Feststoffe wurden mit Hilfe eines Beschallungsgeräts mit Ether (4×80 ml) gewaschen. Das Filtrat wurde mit Ether (4×70 ml) extrahiert. Die vereinigten Etherportionen wurden mit gesättigtem, wässrigem Natriumhydrogencarbonat (2×100 ml), Wasser (2×250 ml) und Salzlösung (2×100 ml) gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat und Abdampfen des Ethers wurde ein Gemisch aus den Produkten 6 und 7 als gelbes Öl (51,9 g, 91 % Ausbeute), $n_D^{25} = 1,5131$, erhalten. Es wies zur Verwendung in den nachfolgenden Schritten (Beispiele 2, 4, 6 und 10) eine ausreichende Reinheit auf. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte ein Gemisch aus den cis- und trans-Isomeren 6 und 7 im Verhältnis von 1,5:1. Die Destillation einer Probe dieses Produkts (5,0 g) ergab eine farblose Flüssigkeit (4,5 g), Sdp. $59-64^\circ\text{C}/0,25$ mmHg, $n_D^{25} = 1,5139$. IR (rein): 1733 cm^{-1} (C=O, Ester), 1036 und 868 cm^{-1} (Cyclopropanring).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ , cis-Isomer 1,30 (t, 3, CH_3), 1,73 (t, 1) und 1,85 (dd, 1, H_3), 2,47 (dd, 1, H_2), 3,97 (d, 2, CH_2Br), 4,19 (q, 2, OCH_2); trans-Isomer 1,29 (t, 3, CH_3), 1,52 (dd, 1) und 1,89 (t, 1, H_3), 2,10 (dd, 1, H_2), 3,76 (d, 2, CH_2Br), 4,21 (q, 2, OCH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) ppm, cis-Isomer 14,14 (CH_3), 26,43 (C_3), 31,44 (C_1), 37,21 (C_2), 38,91 (CH_2Br), 61,66 (OCH_2), 169,32 (C=O); trans-Isomer 14,30 (CH_3), 22,34 (C_3), 29,01 (C_1), 35,86 (C_2), 42,02 (CH_2Br), 61,59 (OCH_2), 168,12 (C=O).

EI-MS 288 (M, 0,3), 286 (M, 1,9) und 284 (M, 0,5), 256 (1,6), 258 (2,6) und 260 (1,2), 243 (5,0), 241 (10,2) und 239 (5,3), 211 (7,0), 213 (13,8) und 215 (7,4), 205 (52,2) und 207 (51,0), 177 (96,7) und 179 (94,4), 159 (7,1) und 161 (7,0), 131 (15,2) und 133 (16,8), 97 (30,4), 81 (15,3), 69 (16,3), 53 (70,8), 39 (15,9), 28 (CO, 100,0).

HRMS: Berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{10}^{79}\text{Br}_2\text{O}_2$: M 283,90475. Gefunden: M 283,9048.

Berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{Br}_2\text{O}_2$: C,29,59; H,3,55; Br,55,59. Gefunden: C,29,61;H,3,62; Br,55,37.

BEISPIEL 2 – Synthese des cis- N^9 -(1-Brom-2-carbethoxycyclopropylmethyl)adenins und trans- N^9 -(1-Brom-2-carbethoxycyclopropylmethyl)adenins 9 und 10 (Zwischenverbindungen)

[0047] Ein Gemisch aus den Dibromestern 6 und 7 (858 mg, 3,0 mmol) von Beispiel 1 wurde in eine Suspension des Natriumsalzes von Adenin gegeben, das unter Rühren und Stickstoff bei Raumtemperatur aus Adenin (405 mg, 3,0 mmol) und Natriumhydrid (60 %ige Dispersion in Mineralöl, 120 mg, 3,0 mmol) in N,N-Dimethylformamid (25 ml) hergestellt wurde. Das so erhaltene Gemisch wurde 12 Stunden auf 80°C (Badtemperatur)

erwärmt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum (Ölpumpe) abgedampft, und der Rückstand wurde auf Silicagel (3 g) adsorbiert, das dann auf das obere Ende einer Säule aus Silicagel (70 g) aufgetragen wurde. Die Elution wurde mit Dichlormethan-Methanol (96:4 und 94:6) durchgeführt, und das cis-Isomer 9 (305 mg, 29,9 % Ausbeute) und trans-Isomer 10 (180 mg, 17,6 % Ausbeute) wurden als blassgelbe Feststoffe erhalten. Analysenproben wurden durch Umkristallisation aus Benzol-Ethylacetat (cis-Isomer 9) und Benzol (trans-Isomer 10) erhalten.

cis-Isomer 9:

Smp. 200–203°C.

UV (Ethanol) max 260 nm (ϵ 14900), 209 nm (ϵ 19500).

IR (KBr) 3340 und 3150 cm^{-1} (NH_2), 1725 cm^{-1} (C=O, Ester), 1670, 1600 und 1580 cm^{-1} (Adeninring), 1045, 1015 und 867 cm^{-1} (Cyclopropanring).

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3SOCD_3) δ 1,23 (t, 3, CH_3), 1,76 (dd, 1) und 2,00 (t, 1, H_4), 2,49 (dd, 1, H_3 von Cyclopropan), 4,18 (q, 2, OCH_2), 4,66 (s, 2, H_1), 7,24 (s, 2, NH_2), 8,10 (s, 2, H_2 und H_8 von Adenin).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3SOCD_3) ppm 13,52 (CH_3), 22,25 (C_4), 28,57 (C_3), 36,28 (C_2), 46,64 (C_1), 60,75 (OCH_2), 168,82 (C=O); Adeninring: 118,10 (C_5), 140,46 (C_8), 149,20 (C_4), 152,03 (C_2), 155,49 (C_6).

FAB-MS (Thioglycerinmatrix) 341 und 343 (M+2H, 20,3, 18,6), 340 und 342 (M+H, 98,4, 100,0), 262 (8,0), 214 (4,3), 188 (5,9), 136 (25,2).

Berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{BrN}_5\text{O}_2$: C, 42,47; H, 4,16; Br, 23,28; N, 20,65. Gefunden: C, 42,24; H, 4,29; Br, 23,15; N, 20,59.

trans-Isomer 10:

Smp. 186–189°C.

UV (Ethanol) max 260 nm (ϵ 14700), 209 nm (ϵ 18700).

IR (KBr) 3350 und 3160 cm^{-1} (NH_2), 1745 cm^{-1} (C=O, Ester), 1655, 1605 und 1585 cm^{-1} (Adeninring), 1045, 1015 und 865 cm^{-1} (Cyclopropanring).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1,14 (t, 3, CH_3), 1,57 (t, 1) und 1,93 (dd, 1, H_4), 2,64 (dd, 1, H_3), 4,07 (q, 2, OCH_2), 4,52 (d, 2, H_1), 7,27 (s, 2, NH_2), 8,13 und 8,17 (2s, 2, H_2 und H_8 von Adenin).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) ppm 13,70 (CH_3), 19,95 (C_4), 26,05 (C_3), 36,99 (C_2), 51,93 (C_1), 60,42 (OCH_2), 167,63 (C=O); Adeninring: 118,01 (C_5), 140,30 (C_8), 149,23 (C_4), 152,14 (C_2), 155,55 (C_6).

FAB-MS (Thioglycerinmatrix) 341 und 343 (M+2H, 19,0, 18,2), 340 und 342 (M+H, 96,3, 100,0), 262 (32,1), 214 (12,1), 188 (12,5), 136 (78,3).

Berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{BrN}_5\text{O}_2$: C, 42,47; H, 4,16; Br, 23,28; N, 20,65. Gefunden: C, 42,60; H, 4,34; Br, 23,14; N, 20,87.

BEISPIEL 3 – Synthese des syn-2-Amino-6-azido- N^9 -(2-hydroxymethylcyclopropylidenmethyl)purins (1, B = 2-Amino-6-azidopurin- N^9 -yl)

[0048] Ein Gemisch aus der Verbindung 1 (B = 2-Amino-6-chlorpurin- N^9 -yl, 151 mg, 0,6 mmol) von Beispiel 7 und Natriumazid (117 mg, 1,8 mmol) in N,N-Dimethylformamid (10 ml) wurde 4 h in einem Ölbad auf 107°C erwärmt. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wurde Wasser (5 ml) zu dem Rückstand gegeben, wobei sich das Produkt 1 (B = 2-Amino-6-azidopurin- N^9 -yl) als weißer Feststoff (137 mg, 88,4 %) ergab. Smp. 184–187°C (Zers.).

UV (Ethanol) max 302 nm (ϵ 11450), 281 nm (Schulter, ϵ 9830), 229 nm (ϵ 30330).

IR (KBr): 3440, 3310 und 3140 cm^{-1} (NH und OH), 1640–1680 und 1565 cm^{-1} (Olefin und Purinring), 1040 und 1020 cm^{-1} (Cyclopropanring).

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3SOCD_3) δ 1,24 (ddd, 1) und 1,51 (td, 1, H_4), 2,15 (m, 1H, H_3), 3,28–3,38 (m, bei 3,34 teilweise mit H_2O überlappt, 1) und 3,72 (dt, 1, H_5), 5,08 (t, 1, OH), 7,32 (d, 1, H_1), 8,47 (s, 2H, 2- NH_2), 8,74 (s, 1, H_8).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3SOCD_3) ppm 6,76 (C_4), 19,72 (C_3), 63,13 (C_5), 110,61 (C_1), 111,99 (C_2), 117,45 (C_5), 137,41 (C_8), 143,63 (C_4), 144,42 (C_2) und 146,48 (C_6).

Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_8\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 43,48; H, 4,38; N, 40,56. Gefunden: C, 43,45; H, 4,23; N, 40,48.

BEISPIEL 4 – In vitro Verfahren zur antiviralen Beurteilung

[0049] Zellen und Viren. Das routinemäßige Wachstum und die Passage von KB-Zellen wurden in Monolayerkulturen unter Verwendung von minimalem essentiellen Medium (MEM) mit entweder Hanks-Salzen [MEM(H)] oder Earle-Salzen [MEM(E)], das mit 10 % Kälberserum ergänzt war, durchgeführt. Die Natriumhydrogencarbonatkonzentration wurde variiert, um die erforderliche Pufferkapazität einzuhalten. Man ließ Kulturen von diploiden Fibroblasten aus menschlicher Vorhaut (HFF) oder MRC-5-Zellen in Medium, das aus MEM(E) mit 10 % fötalem Rinderserum bestand, wachsen. Die Zellen wurden, wie früher beschrieben, bei Verdünnungen von 1:2 bis 1:10 gemäß herkömmlichen Verfahren unter Verwendung von 0,05 % Trypsin plus 0,02 % EDTA in einer HEPES-gepufferten Salzlösung (HBS) (Shipman, C., Jr., Proc. Soc. Exp. Biol. 130:305–310

(1969)) passagiert. Turk, S. R. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:544–550 (1987). HFF- und MRC-5-Zellen wurden nur bei Verdünnungen von 1:2 passagiert. CEM-Zellen wurden, wie früher ausführlich beschrieben, in einer Suspensionskultur gehalten. Kucera, L. S. et al., *AIDS Res. Human Retroviruses* 9:307–314 (1993).

[0050] Virologische Verfahren. Eine HCMV-Stammlösung wurde durch Infizieren von HFF-Zellen mit einer Multiplizität der Infektion (M.d.I.) von $< 0,01$ plaquebildenden Einheiten (PFU) pro Zelle hergestellt. Das Zellwachstumsmedium wurde alle vier Tage gewechselt, bis die Zellpathologie in allen Zellen offensichtlich war (ungefähr 21 Tage). Die überstehenden Flüssigkeiten wurden als Virusstammlösung zurückbehalten. HSV-1-Stammlösungen mit hohem Titer wurden, wie früher ausführlich beschrieben, durch Infizieren von KB-Zellen mit einer M.d.I. von $< 0,1$ hergestellt. Turk, S. R. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:544–550 (1987). Virustiter wurden, wie früher beschrieben, unter Verwendung von Monolayerkulturen von HFF-Zellen für HCMV und Monolayerkulturen von BSC-1-Zellen für HSV-1 bestimmt. Prichard, M. N. et al., *J. Virol. Methods* 28:101–106 (1990). Kurz gesagt, HFF- oder BSC-1-Zellen wurden, wie vorstehend beschrieben, in Mehrfachschalen mit 96 Vertiefungen angesetzt und über Nacht bei 37°C in einer angefeuchteten Atmosphäre aus 3 % CO₂ – 97 % Luft inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen mit HCMV oder HSV-1 inokuliert und über die verbliebenen elf Spalten der Platte mit 96 Vertiefungen 1:3 in Reihe verdünnt. Die Kulturen wurden bei 37°C 2 h inkubiert, um die Adsorption der Viren zu ermöglichen, und dann wurde das Virusinokulum durch 0,2 ml frisches Medium ersetzt. Die Kulturen wurden für HCMV sieben Tage und für HSV-1 zwei oder drei Tage inkubiert, das Medium wurde entfernt, und die Zellschichten wurden mit 0,1 % Kristallviolett in 20 %igem Methanol angefärbt. Die Plaques wurden unter 20-facher Vergrößerung in Vertiefungen mit der Verdünnung, die 5 bis 20 Plaques pro Vertiefung ergab, gezählt. Virustiter wurden gemäß der folgenden Formel berechnet: Titer (PFU/ml) = Zahl der Plaques $\times 5 \times 3^n$; wobei n die n-te Verdünnung des Virus darstellt, die zur Infektion der Vertiefung, in der die Plaques gezählt wurden, verwendet wurde.

Tests hinsichtlich der antiviralen Wirksamkeit

[0051] (a) HCMV. Die Wirkung der Verbindungen auf die Replikation von HCMV wurde unter Verwendung eines Tests der Plaqueverringerng gemessen. HFF-Zellen in Mehrfachschalen mit 24 Vertiefungen wurden unter Verwendung der vorstehend ausführlich beschriebenen Verfahren mit ungefähr 100 PFU von HCMV pro cm² der Zellschicht infiziert. Im Anschluss an die Virusadsorption wurden die in Wachstumsmedium gelösten Verbindungen in drei bis sechs ausgewählten Konzentrationen in Vertiefungen in zweifacher Ausfertigung gegeben. Im Anschluss an die 7- bis 10-tägige Inkubation bei 37°C wurden die Zellschichten fixiert, mit Kristallviolett angefärbt, und die mikroskopischen Plaques wurden, wie vorstehend beschrieben, gezählt. Die Wirkungen der Arzneistoffe wurden als Prozentsatz der Verringerung der Zahl an Plaques in Gegenwart der jeweiligen Arzneistoffkonzentration, verglichen mit der in Abwesenheit von Arzneistoff beobachteten Zahl, berechnet. Ganciclovir (DHPG) wurde in allen Experimenten als positive Kontrolle verwendet.

[0052] Die Wirkung der Verbindungen auf die Replikation von HCMV wurde auch unter Verwendung eines Tests der Ausbeuteverringerng gemessen. HFF-Zellen wurden, wie vorstehend beschrieben, in Mehrfachschalen mit 96 Vertiefungen angesetzt, über Nacht inkubiert, das Medium wurde entfernt, und die Kulturen wurden mit HCMV mit einer M.d.I. von 0,5 bis 1 PFU pro Zelle, wie anderwärtig berichtet, inokuliert. Nach der Virusadsorption wurde das Inokulum durch 0,2 ml frisches Medium, das die Testverbindungen enthielt, ersetzt. Die erste Reihe von 12 Vertiefungen ließ man ungestört, und sie diente als Viruskontrollen. Jede Vertiefung in der zweiten Reihe erhielt zusätzliche 0,1 ml Medium mit der Testverbindung in dem Dreifachen der gewünschten Endkonzentration. Die Inhalte der 12 Vertiefungen wurden durch wiederholtes Pipettieren gemischt und dann entlang der verbliebenen Vertiefungen 1:3 in Reihe verdünnt. Auf diese Art und Weise konnten sechs Verbindungen auf einer Einzelplatte mit Konzentrationen von 100 µM bis 0,14 µM in zweifacher Ausfertigung untersucht werden. Die Platten wurden bei 37°C sieben Tage inkubiert und einem Einfrier- und Auftauzyklus unterzogen; aliquote Teile aus jeder der acht Vertiefungen einer bestimmten Spalte wurden in die erste Spalte einer frischen Monolayerkultur von HFF-Zellen in 96 Vertiefungen überführt. Die Inhalte wurden gemischt und über die verbliebenen elf Spalten der zweiten Platte 1:3 in Reihe verdünnt. Jede Spalte der ursprünglichen ersten Platte wurde auf diese Art und Weise über eine separate Platte verdünnt. Die Kulturen wurden inkubiert, die Plaques wurden gezählt, und die Titer wurden, wie vorstehend beschrieben, berechnet.

[0053] (b) HSV-1. Ein enzymverbundener Immunadsorptionstest (ELISA) wurde zum Nachweis von HSV-1 verwendet. BSC-1-Zellen wurden mit 10000 Zellen pro Vertiefung in Mehrfachschalen mit 96 Vertiefungen in einem Gesamtvolumen von 200 µl pro Vertiefung von MEM(E) plus 10 % Kälberserum angesetzt. Nach der Inkubation über Nacht bei 37°C wurden der Arzneistoff und HSV-1 in einer Menge von 100 PFU/Vertiefung zugegeben. Die ELISA-Platten wurden mit 200 µl 10 % Kälberserum und 0,05 % Tween in HBS pro Vertiefung

blockiert. Nach 30-minütiger Inkubation wurde das Blockierungsmittel zweimal mit HBS-T gespült. Mit AP konjugierter anti-HSV-1-Antikörper aus Kaninchen wurde in einer Verdünnung von 1:400 in HBS-F zugegeben. Die Platten wurden mit Klebefolie versiegelt und eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Platten wurden im Dunkeln mit 100 µl Substratlösung pro Vertiefung, die p-Nitrophenylphosphat enthielt, entwickelt. Die Platten wurden bei 492 nm gelesen. Die Wirkungen der Arzneistoffe wurden als Prozentsatz der Virusverringerung in Gegenwart der jeweiligen Arzneistoffkonzentration, verglichen mit dem Titer, der in Abwesenheit von Arzneistoff erhalten wurde, berechnet. Acyclovir wurde in allen Experimenten als positive Kontrolle verwendet.

[0054] (c) HHV-6. In diesem Fall wurde der enzymverbundene Immunadsorptionstest (ELISA) auf Platten mit kovalentem Amin (Costar, Cambridge, MA) durchgeführt. Die Platten wurden durch die Zugabe eines homobifunktionellen Vernetzungsmittels, Bis(sulfosuccinimidyl)suberat, das mit 1 mg/ml in 30 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gelöst war, aktiviert, und 300 µl Vernetzer wurden in jede Vertiefung in der kovalenten Platte gegeben. Der Vernetzer reagierte 30 min bei Raumtemperatur mit der Aminfunktion auf der Platte. Das Nebenprodukt, Natrium-N-hydroxysuccinimidsulfid, wurde durch Dekantieren und zweimaliges Waschen der Platte mit PBS entfernt. Proben, die aus 150 µl gemischten, suspendierten HSB₂-Zellen aus der ursprünglichen mit Arzneistoff behandelten Platte bestanden, wurden in einem gleichen Volumen von 10 % Triton X-100 in Beschichtungspuffer (15 mM Na₂CO₃, 3,5 mM NaHCO₃, pH 9,6) solubilisiert. Die Platte wurde bedeckt und dann 1 h bei 37°C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Diese Bindungsbedingungen erleichterten die kovalente Bindung des Antigens an das freie Ende des Vernetzers.

[0055] Nach der kovalenten Bindung wurde die Antigenlösung dekantiert, und die Platte wurde sechsmal in HEPES-gepufferter Salzlösung (Shipman, C., Jr., Proc. Soc. Exp. Biol. 130:305-310 (1969)) mit 0,05 % Tween 20 (HBS-T) gewaschen, wobei bei jedem Waschvorgang drei min eingeweicht wurde. Die nicht-gebundenen Stellen auf der Platte wurden mit 300 µl 2 %iger, fettarmer Trockenmilch in PBS (Blockierungsmittel) pro Vertiefung 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler blockiert. Das Blockierungsmittel wurde abdekantiert, und 50 µl des verdünnten primären, monoclonalen Antikörpers, der für das Glycoprotein gp116 des HHV-6 (GS) spezifisch ist, wurden zugegeben. Die Antikörperlösung bestand aus Antikörper, der in gleichen Volumina des Blockierungsmittels und 10 % Triton X-100 in Beschichtungspuffer 1:400 verdünnt war. Die Gegenwart von sowohl Blockierungsmittel als auch Detergens in den Antikörperlösungen war notwendig, um das Hintergrundsignal zu verringern. Die Platte wurde dann bedeckt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde erneut, wie vorstehend beschrieben, gewaschen, und dann wurde wieder wie vorher Blockierungsmittel zugegeben. Als nächstes erhielt jede Vertiefung 100 µl einer Lösung des sekundären Antikörpers, mit Meerrettichperoxidase markierter Anti-Maus-Antikörper aus Kaninchen, der (wie vorstehend) 1:400 verdünnt war. Die Platte wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde erneut, wie vorstehend beschrieben, gewaschen, und unter Verwendung von 100 µl TMB-Turbo/Vertiefung (Pierce, Rockford, IL) 30 min bei Raumtemperatur entwickelt. Die Reaktion wurde mit 50 µl 2 M H₂SO₄/Vertiefung gestoppt. Die Extinktion in jeder Vertiefung wurde bei 450/570 nm bestimmt.

[0056] (d) HIV-1. Reverse Transcriptase (RT) wurde als Marker für HIV-1 verwendet. Durch diesen Test wurde die Gegenwart von HIV in Überständen von CEM-Zellen, die mit dem Stamm III_B von HIV-1 infiziert waren, durch den Grad der RT-Aktivität gemessen. Man ließ die Zellen wachsen, infizierte sie und inkubierte sie in Gegenwart von sieben Konzentrationen (halblogarithmische Verdünnungen), beginnend mit 1 oder 100 µM der zu untersuchenden Verbindungen. Die Verfahren und der RT-Test wurden, wie früher ausführlich beschrieben, durchgeführt. Kucera, L. S. et al., AIDS Res. Human Retroviruses 9:307-314 (1993); White, E. L. et al., Antiviral Res. 16:257-266 (1991).

[0057] Cytotoxizitätstests. Zwei verschiedene Tests wurden verwendet, um die Cytotoxizität von ausgewählten Verbindungen, wie es früher ausführlich beschrieben wurde, zu untersuchen. (i) Die in stationären HFF-Zellen und in wachsenden CEM-Zellen erzeugte Cytotoxizität wurde durch mikroskopische Untersuchung von in Plaque- und RT-Tests verwendeten Zellen, die nicht von dem Virus befallen waren, bestimmt. Turk, S. R. et al., Antimicrob. Agents Chemother. 31:544-550 (1987). (ii) Die Wirkung der Verbindungen während zwei Populationsverdoppelungen von KB-Zellen wurde durch Anfärben mit Kristallviolett und spektrophotometrische quantitative Bestimmung des aus den angefärbten Zellen eluierten Farbstoffs bestimmt. Prichard, M. N. et al., Antimicrob. Agents Chemother. 35:1060-1065 (1991).

[0058] Datenanalyse. Die Dosis-Antwort-Beziehungen wurden durch lineare Regression der Hemmung von Parametern in Prozent, die in den vorstehenden Abschnitten abgeleitet wurden, gegen logarithmische Arzneistoffkonzentrationen hergestellt. Die Konzentrationen mit fünfzigprozentiger Hemmung (IC₅₀) wurden aus den

Regressionsgeraden berechnet. Proben, die positive Kontrollen enthielten (Acyclovir für HSV-1, Ganciclovir für HCMV und 2-Acetylpyridinthiosemicarbazon für die Cytotoxizität) wurden in allen Tests verwendet.

Antivirale Wirksamkeit:

Verbindung	IC ₅₀ (µM)		
	HCMV ^a	HSV-1 ^b	HIV-1 ^c
1 (B = 2-Amino-6-azidopurin), Beispiel 3	41	>100	>100

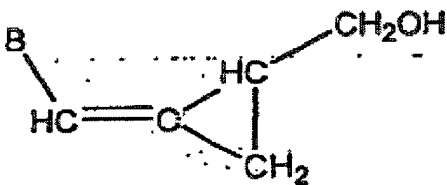
^aPlaueverringung. ^bELISA. ^cTest mit reverser Transcriptase. Daten für eine hohe Multiplizität der Infektion (M.d.I.). Die IC₅₀-Werte in der Tabelle auf Seite 36 beziehen sich auf eine niedrige M.d.I..

Cytotoxizität:

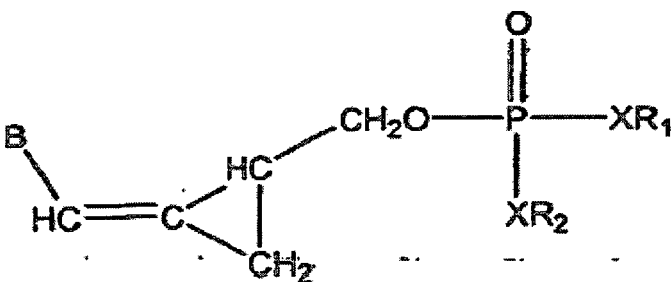
Enantiomer	IC ₅₀ (µM)		
	HFF (visuell)	KB (Wachstum)	CEM (visuell)
1 (B = 2-Amino-6-azidopurin), Beispiel 3	>100	>100	>100

Patentansprüche

1. Verbindung mit der Formel:

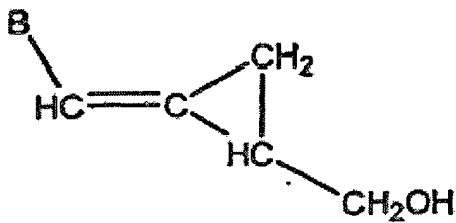


oder der Formel:

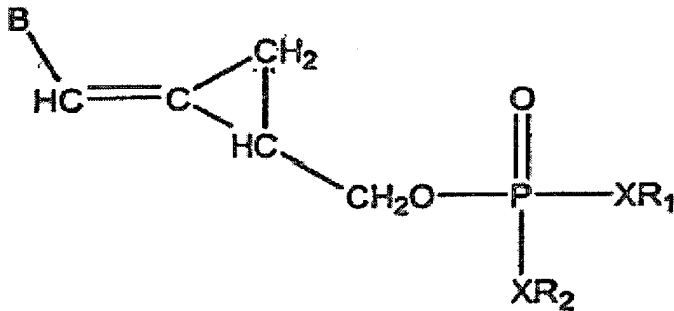


wobei B ausgewählt ist aus 2-Amino-6-azidopurin, R₁, R₂ Alkyl- oder Arylreste darstellen, X gleich O ist, und R₁X und R₂X auch Aminosäurereste mit X als NH sein können; und ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon.

2. Verbindung der Formel:



oder der Formel:



wobei B ausgewählt ist aus 2-Amino-6-azidopurin, R_1 , R_2 Alkyl- oder Arylreste darstellen, X gleich O ist, und R_1X und R_2X auch Aminosäurereste mit X als NH sein können; und ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon.

3. Verbindung gemäß Anspruch 1 ausgewählt aus syn-2-Amino-6-azido- N^9 -(2-hydroxymethylcyclopropylidene)methylpurin und pharmazeutisch verträglichen Salzen und phosphorylierten Prodrugs davon.
4. Verbindung gemäß Anspruch 3, wobei die Verbindung das R- oder S-Enantiomer ist.
5. Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
6. Verwendung einer antiviralen Verbindung ausgewählt aus einer der Verbindungen der Ansprüche 1 bis 4 und Kombinationen davon für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines mit einem Virus infizierten Säugers.
7. Verwendung gemäß Anspruch 6, wobei der Säuger ein Mensch ist.
8. Verwendung gemäß Anspruch 6 oder 7, wobei das Virus ausgewählt ist aus einem menschlichen Herpesvirus, einem menschlichen Immundefektvirus und einem Hepatitis-B-Virus.
9. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8, wobei weiterhin eine zusätzliche antivirale Verbindung zu verabreichen ist.
10. Verwendung gemäß Anspruch 9, wobei die zusätzliche antivirale Verbindung ausgewählt ist aus Acyclovir, Ganciclovir, Zidovudin, AZT, ddI, ddC, 3TC, d4T und Kombinationen davon.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

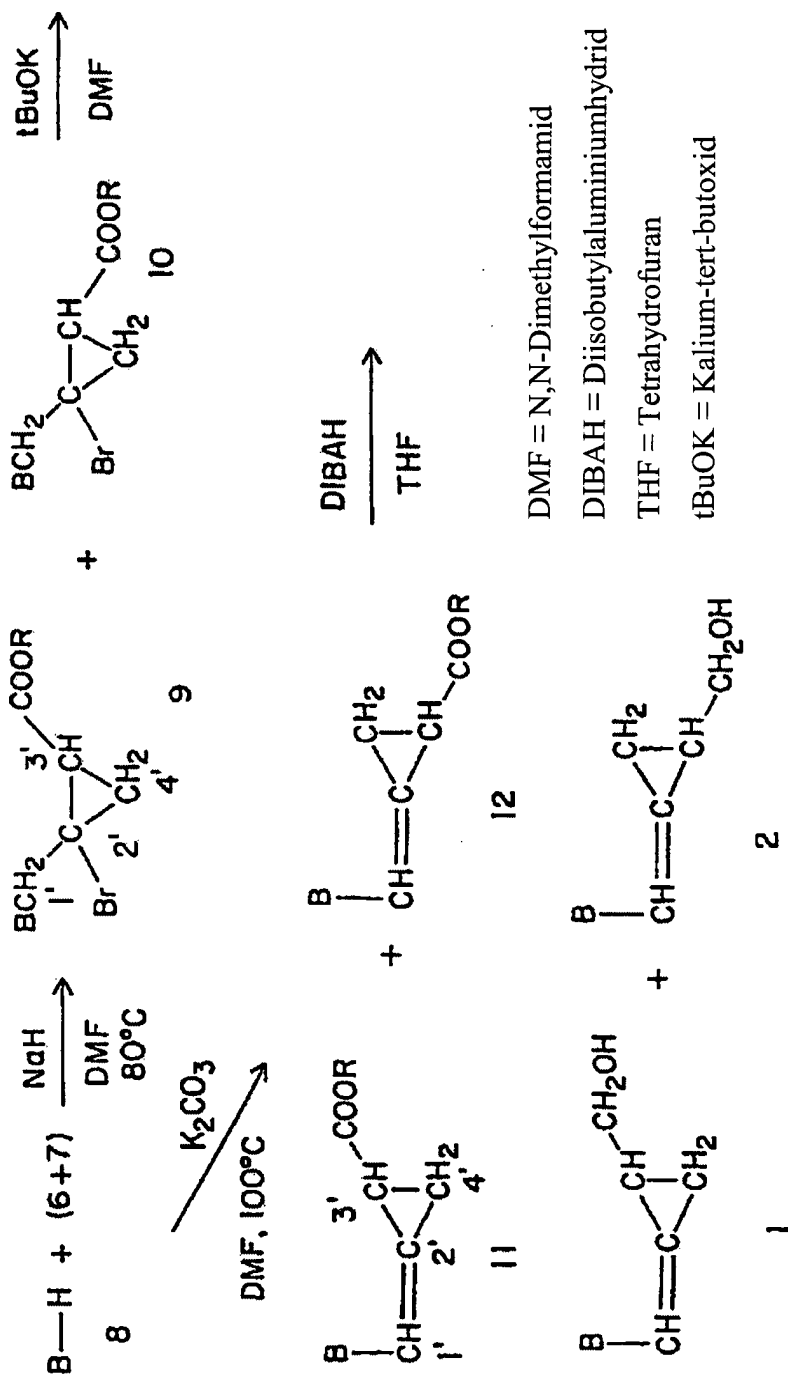


FIG. 1