



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : A61K 31/70, 31/52		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/00099 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. Januar 1993 (07.01.93)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE92/00515		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 19. Juni 1992 (19.06.92)		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: P 41 21 001.8 21. Juni 1991 (21.06.91) DE		(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-DELBRUCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Str. 10, D-1115 Berlin (DE).	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : MATTHES, Eckart [DE/DE]; Karower Chaussee 129, D-1115 Berlin (DE). VAN JANTA-LIPINSKI, Martin [DE/DE]; Mittelweg 75, D-1185 Berlin (DE). MENTEL, Renate [DE/DE]; Breitscheidstraße 14, D-2200 Greifswald (DE).			
(54) Title: USE OF PYRIMIDINE AND PURINE NUCLEOSIDES FOR THE PROPHYLAXIS AND/OR TREATMENT OF INFECTIONS CAUSED BY ADENOVIRUSES			
(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON PYRIMIDIN- UND PURINNUCLEOSIDEN ZUR PROPHYLAXE UND/ODER BEHANDLUNG VON DURCH ADENOVIREN VERURSACHTEN INFektIONEN			
(57) Abstract <p>The invention concerns pyrimidine and purine nucleosides intended for use against infections caused by adenoviruses.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft Pyrimidin- und Purinucleoside zur Verwendung gegen durch Adenoviren verursachte Infektionen.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

- 1 -

Beschreibung

Verwendung von Pyrimidin- und Purinnucleosiden zur Prophylaxe und/oder Behandlung von durch Adenoviren verursachten Infektionen

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Pyrimidin- und Purinnucleosiden als Wirkstoffe zur Prophylaxe und/oder Behandlung von durch Adenoviren verursachten Infektionen, insbesondere in der Humanmedizin.

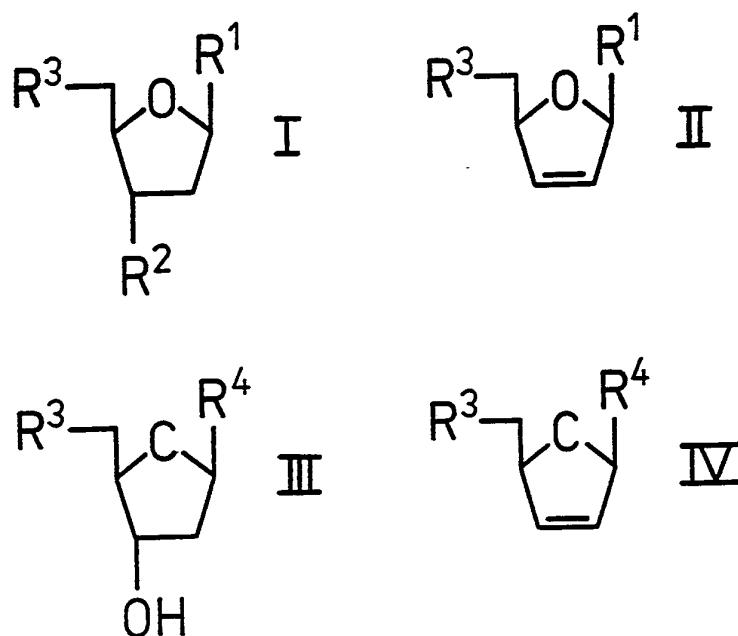
Adenoviren verursachen fieberhafte Infektionen der Schleimhäute der oberen Luftwege oder des Intestinaltraktes, hämorrhagische Zystitiden, das Pharyngokonjunktivitisfieber oder epidemisch auftretende langwierige Keratokonjunktividen. Von schweren durch Adenoviren verursachte Bronchopneumonien mit tödlichen Ausgang sind insbesondere Säuglinge und Kleinkinder mit herabgesetzter Immunabwehr betroffen. Auch bei AIDS-Patienten und Transplantatempfängern spielen Adenovirusinfektionen eine zunehmend größere Rolle. Bisher gibt es keine wirksame antivirale Therapie. Einzig in EP 0305117 sind 5-substituierte 3'-fluormodifizierte Desoxyuridinderivate als potentielle Hemmstoffe von Adenovirusinfektionen beschrieben, wobei eine antivirale Wirksamkeit nur von 3'-Fluorthymidin nachgewiesen wurde, von dem aus einer Reihe anderer Untersuchungen bekannt ist, daß es auch die Zellvermehrung relativ stark beeinträchtigt (Matthes et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 153, 825-831 (1988); Hartmann et al. AIDS Res. and Human Retroviruses 4, 457-466 (1988); Herdewijn et al. J. Med. Chem. 30, 1270-1278 (1987). Damit verfügt es nicht über die hohe Selektivität, die für einen klinischen Einsatz bei Adenovirusinfektionen erforderlich ist.

Die Erfindung hat die Aufgabe, pharmazeutische Mittel für die Prophylaxe und/oder die Behandlung entsprechender Infektionen bereitzustellen, die neben einer hohen Wirksamkeit eine gute Verträglichkeit und geringe Toxizität aufweisen.

-2-

Die Erfindung wird gemäß der Ansprüche 1, 4, und 5 realisiert. Die Unteransprüche sind entsprechende Vorzugsvarianten. Erfindungsgemäß werden Pyrimidin- und Purinnucleoside mit den allgemeinen Formeln

I, II, III oder IV



in denen R^1 = Thymin, Cytosin, 5-Methylcytosin, 5-Ethylcytosin, 5-Formylcytosin, Adenin, 6-Monoalkyladenin (C_1-C_3), Guanin, 6-Chlorguanin, 6-Thioguanin, 6-Methoxyguanin, 2,6-Diaminopurin,

R^2 = H, F, N_3 ,

R^3 = OH, O-Acetyl, O-Palmitoyl, O-Alkoxy carbonyl, Phosphonat, Mono-, Di-, Triphosphat bzw. andere Precursorgruppen für die 5-Hydroxylgruppe,

R^4 = Guanin, 6-Chlorguanin, 6-Thioguanin, 6-Methoxyguanin, 2,6-Diaminopurin,

mit folgender Einschränkung:

wenn R^1 = Thymin, dann ist $R^2 \neq F$

bedeuten

als Wirkstoffe allein oder als Kombination mit üblichen Träger- und Verdünnungsmitteln verwendet.

Diese Pyrimidin- und Purinnucleoside stellen Wirkstoffe gegen Adenovirusinfektionen dar, die als solche sowie in Form pharmazeutischer Mittel zusammen mit geeigneten Hilfs- und/oder Trägerstoffen zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Adenovirusinfektionen insbesondere in der Humanmedizin vorteilhaft eingesetzt werden können.

Als besonders wirksam erwiesen sich:

2',3'-Didesoxycytidin (I)
2',3'-Didesoxyadenosin (I)
2',3'-Didesoxyguanosin (I)
2',3'-Didesoxy-3'-fluorcytidin (I)
2',3'-Didesoxy-3'-fluor-5-methylcytidin (I)
2',3'-Didesoxy-3'-fluorguanosin (I)
3'-Azido-2',3'-didesoxyguanosin (I)
2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxythymidin (II)
2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxyadenosin (II)
carbozyklisches 2'-Desoxyguanosin (III)
carbozyklisches 2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxyguanosin (IV)

Sie sind gegenüber den Verbindungen des Standes der Technik gut wirksam und weisen eine geringere Toxizität und weniger Nebenwirkungen auf.

Ihre Herstellung erfolgt nach an sich bekannten Verfahren.

Die Pyrimindinnucleoside des Typs I werden im Zuckerteil modifiziert durch den nucleophilen Austausch bzw. die Hydrogenolyse geeigneter Gruppen. Der Heterocyclus kann durch Aminierung leicht in der C-4-Position bzw. durch Bromierung einer Methylgruppe und nachfolgender Hydrolyse am C-5-Atom verändert werden.

Purinnucleoside, deren 3'-Position modifiziert ist, werden durch Übertragung des entsprechenden Zuckerrestes eines

Pyrimidinnucleosids auf das jeweilige Purin erhalten. Aus geeigneten 3'-Sulfonyloxyverbindungen werden in Eliminierungsreaktionen die 2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxynucleoside vom Typ II erhalten, die durch katalytische Hydrogenolyse in die 2',3'-Didesoxynucleoside überführt werden. Die carbocyclischen 2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxy-2,6-disubstituierten Purinnucleoside werden aus 2-Amino-4,6-dichlorpyrimidin und (cis-4-C-hydroxymethyl) cyclopentylamin über (tcis-[4-[C2,5-Diamino-6-chlorpyrimidinyl]amino]-2-cyclopentenyl] carbinol als Zwischenstufe synthetisiert. (R. VINCE and M. HUA, J. Med. Chem. 1990, 33, 17-21)

Die Wirksamkeit einiger der erfindungsgemäßen Verbindungen wird wie folgt belegt:

a) Antivirale Aktivität

Vero-Zellen wurden passagiert im Verhältnis 1:6 in Wachstumsmedium MEM unter Zusatz von 8% fötalem Kälberserum, und einer 0,075%igen Natriumbikarbonatlösung und 100 U Penicillin G und 100 µg Streptomycin/ml Medium.

Diesen Zellkulturen wurden Suspensionen des Adenovirus Typ 5 zugesetzt, die nach einstündiger Adsorption entfernt und durch das obengenannte Medium ersetzt wurden.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C über einen Zeitraum von 4 Tagen bis zur Ausbreitung eines kompletten zytopathischen Effektes. Nach 3-maligem Frieren und Tauen der Zellkultur wurde der virushaltige Überstand durch Zentrifugation gewonnen und bei - 70°C bis zum Versuchsbeginn aufbewahrt. Die Titerbestimmung der Suspension ergab $10^{5,5}$ TCID₅₀/0,1 ml.

Die Bestimmung der antiviralen Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgte in 2 verschiedenen Testverfahren. Test 1: Hierbei wurden die Substanzen mit den Zellen (200000/ml) für 30 Minuten vorinkubiert und danach die Virussuspension in einer konstanten Dosis von 30 TCID₅₀ hinzugefügt. Das Auftreten des virusinduzierten zytopathischen Effektes wurde bis zu 7 Tage nach Inkubationsbeginn verfolgt. Das Ausmaß des zytopathischen

-5-

Effektes unter Einwirkung der Substanzen wurde in Relation zu dem der unbehandelten Kontrollen gesetzt. In einer 2. Testvariante wurden Zellen, Viren und die zu testenden Substanzen gleichzeitig inkubiert.

Zytotoxische Wirkungen auf die Vero-Zellen wurden erst bei Konzentrationen $> 100 \mu\text{M}$ gefunden.

Tabelle

Hemmung der Vermehrung des Adenovirus Typ 5 durch einige der erfindungsgemäßen Verbindungen.

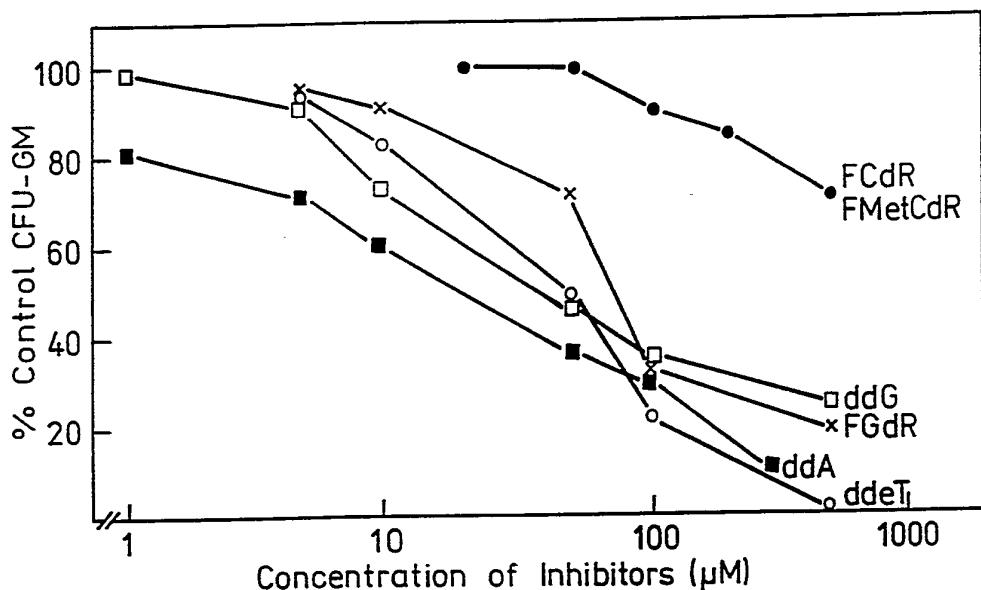
Wiedergegeben sind die Konzentrationen (10^{-x}M), die nach einer 4-tägigen Inkubation zu einer 50% Hemmung des zytopathischen Effektes führen (ID_{50}).

Verbindung	$\text{ID}_{50}; 10^{-x}\text{M}$	
	Test 1	Test 2
2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxythymidin	5,5	5,7
2',3'-Didesoxycytidin	5,4	5,5
2',3'-Didesoxy-3'-fluor-cytidin	4,3	4,5
2',3'-Didesoxy-3'-fluor-5-methylcytidin	4,6	4,9
2',3'-Didesoxyadenosin	4,5	4,4
2',3'-Didesoxyguanosin	4,5	4,6
2',3'-Didesoxy-3'-fluor-guanosin	5,4	5,7

-6-

b) Zytotoxizität der Nucleosidanaloge

Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung der Verbindungen beim Menschen wurden ihre möglichen antiproliferativen Wirkungen außerdem auf die blutbildenden Stammzellen des Knochenmarks untersucht und damit auf diejenigen Zellen, die sich als besonders empfindlich gegenüber antiproliferativen Nebenwirkungen von Virostatika erwiesen haben (z.B. des Azidothymidins). In diesem Test wurde die Koloniebildung von Zellen des Knochenmarks (CFU-GM) der Maus durch 2',3'-Didesoxy-3'-fluorcytidin und 2',3'-Didesoxy-3'-fluor-5-methylcytidin so gut wie nicht beeinträchtigt. Die konzentrationsabhängige Wirkung weiterer Verbindungen auf die Koloniebildung von CFU-GM der Maus ist aus der Abbildung zu ersehen.



Abbildung

Die Wirkung modifizierter Nucleoside auf die Koloniebildung von Knochenmarkzellen der Maus (CFU-GM). Abkürzungen: FCdR = 2',3'-Didesoxy-3'-fluorcytidin; FMetCdR = 2',3'-Didesoxy-3'-fluor-5-methylcytidin; ddG = 2',3'-Didesoxyguanosin; FGdR = 2',3'-Didesoxy-3'-fluorguanosin; ddA = 2',3'-Didesoxyadenosin; ddeT = 2',3'-Didehydro-2'-3'-didesoxythymidin.

Nachstehend wird die Erfindung an Beispielen näher erläutert, die die Erfindung jedoch nicht beschränken sollen.

Beispiel 1

1-(2',3'-Didesoxy-3'-fluor-β-D-ribofuranosyl)cytosin
(2',3'-Didesoxy-3'-fluorcytidin)

Die Verbindung wird nach G. Kowollik et al., J. Prakt. Chem. 1973, 315, 895-900, gewonnen.
F. 230°C (Zers.) (Ethanol).

Beispiel 2

1-(2',3'-Didesoxy-β-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)adenin
(2',3'-Didesoxyadenosin)

Aus Adenosin wird nach M. M. Mansuri et al., J. Org. Chem. 1989, 54, 4780-4785, die Titelverbindung erhalten.
F. 191 - 193°C.

Beispiel 3

2',3'-Didesoxyguanosin

N^2 -Isobutyryl-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyguanosin (C.K CHU et al., J. Org. Chem. 1989, 54, 2217-2225) wird in Ethanol mit Palladium/Kohle (10%) hydrogenolysiert und mit Ammoniak/Methanol (gesättigt bei 0°C) behandelt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand an Celite säulenchromatographisch mit der oberen Phase des Systems Essigester/i-Propanol/Wasser (4/1/2) als Elutionsmittel gereinigt. Aus den entsprechenden Fraktionen wird 2',3'-Didesoxyguanosin isoliert.

F. > 250°C.

Beispiel 4

9-(2',3'-Didesoxy-3'-fluor-β-D-ribofuranosyl)-6-thioguanin
(2',3'-Didesoxy-3'-fluor-6-thioguanosin)

200 mg (0,7 mmol) 1-(5-O-Acetyl-2,3-didesoxy-3-fluor-β-D-ribo-furanosyl)thymin werden in 15 ml Acetonitril mit 203 mg (0,5 mmol) N^2 -Palmitoyl-6-thioguanin und 1 ml (4,06 mmol)

Bis-trimethylsilylacetamid für 30 min unter Rückfluß erhitzt. Anschließend werden 0,06 ml Trifluormethansulfansäuretrimethylsilylester hinzugegeben und die Lösung wird für weitere 4 Std. zum Sieden erhitzt. Die abgekühlte Lösung wird in 500 ml Ethanol/ wässrigem Ammoniak, 4:1 (V/V) für 10 Std. aufbewahrt. Nach dem Vertreiben des Lösungsmittels i.Vak. verbleibt ein Rückstand, der an Kieselgel (200 g Kieselgel 40, 0,63-0,2 mm) mit 0,3 l Chloroform, 3 l Chloroform (2% bzw. 3% Methanol) und 1,7 l (10% Methanol) als Elutionsmittel säulenchromatographisch getrennt wird.

Aus den entsprechenden Fraktionen werden 22 mg der Titelverbindung erhalten.

F. > 290°C.

UV (Wasser): max 349,2 nm (ϵ 19100).

MS m/z (180°C, 70 eV): 285 (M^+).

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO/TMS): δ 11,97 (s, 1H, H-N1).
8,18 (s, 1H, H-8), 7,13 (dd, 1H, H-1'),
 $J_{1',2'} = 6,59$ Hz), 649 (s, 2H, NH_2), 5,28
(m, 1H, H-3'), $J_{\text{F},3'} = 54,1$ Hz), 5,02
(+, 1H, OH-5'), 4,76 (m, 1H, H-4', $J_{\text{F},4'} = 26,1$ Hz),
345 (m, 2H, H-5'), 3,37 - 3,55 (m, 2H, H-2'a, H-2'b).

Beispiel 5

9-(2',3'-Didesoxy-3'-fluor- β -D-ribofuranosyl)guanin

(2',3'-Didesoxy-3'-fluorguanosin)

Gemäß dem Beispiel 4 werden aus 200 mg (0,7 mmol) 1-(5-O-Acetyl-2,3-dideoxy-3-fluor- β -ribofuranosyl)thymin und 3 mmol N²-Palmitoylguanin (DD WP 209197, 21.5.1981; Chem. Abstr. 101, 171660 Y, 1984) nach säulenchromatographischer Trennung des Reaktionsgemisches 25 mg der Zielverbindung erhalten.

F. > 269°C.

MS m/z (300°C, 70 eV): 269 (M^+).

-9-

Beispiel 6

9-(3-Azido-2,3-didesoxy- β -D-ribofuranosyl)guanin

(2',3'-Didesoxy-3'-azidoguanosin)

Die Verbindung wird nach dem von M. Imazawa und F. Eckstein, J.Org.Chem. 1973, 43, 3044-3048, beschriebenen Verfahren dargestellt.

F. > 300°C.

Beispiel 7

2',3'-Didesoxycytidin

Aus N-Benzoyl-2'-desoxycytidin (G.S.TI, B.L. Gaffney and R.A. Jones, J.Am.Chem.Soc. 1982, 104, 1316-1319) wird das entsprechende 3',5'-Di-0-mesylderivat hergestellt. Über die 3',5'-Epoxy-Verbindung als Zwischenstufe wird in Eliminierungsreaktionen zunächst das 2',3'-ungesättigte Produkt erhalten, das durch Hydrogenolyse mit Palladium/Kohle (10%) in das 2',3'-Didesoxycytidin überführt wird.

F. 214°C.

Beispiel 8

(+)-2-Amino-1,9-dihydro-9[(1 α , 3 β , 4 α)-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl]-6-H-purin-6-on

Aus dem entsprechenden 2-Amino-6-chlorpurinderivat wird durch alkalische Hydrolyse die Titelverbindung erhalten (Y.F. Shealy, C.A. O'Dell, W.M. Shannon and G. Arnett, J. Med. Chem. 1984, 27, 1416-1421).

F. 243-247°C.

Beispiel 9

Injecti onslösung

Wirkstoff 10 mg

physiologische NaCl-Lösung auf 20 ml

Der Wirkstoff wird in physiologischer NaCl-Lösung unter geringem Schütteln aufgelöst. Diese Lösung wird unmittelbar vor der Applikation zubereitet.

-10-

Beispiel 10Tablettenformulierung

	mg/Tablette
Wirkstoff	100
Lactose	200
Stärke	50

Der Wirkstoff wird mit Lactose/Stärke zu Tabletten oder Drageekernen verpreßt, die mit einem magensaftresistenten Überzug entweder durch Überziehen der Tabletten mit z.B. Latex oder durch Dragierung der Drageekerne versehen werden.

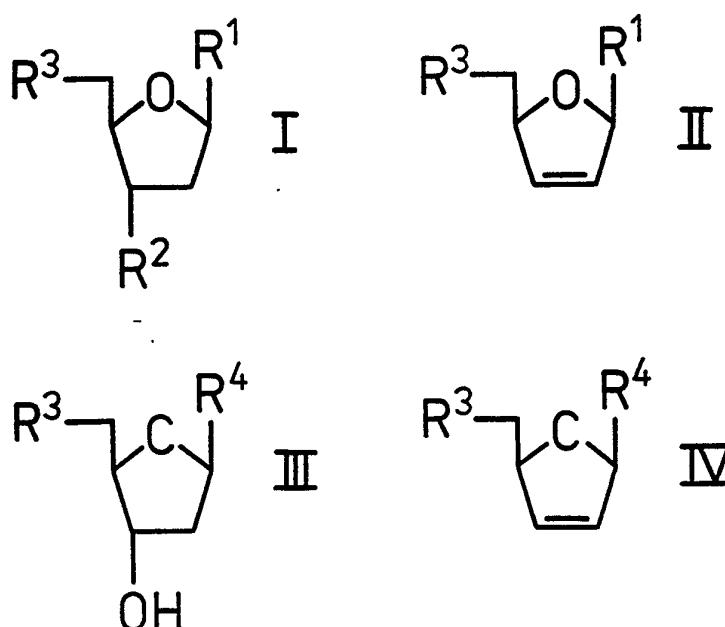
Beispiel 11Augentropfen

Wirkstoff	20 mg
Zephirol (Benzalkoniumchlorid)	1 mg
isotonischer Phosphatpuffer pH 7 zu	10 ml
In einem Teil des Puffers wird der Wirkstoff gelöst, Zephirol und der Rest der Pufferlösung werden zugesetzt. Die Lösung wird durch einen Sterilfilter filtriert und in eine sterile Augentropfenflasche gefüllt.	

-11-

Patentansprüche

1. Verwendung eines pharmazeutischen Mittels, das als Wirkstoff ein Pyrimidin- oder Purinnucleosid der allgemeinen Formel I, II, III oder IV



in der R^1 = Thymin, Cytosin, 5-Methylcytosin, 5-Ethylcytosin, 5-Formylcytosin, Adenin, 6-Monoalkyladenin (C_1-C_3), Guanin, 6-Chlorguanin, 6-Thioguanin, 6-Methoxyguanin, 2,6-Diaminopurin,

R^2 = H, F, N_3 ,

R^3 = OH, O-Acetyl, O-Palmitoyl, O-Alkoxy carbonyl, Phosphonat, Mono-, Di-, Triphosphat bzw. andere Precursorgruppen für die 5-Hydroxylgruppe,

R^4 = Guanin, 6-Chlorguanin, 6-Thioguanin, 6-Methoxyguanin, 2,6-Diaminopurin

mit folgender Einschränkung:

wenn R^1 = Thymin, dann ist $R^2 \neq F$

-12-

bedeuten

oder eine Kombination dieser Nucleoside zusammen mit üblichen Trägern und Verdünnungsmitteln enthält, zur Prophylaxe und/oder Behandlung von durch Adenoviren hervorgerufenen Infektionen.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff 2',3'-Didesoxycytidin(I); 2',3'-Didesoxyadenosin(I); 2',3'-Didesoxyguanosin(I); 2',3'-Didesoxy-3'-fluorcytidin(I); 2',3'-Didesoxy-3'-fluor-5-methylcytidin(I); 2',3'-Didesoxy-3'-fluorguanosin(I); 3'-Azido-2',3'-didesoxyguanosin(I); 2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxythymidin(II); 2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxyadenosin(II); carbozyklisches 2'-Desoxyguanosin(III) oder carbozyklisches 2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxyguanosin(IV) eingesetzt wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoffkombinationen 2',3'-Didesoxy-3'-fluorguanosin mit 2',3'-Didesoxycytidin bzw. 2',3'-Didesoxyadenosin mit 2',3'-Didesoxy-3'-fluorcytidin eingesetzt werden.
4. Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formel I, II, III und IV nach den Ansprüchen 1 bis 3 zur Herstellung eines pharmazeutischen Mittels zur Prophylaxe und/oder Behandlung von durch Adenoviren verursachten Infektionen.
5. Pharmazeutisches Mittel enthaltend eine oder mehrere Verbindungen der allgemeinen Formeln I, II, III oder IV nach den Ansprüchen 1 bis 3 als für die i.v. Injektion oder Infusion geeignetes Mittel als peroral applizierbares Mittel oder als Augenmittel ggf. zusammen mit pharmazeutisch üblichen Trägern und/oder Hilfsstoffen.
6. Pharmazeutisches Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Augenmittel in Form von Augentropfen, Augensalbe, Creme oder einer Suspension vorliegen.