

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 297 650 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 07 H 19/173
A 61 K 31/52

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 07 H / 343 871 1
(31) 8920534-8

(22) 07.09.90
(32) 11.09.89

(44) 16.01.92
(33) GB

(71) siehe (73)

(72) Tisdale, Sylvia M., GB; van Tuttle, Joel, US; Slater, Martin J., GB; Daluge, Susan M., US; Miller, Wayne H., US; Krenitsky, Thomas A., US; Koszalka, George W., US

(73) THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED, Unicorn House, 160 Euston Road, London NW1 2BP, GB

(74) Hübner, Neumann, Radwer, Rechtsanwalt und Patentanwälte, Frankfurter Allee 286, O - 1130 Berlin, DE

(54) **Verfahren zur Herstellung von Fluor-substituierten Purin-Nucleosiden und sie enthaltender pharmazeutischer Zubereitungen**

(55) 2'-Fluor-substituierte Purinnucleoside; pharmazeutische Zubereitungen; medizinische Therapie; infektiöse Erkrankungen; Influenza-Virus-Infektion; respiratorische synzytiale Infektion; Verwendung

(57) Die Erfindung betrifft 2'-Fluor-substituierte Purinnucleoside und sie enthaltender pharmazeutischer Zubereitungen. Sie finden Verwendung in der medizinischen Therapie, insbesondere für die Behandlung infektiöser Erkrankungen einschließlich Influenza-Virus-Infektionen und respiratorischen synzytialen Infektionen.

ISSN 0433-6461

29 Seiten

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel (I)



in der

Y H oder NH₂ bedeutet;

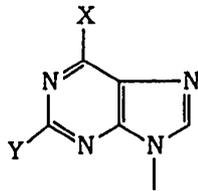
X eine Gruppe der Formel –NR³R⁴, worin R³ und R⁴, die gleichartig oder verschieden sein können, jeweils Wasserstoffatome, C₁₋₆-Alkylgruppen, C₃₋₇-Alkenylgruppen oder C₃₋₇-Cycloalkylgruppen, welche Gruppen gegebenenfalls durch ein oder mehrere Halogenatome substituiert sein können, darstellen, oder X eine Gruppe der Formel Z–R⁵, worin Z ein Sauerstoffatom oder ein Schwefelatom darstellt und R⁵ die gleichen besitzt wie R³, oder X ein Halogenatom oder ein Wasserstoffatom bedeutet; und

R¹ und R², die gleichartig oder verschieden sein können:

- Hydroxylgruppen;
- Gruppen der Formel –OCOR⁶H, worin R⁶ eine zweiwertige Gruppe darstellt, die eine geradkettige oder verzweigte C₁₋₆-Alkylengruppe, C₂₋₆-Alkenylengruppe oder C₃₋₇-Cycloalkylengruppe ist, welche Gruppen jeweils durch eine oder mehrere Hydroxylgruppen substituiert sein können;
- Gruppen der Formel –OCO₂R⁷H, worin R⁷ eine kovalente Bindung darstellt oder die Bedeutung von R⁶ besitzt;
- Gruppen der Formel –OCOR⁶–COOR⁸, worin R⁶ die oben angegebenen Bedeutungen besitzt und R⁸ aus Wasserstoffatomen und geradkettigen oder verzweigten C₁₋₆-Alkyl- oder C₁₋₆-Alkenylgruppen, die jeweils durch eine oder mehrere Hydroxylgruppen substituiert sein können, ausgewählt ist;
- Gruppen der Formel –OCOR⁷–Z–Ar, worin R⁷ die oben genannten Bedeutungen besitzt, Z entweder eine kovalente Bindung oder ein Sauerstoffatom darstellt und Ar einen aromatischen Ring bedeutet, der unsubstituiert oder durch ein oder mehrere Halogenatome, C₁₋₆-Alkylgruppen oder C₁₋₆-Alkoxygruppen substituiert ist;
- Gruppen der Formel –OR⁶H, worin R⁶ die oben angegebenen Bedeutungen besitzt;
- Gruppen der Formel –OR⁶–Z–Ar, worin R⁶, Z und Ar die oben angegebenen Bedeutungen besitzen;
- Gruppen der Formel –OCOCHR⁹NR¹⁰R¹¹, worin R¹⁰ und R¹¹ die Bedeutungen von R⁸ besitzen und R⁹
 - ein Wasserstoffatom,
 - eine geradkettige oder verzweigte C₁₋₄-Alkylgruppe, gegebenenfalls durch eine oder mehrere Hydroxylgruppen, Mercaptogruppen, C₁₋₃-Alkoxygruppen oder C₁₋₃-Alkylthiogruppen substituiert ist;
 - eine Gruppe der Formel R¹²–A, worin R¹² eine C₁₋₄-Alkylengruppe darstellt, die gegebenenfalls durch eine oder mehrere Hydroxylgruppen substituiert ist, und A eine Gruppe der Formel –COOH, –CONH₂, –NH₂ oder –NH–C(NH)NH₂ darstellt oder A ein 4- bis 11gliedriges aromatisches oder nichtaromatisches, cyclisches oder heterocyclisches Ringsystem mit 3 bis 10 Kohlenstoffatomen und 0, 1, 2 oder 3 Ringstickstoffatomen, wobei die Kohlenstoffatome und/oder Stickstoffatome des Ringes gegebenenfalls durch eine oder mehrere Hydroxylgruppen substituiert sind, darstellt, bedeutet;

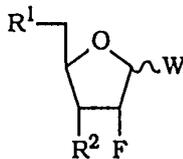
- Gruppen der Formel $-\text{OCO}-\text{R}^{13}$, worin R^{13} einen 4- bis 7gliedrigen heterocyclischen Ring, der 3 bis 6 Kohlenstoffatome und 0, 1 oder 2 Stickstoffatome aufweist, darstellt, wobei die Kohlenstoffatome und/oder Stickstoffatome des Ringes gegebenenfalls durch eine oder mehrere Hydroxylgruppen substituiert sind; oder
- Mono-, Di- oder Triphosphatestergruppen bedeuten;

und ihrer pharmazeutischen annehmbaren Salze, dadurch gekennzeichnet, daß man entweder (A) eine Purinbase der Formel PuH, worin Pu den Purinrest der folgenden Formel



(Pu)

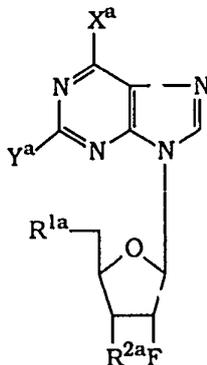
darstellt (worin X und Y die oben angegebenen Bedeutungen besitzen), oder ein Salz davon mit einer Verbindung der Formel (II)



(II)

in der R^1 und R^2 die oben angegebenen Bedeutungen besitzen und W entweder einen Phosphatester oder ein Salz davon oder ein von Pu verschiedener Purin- oder Pyrimidin-Rest bedeutet, zur Bildung einer Verbindung der Formel (I) umsetzt; oder

(B) eine Verbindung der Formel (III)



(III)

(in der X^a , Y^a , R^{1a} bzw. R^{2a} die Bedeutungen der obigen Gruppen X, Y, R^1 bzw. R^2 oder eines Vorläufers davon besitzen, wobei eine geschützte Form einer solchen Gruppe, die mindestens eine der Gruppen X, Y, R^1 und R^2 ergibt, eine solche Vorläuferform darstellt) mit einem Mittel umsetzt, welches dazu geeignet ist, die Vorläuferform der Gruppe(n) in die gewünschte Gruppe(n) umzuwandeln;

und anschließend oder gleichzeitig damit gegebenenfalls eine oder mehrere der folgenden Umwandlungen bewirkt:

(i) Umsetzen einer Verbindung der Formel (I), in der mindestens eine der Gruppen R^1 und R^2 eine Hydroxylgruppe darstellt, mit einem Mittel, welches dazu dient, diese Hydroxylgruppe in eine alternative Gruppe der Bedeutungen von R^1 und/oder R^2 umzuwandeln,

(ii) Umsetzen einer Verbindung der Formel (I), in der R^1 und/oder R^2 keine Hydroxylgruppen darstellen, mit einem Mittel, welches diese Gruppen R^1 und/oder R^2 in eine Hydroxylgruppe umwandelt.

2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung einer Verbindung der Formel (I) worin R^1 und R^2 jeweils beide OH-Gruppe darstellen oder R^1 ein Monophosphatrest ist und R^2 eine OH-Gruppe, Y H oder NH_2 und X eine Gruppe der Formel $-\text{NR}^3\text{R}^4$, worin R^3 und R^4 gleichartig oder verschieden sein können, Wasserstoffatome oder C_{1-6} -Alkylgruppen darstellen oder X eine Gruppe der Formel $\text{Z}-\text{R}^5$, worin Z

- O oder S und R⁵ eine C₁₋₆-Alkylgruppe darstellen, oder X ein Halogenatom oder ein Wasserstoffatom bedeuten, sowie der pharmazeutisch annehmbaren Salze davon.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung einer Verbindung der Formel (I), in der R¹ und R² jeweils OH-Gruppen, Y NH₂ und X H, OH, NH₂ oder Z-R⁵, wobei Z O und R⁵ eine C₁₋₆-Alkylgruppe darstellen, bedeuten, und der pharmazeutisch annehmbaren Salze davon.
 4. Verfahren zur Herstellung von 2,6-Diamino-9-(2-deoxy-fluor-β-D-ribofuranosyl)-9H-purin und der pharmazeutisch annehmbaren Salze davon.
 5. Verfahren zur Herstellung von 2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-9H-purin und der pharmazeutisch annehmbaren Salze davon.
 6. Verfahren zur Herstellung von 2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-6-methoxy-9H-purin und der pharmazeutisch annehmbaren Salze davon.
 7. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, enthaltend eine Verbindung der Formel (I)



(worin X und Y die oben angegebenen Bedeutungen besitzen) oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon, dadurch gekennzeichnet, daß man die Verbindung mit Hilfe eines Verfahrens herstellt, welches darin besteht, entweder

(A) eine Purinbase der Formel PuH, worin Pu den Purinrest der folgenden Formel

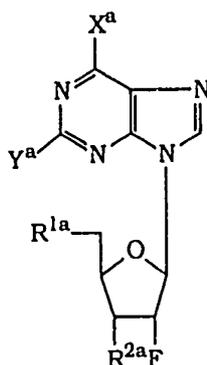


darstellt (worin X und Y die oben angegebenen Bedeutungen besitzen), oder ein Salz davon mit einer Verbindung der Formel (II)



in der R¹ und R² die oben angegebenen Bedeutungen besitzen und W entweder einen Phosphatester oder ein Salz davon oder ein von Pu verschiedener Purin- oder Pyrimidin-Rest bedeutet, zur Bildung einer Verbindung der Formel (I) umsetzt; oder

(B) eine Verbindung der Formel (III)



(III)

(in der X^a, Y^a, R^{1a} bzw. R^{2a} die Bedeutungen der obigen Gruppen X, Y, R¹ bzw. R² oder eines Vorläufers davon besitzen, wobei eine geschützte Form einer solchen Gruppe, die mindestens eine der Gruppen X, Y, R¹ und R² ergibt, eine solche Vorläuferform darstellt) mit einem Mittel umgesetzt, welches dazu geeignet ist, die Vorläuferform der Gruppe(n) in die gewünschte Gruppe(n) umzuwandeln;

und anschließend oder gleichzeitig damit gegebenenfalls eine oder mehrere der folgenden Umwandlungen bewirkt:

- (i) Umsetzen einer Verbindung der Formel (I), in der mindestens eine der Gruppen R¹ und R² eine Hydroxylgruppe darstellt, mit einem Mittel, welches dazu dient, diese Hydroxylgruppe in eine alternative Gruppe der Bedeutungen von R¹ und/oder R² umzuwandeln,
- (ii) Umsetzen einer Verbindung der Formel (I), in der R¹ und/oder R² keine Hydroxylgruppen darstellen, mit einem Mittel, welches diese Gruppen R¹ und/oder R² in eine Hydroxylgruppe umwandelt,

und Vermischen der enthaltenen Verbindung der Formel (I) mit einem oder mehreren pharmazeutisch annehmbaren Trägermaterialien oder Hilfsstoffen für die pharmazeutische Zubereitung.

Die Erfindung betrifft chemische Verbindungen mit anti-infektiöser Aktivität, Verfahren zu ihrer Herstellung und diese enthaltende Zusammensetzungen sowie deren Verwendung bei der Behandlung parasitärer und viraler Erkrankungen. Insbesondere betrifft die Erfindung 2'-Deoxy-2'-fluor-ribonucleoside und deren Derivate.

Auf dem Gebiet der antiviralen Chemotherapie gibt es keine Arzneimittel, die das Virus *per se* wirksam bekämpfen aufgrund der Schwierigkeit, das Virus anzugreifen während nicht infizierte Wirtszellen nicht angegriffen werden sollen. Kürzlich wurde festgestellt, daß gewisse Stufen in dem Lebenszyklus des Virus, die von Spezies zu Spezies variieren, durch das Virus selbst spezifiziert sind. Jedoch haben sich wirksame Behandlungen aufgrund der hohen Ähnlichkeit zwischen viralen und Wirtsfunktionen als schwierig aufzufinden erwiesen.

Eine Gruppe viraler Pathogene, die die Menschen seit Alters her heimsuchen und die verantwortlich für den Tod von Millionen von Menschen über Jahrhunderte hinweg sind, sind die Influenzaviren. Diese Viren, insbesondere Influenza A und B, verbleiben heutzutage weltweit eine der hauptsächlichen Ursachen für akute Atemwegserkrankungen.

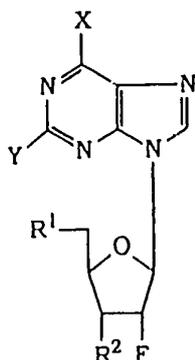
Influenzaviren sind Mitglieder der Familie negativer Strangviren Orthomyxoviridae. Ein weiterer negativer Strangvirus mit wichtigen Auswirkungen auf die Gesundheit ist das Respiratory-Syncytial-Virus (RSV), das ein Pneumovirus, einen Genus der Familie Paramyxoviridae, darstellt. RSV ist die hauptsächliche Ursache für eine Erkrankung im niedrigen Respirationstrakt während des Säuglingsalters und der Kindheit.

Für die Behandlung viraler und parasitärer Erkrankungen wurde früher der Einsatz fluorierter Nucleoside vorgeschlagen.

Beispielsweise offenbart die EP-A-O 287.313 in der 2'-Stellung mit Fluor substituierte 2',3'-Dideoxynucleoside für die Verwendung bei der Behandlung von Viren, welche menschliche Immunschwäche erzeugen. Die EP-A-O 219.829 offenbart 2'-Deoxy-2'-fluor-β-d-arabino-furanosylnucleoside zur Verwendung als antiparasitäre Mittel, insbesondere gegen Leishmaniasis. Verfahren zur Herstellung bestimmter 2'-Fluor-2'-deoxy-ribonucleoside wurden durch Uesugi et al. (Nucleosides and Nucleotides 2, 373-, 1983) und Ikehara et al. (Chem. Pharm. Bull. 29, 1034-, 1981) beschrieben.

Es wurde nun gefunden, daß Verbindungen gemäß der Formel (I) und deren pharmazeutisch annehmbaren Salze anti-infektiöse Mittel, insbesondere gegen Viren sind. Beispielsweise sind Verbindungen gemäß Formel (I) aktiv gegen das Influenzavirus, insbesondere gegen Influenza A und B und RSV-Infektionen und gegen gewisse Protozoa, beispielsweise *Trichomonas vaginalis* und *Giardia lamblia*.

Hergestellt werden Verbindungen der Formel (I):



(I)

in der

Y H oder NH_2 bedeutet;

X eine Gruppe der Formel $-\text{NR}^3\text{R}^4$, worin R^3 und R^4 , die gleichartig oder verschieden sein können, jeweils Wasserstoffatome, C_{1-6} -Alkylgruppen, C_{3-7} -Alkenylgruppen oder C_{3-7} -Cycloalkylgruppen, welche Gruppen gegebenenfalls durch ein oder mehrere Halogenatome substituiert sein können, darstellen, oder X eine Gruppe der Formel $-\text{Z}-\text{R}^5$, worin Z ein Sauerstoffatom oder ein Schwefelatom darstellt und R^5 die gleichen Bedeutungen besitzt wie R^3 , oder X ein Halogenatom oder ein Wasserstoffatom bedeutet; und

R^1 und R^2 , die gleichartig oder verschieden sein können:

- Hydroxylgruppen;
- Gruppen der Formel $-\text{OCOR}^6\text{H}$, worin R^6 eine zweiwertige Gruppe darstellt, die eine geradkettige oder verzweigte C_{1-6} -Alkylengruppe, C_{2-6} -Alkenylengruppe oder C_{3-7} -Cycloalkylengruppe ist, welche Gruppen jeweils durch eine oder mehrere Hydroxylgruppen substituiert sein können;
- Gruppen der Formel $-\text{OCO}_2\text{R}^7\text{H}$, worin R^7 eine kovalente Bindung darstellt oder die Bedeutung von R^6 besitzt;
- Gruppen der Formel $-\text{OCOR}^6-\text{COOR}^8$, worin R^8 die oben angegebenen Bedeutungen besitzt und R^6 aus Wasserstoffatomen und geradkettigen oder verzweigten C_{1-6} -Alkyl- oder C_{1-6} -Alkenylgruppen, die jeweils durch eine oder mehrere Hydroxylgruppen substituiert sein können, ausgewählt ist;
- Gruppen der Formel $-\text{OCOR}^7-\text{Z}-\text{Ar}$, worin R^7 die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, Z entweder eine kovalente Bindung oder ein Sauerstoffatom darstellt und Ar einen aromatischen Ring bedeutet, z. B. einen monocyclischen Arylring (Phenyl-), oder einen Heteroarylring (Pyridin-) der unsubstituiert oder durch ein oder mehrere Halogenatome, C_{1-6} -Alkylgruppen oder C_{1-6} -Alkoxygruppen substituiert ist;
- Gruppen der Formel $-\text{OR}^6\text{H}$, worin R^6 die oben angegebenen Bedeutungen besitzt;
- Gruppen der Formel $-\text{OR}^6-\text{Z}-\text{Ar}$, worin R^6 , Z und Ar die oben angegebenen Bedeutungen besitzen;
- Gruppen der Formel $-\text{OCOCHR}^9\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$, worin R^{10} und R^{11} die Bedeutungen von R^8 besitzen und R^9
 - ein Wasserstoffatom.
 - eine geradkettige oder verzweigte C_{1-4} -Alkylgruppe, gegebenenfalls durch eine oder mehrere Hydroxylgruppen, Mercaptogruppen, C_{1-3} -Alkoxygruppen oder C_{1-3} -Alkylthiogruppen substituiert;
 - eine Gruppe der Formel $\text{R}^{12}-\text{A}$, worin R^{12} eine C_{1-4} -Alkylengruppe darstellt, die gegebenenfalls durch eine oder mehrere Hydroxylgruppen substituiert ist, und A eine Gruppe der Formel $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{NH}_2$ oder $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$ darstellt oder A ein 4- bis 11gliedriges aromatisches oder nichtaromatisches, cyclisches oder heterocyclisches Ringsystem mit 3 bis 10 Kohlenstoffatomen und 0, 1, 2 oder 3 Ringstickstoffatomen, wobei die Kohlenstoffatome und/oder Stickstoffatome des Ringes gegebenenfalls durch eine oder mehrere Hydroxylgruppen substituiert sind, darstellt, bedeutet;
- Gruppen der Formel $-\text{OCO}-\text{R}^{13}$, worin R^{13} einen 4- bis 7gliedrigen heterocyclischen Ring, der 3 bis 6 Kohlenstoffatome und 0, 1 oder 2 Stickstoffatome aufweist darstellt, wobei die Kohlenstoffatome und/oder Stickstoffatome des Ringes gegebenenfalls durch eine oder mehrere Hydroxylgruppen substituiert sind; oder
- Mono-, Di- oder Triphosphatestergruppen bedeuten:

Die Erfindung umfaßt weiterhin Verbindungen der Formel (I) und deren Salze für die Verwendung in der medizinischen Therapie. Bevorzugte Estergruppen der Formel $-\text{OCOCHR}^9\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ und $-\text{OCO}-\text{R}^{13}$ sind Ester der natürlich auftretenden α -Aminosäuren, die durch obige Definition eingeschlossen sind. Insbesondere sind Estergruppen der Formel $-\text{OCOCHR}^9\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ solche, worin R^9 eine C_{1-4} -Alkylgruppe und R^{10} und R^{11} beide Wasserstoff sind, beispielsweise Valin oder Alanin.

Die Verbindungen gemäß Formel (I) können in verschiedenen tautomeren Formen vorliegen, und falls X eine Gruppe $-\text{OH}$ ist, kann es ebenso eine Oxogruppe repräsentieren. Verbindungen der Formel (I) und ihre Salze können auch in α - oder β -anomeren Formen auftreten. Die Erfindung umfaßt daher jedes der individuellen α - und β -Anomeren der Verbindungen der Formel (I) und deren Mischungen.

Die Verbindungen der Formel (I) und ihre pharmazeutisch annehmbaren Salze werden im folgenden als erfindungsgemäße Verbindungen bezeichnet. Der Ausdruck „aktiver Bestandteil“, wie er hiernach verwendet wird, trifft eine erfindungsgemäße Verbindung, es sei denn der Kontext erfordert anderes.

Die Aktivität der aktiven Bestandteile gegen Influenza A und B war früher nicht bekannt, und die Erfindung schafft auch pharmazeutische Zubereitungen, die eine Verbindung der Formel (I) oder deren pharmazeutisch annehmbares Salz umfaßt, das insbesondere nützlich ist, um das Wachstum von Influenza A oder B in Säugetieren oder Menschen zu inhibieren. Es werden daher feste Zubereitungen geschaffen, die den aktiven Bestandteil und einen festen Träger umfassen, oder es wird eine inhalierbare Zubereitung geschaffen, die den aktiven Bestandteil und einen inhalierbaren flüssigen Träger umfaßt.

Die Erfindung betrifft ferner:

- a) ein Verfahren zur Behandlung oder Prophylaxe einer viralen Infektion, insbesondere einer Influenzavirus- oder RSV-Infektion oder eine Protozoalinfektion, beispielsweise *Trichomonas vaginalis* oder *Giardia lamblia* in einem Wirt, beispielsweise einem Säugetier, einschließlich einem Menschen, sowie Mäusen, das die Behandlung des Säugetiers mit einer wirksamen, nicht toxischen Menge der erfindungsgemäßen Verbindung umfaßt.
- b) Die Verwendung einer erfindungsgemäßen Verbindung für die Herstellung eines Medikaments für die Behandlung oder Prophylaxe einer Infektion, einschließlich einer viralen Infektion, insbesondere einer Influenzavirus- oder RSV-Infektion oder einer Protozoalinfektion, beispielsweise der *Trichomonas vaginalis* oder *Giardia lamblia*.

Gewisse Verbindungen der Formel (I) und deren Salze sind neue Verbindungen, und derartige neue Verbindungen und Salze sind ein weiterer Aspekt der Erfindung. Die neuen Verbindungen sind solche, wie vorstehend für Formel (I) definiert mit Ausnahme solcher, bei denen R¹ und R² jedes Hydroxy bedeutet oder R¹ einen Mono-, Di- oder Tri-Phosphat-5'-Ester bedeutet und R² Hydroxy oder R¹ Hydroxy bedeutet und R² einen Mono-, Di- oder Tri-Phosphat-3'-ester und entweder (a) X OH und Y NH₂ oder H bedeutet oder (b) X bedeutet NH₂ und Y bedeutet H.

Bevorzugte Verbindungen gemäß der Erfindung umfassen solche, worin R¹ und R² entweder beide OH bedeuten oder R¹ ein Monophosphat und R² OH bedeutet, Y bedeutet H oder NH₂ und X stellt eine Gruppe -NR³R⁴ dar, worin R³ und R⁴, die gleich oder verschieden sein können, H, C₁₋₆-Alkyl repräsentiert, oder X bedeutet eine Gruppe Z-R⁵, worin Z O oder S bedeutet und R⁵ bedeutet C₁₋₆-Alkyl oder X repräsentiert ein Halogenatom oder ein Wasserstoffatom.

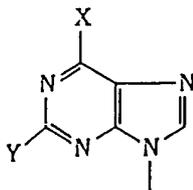
Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel (I) umfassen solche, worin R¹ und R² beide OH bedeuten, Y bedeutet NH₂ und X bedeutet H, OH, NH₂ oder Z-R⁵, wobei Z O bedeutet und R⁵ C₁₋₆-Alkyl bedeutet.

Beispiele bevorzugter Verbindungen der Formel (I) sind:

- (1) 2,6-Diamino-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-9H-purin
- (2) 2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-9H-purin
- (3) 9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl) guanin
- (4) 2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-6-methoxy-9H-purin

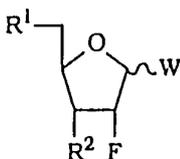
Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung neuer Verbindungen der Formel (I) und deren pharmazeutisch annehmbaren Salze, bei dem entweder:

(A) eine Purinbase der Formel PuH, worin Pu den Purinrest der folgenden Formel



(Pu)

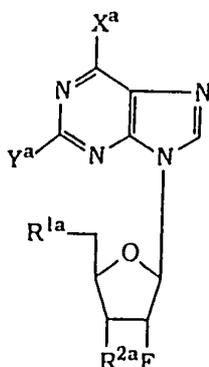
darstellt (worin X und Y die oben angegebenen Bedeutungen besitzen) oder ein Salz davon mit einer Verbindung der Formel (II)



(II)

in der R¹ und R² die oben angegebenen Bedeutungen besitzen und W entweder einen Phosphatester oder ein Salz davon oder ein von Pu verschiedener Purin- oder Pyrimidin-Rest bedeutet, zur Bildung einer Verbindung der Formel (I) umsetzt; oder

(B) eine Verbindung der Formel (III)



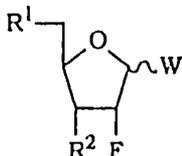
(III)

(in der X^a, Y^a, R^{1a} bzw. R^{2a} die Bedeutungen der obigen Gruppen X, Y, R¹ bzw. R² oder eines Vorläufers davon besitzen, wobei eine geschützte Form einer solchen Gruppe, die mindestens eine der Gruppen X, Y, R¹ und R² ergibt, eine solche Vorläuferform darstellt) mit einem Mittel umsetzt, welches dazu geeignet ist, die Vorläuferform der Gruppe(n) in die gewünschte Gruppe(n) umzuwandeln;

und anschließend oder gleichzeitig damit gegebenenfalls eine oder mehrere der folgenden Umwandlungen bewirkt:

- (i) Umsetzen einer Verbindung der Formel (I), in der mindestens eine der Gruppen R^1 und R^2 eine Hydroxylgruppe darstellt, mit einem Mittel, welches dazu dient, diese Hydroxylgruppe in eine alternative Gruppe der Bedeutungen von R^1 und/oder R^2 umzuwandeln.
- (ii) Umsetzen einer Verbindung der Formel (I), in der R^1 und/oder R^2 keine Hydroxylgruppen darstellen, mit einem Mittel, welches diese Gruppen R^1 und/oder R^2 in eine Hydroxylgruppe umwandelt.

Das Verfahren (A), das geeignet ist für die Herstellung von Verbindungen nach Formel (I), worin R^1 und R^2 beide Hydroxy bedeuten und Y H oder NH_2 bedeutet, kann enzymatisch bewirkt werden durch Umsetzen der Purinbase der Formel Pu, worin X und Y die vorstehend genannte Bedeutung haben, oder deren Salz, mit einer Verbindung der Formel (II)



(II)

worin R^1 und R^2 vorstehend genannte Bedeutung haben und W einen Phosphatester oder dessen Salz oder eine Purin- oder eine Pyrimidinhalbfte (eine andere als Pu) in Gegenwart von wenigstens einem Phosphorylaseenzym wie Purinnucleosidphosphorylase und Thymidinphosphorylase und eines anorganischen Phosphates oder deren Salz, oder ein Transferaseenzym, beispielsweise N-Deoxyribosyltransferase. Bei dieser Umsetzung ist bevorzugt, daß die Purin- oder Pyrimidinhalbfte in α -Stellung und der Phosphatester oder dessen Salz in β -Stellung stehen.

Die Purinbase der Formel PuH ist im Handel, beispielsweise von Pacific Chemical Laboratories oder Sigma Chemical Company, erhältlich oder ist durch den Fachmann bekannte herkömmliche Verfahren herstellbar oder aus der chemischen Literatur leicht zugänglich. Beispielsweise sind Purinbasen, bei denen der 2-Substituent Amino oder Wasserstoff und der 6-Substituent Amino oder Methylthio ist, im Handel erhältlich. Purine, bei denen der 2-Substituent Amino und der 6-Substituent eine Methylaminogruppe ist, sind nach dem Verfahren von Montgomery und Holum (J.A.C.S. 80: 404, 1958) herstellbar. Purine, worin der 2-Substituent eine Aminogruppe und der 6-Substituent eine Alkoxygruppe ist, beispielsweise eine Methoxygruppe, sind herstellbar nach dem Verfahren gemäß Balsiger und Montgomery (J. Org. Chem. 20: 1573, 1960).

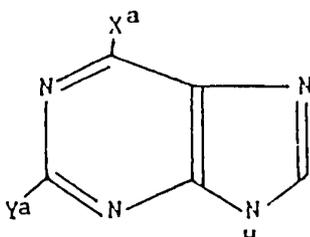
Verbindungen der Formel (II) sind durch den Fachmann gut bekannte Verfahren herstellbar oder leicht aus der chemischen Literatur entnehmbar. Beispielsweise ist 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil herstellbar nach dem Verfahren, das von Codington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) beschrieben ist. 9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin ist herstellbar nach dem Verfahren, das von S. Uesugi et al. (Nucleosides und Nucleotides 2, 373- , 1983).

Bezüglich des Verfahrens (B), das für die Herstellung von Verbindungen der Formel (I) geeignet ist, aus Verbindungen der Formel (III), worin R^{1a} und R^{2a} beide Hydroxy bedeuten, können die geschützten Gruppen X^a , Y^a , R^{1a} und R^{2a} der Verbindungen der Formel (III) geschützt werden mit herkömmlichen Schutzgruppen für Hydroxy- und Aminogruppen, wie Acylgruppen, beispielsweise Alkanoylgruppen wie eine Benzoylgruppe, oder Aroylgruppen, wie eine Acetylgruppe; Aralkylgruppen, wie beispielsweise eine Benzylgruppe; oder Trialkylsilylgruppen, wie eine tert-Butyldimethylsilylgruppe. Der besondere Typus der verwendeten Schutzgruppe hängt von der Natur der zu schützenden Gruppe ab.

Die Schutzgruppe ist nachträglich durch saure oder basische Hydrolyse, Hydrogenolyse oder enzymatisch abspaltbar. Acylgruppen werden durch basische Hydrolyse und Silylgruppen durch saure Hydrolyse oder durch ein Fluoridion abgespalten. Aralkylgruppen, wie Benzyl, sind durch katalytische Hydrogenolyse in Gegenwart eines Katalysators, wie Palladium auf Aktivkohle, vorteilhaft abspaltbar oder auf reduktiven Wege, beispielsweise mit einem Alkalimetall (Natrium) in einem geeigneten Lösungsmittel, wie in flüssigem Ammoniak. Es wurde gefunden, daß die Verwendung einer Benzylschutzgruppe insbesondere vorteilhaft für die Herstellung von Verbindungen der Formel (I) ist, worin X eine Hydroxy- oder Aminogruppe bedeutet.

Bei der Herstellung einer Verbindung der Formel (I), worin R^1 und/oder R^2 eine Gruppe $-OCOCHR^9NR^{10}R^{11}$ bedeuten, können in Übereinstimmung mit dem Verfahren (B) die Gruppen R^{1a} und/oder R^{2a} beispielsweise mit einer 9-Fluorenylmethoxy-carbonyl (Fmoc), tert-Butyloxycarbonyl (tBOC) oder Carbobenzyloxy (CBZ) geschützt werden, und die Schutzgruppen werden durch herkömmliche Mittel wieder abgespalten, um die Aminosäure $CHR^9NR^{10}R^{11}$ zu ergeben.

Die Ausgangsverbindung der Formel (III) ist herstellbar durch Umsetzen einer Purinbase der Formel (IV)



(IV)

worin X^a und Y^a vorstehend genannte Bedeutung haben; oder deren Salz, mit einem Pyrimidinnucleosid, enthaltend den geeigneten Zuckerrest, beispielsweise 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil in Gegenwart eines oder mehrerer Phosphorylaseenzyme, beispielsweise Purinnucleosidphosphorylase und Thymidinphosphorylase, oder eines Transferaseenzym, zum Beispiel N-Deoxyribosyltransferase.

Alternativ kann die Ausgangsverbindung der Formel (III) chemisch hergestellt werden durch Umsetzen einer Verbindung der Formel (IV), worin X^a und Y^a vorstehend genannte Bedeutung haben, oder eines silylierten Derivates davon, oder eines Salzes davon, mit einer Verbindung der Formel (II), worin R^1 und R^2 vorstehend genannte Bedeutung haben oder anderen geschützten

Formen der Hydroxygruppe und W eine geeignete Austrittsgruppe ist, beispielsweise ein Halogenatom, wie Chlor, eine Acylgruppe, wie Acetoxy, eine Alkoxygruppe, wie Methoxy, in Gegenwart eines Katalysators, wie Zinn (V) Chlorid oder Trimethylsilyltriflat in einem geeigneten Lösungsmittel, wie Acetonitril.

Purinbasen der Formel (IV) sind aus einer entsprechenden Purinbase herstellbar, worin der 6-Substituent eine geeignete Austrittsgruppe ist, beispielsweise ein Halogenatom, wie Chlor, durch nucleophile Verschiebung dieser Gruppe herstellbar. Eine derartige Purinbase der Formel (IV), worin X^6 eine Benzyloxygruppe bedeutet, ist herstellbar durch Behandlung des entsprechenden 6-Chlorpurins mit einem Alkohol, wie Benzylalkohol, in Gegenwart einer Base, beispielsweise Natriumhydrid, in einem geeigneten Lösungsmittel, wie Tetrahydrofuran (THF). Purinbasen der Formel (IV), worin X^6 eine Benzylaminogruppe ist, sind herstellbar durch Behandlung des entsprechenden 6-Chlorpurins mit einem Amin, beispielsweise mit Benzylamin in Gegenwart einer Base, beispielsweise einem Amin, wie Triethylamin, in einem geeigneten Lösungsmittel, wie Methanol. Derartige, als vorstehend genannte Ausgangsmaterialien verwendete Purinbasen sind im Handel erhältlich (Aldrich Chemical Company) oder sind durch Verfahren herstellbar, die dem Fachmann bekannt sind oder die aus der chemischen Literatur leicht entnehmbar sind.

Die bei der vorstehend genannten Herstellung der Verbindungen der Formel (III) verwendeten Pyrimidinnucleoside sind herstellbar durch Verfahren, die dem Fachmann gut bekannt sind oder die aus der chemischen Literatur leicht entnehmbar sind. Beispielsweise können 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)pyrimidine, wie 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil, nach dem Verfahren hergestellt werden, das durch Codington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) beschrieben ist.

Verbindungen der Formel (III) können erfindungsgemäße Verbindungen repräsentieren, so daß beispielsweise $X^6 - NR^3R^4$ bedeuten kann, worin R^3 und R^4 vorstehend genannte Bedeutung haben. Solche Verbindungen sind mit einem Deaminaseenzym, wie Adenosindeaminase, behandelbar und sind in eine Verbindung der Formel (I) umwandelbar, worin X eine Hydroxygruppe bedeutet.

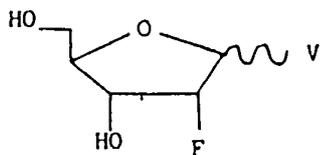
Eine Verbindung der Formel (I), worin R^1 und/oder R^2 eine Hydroxygruppe bedeutet, kann in einen entsprechenden pharmazeutisch annehmbaren Ester der Formel (I), wie vorstehend definiert, umgewandelt werden durch Umsetzung mit einem geeigneten Veresterungsmittel gemäß den im Stand der Technik bekannten Verfahren, beispielsweise nach dem Verfahren, das durch Martin et al., J. Pharm. Sci. (1987) 76, 180- , beschrieben ist. Daher kann für die Herstellung der vorstehend definierten Carbonsäureester die vorige Verbindung der Formel (I) umgesetzt werden mit einem Säureanhydrid oder Säurehalogenid, beispielsweise einem Chlorid entsprechend einer Carbonsäure der Formel $QCOOH$, worin Q eine Gruppe $-R^6H$, $-OR^7H$, $-R^6COOR^8$, $-R^7-Z-Ar$, $-CHR^9NR^{10}R^{11}$ oder $-R^{13}$ ist, worin R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{13} , Z und Ar vorstehend genannte Bedeutung haben, in Gegenwart einer geeigneten Base, wie Triethylamin. Alternativ hierzu kann die Säure $QCOOH$ umgesetzt werden mit einer Verbindung der Formel (I), worin R^1 und/oder R^2 eine Hydroxygruppe sind, in Gegenwart eines Kupplers, wie die Dicyclohexylcarbodiimid.

Das vorstehend genannte Ausgangsmaterial der Formel (II), worin R^1 und/oder R^2 eine Hydroxygruppe sind, kann mit einem Veresterungsmittel umgesetzt werden und die sich ergebende Verbindung mit der Purinbase der Formel PuH in Einklang mit dem Verfahren (A) umgesetzt werden.

Verbindungen gemäß der Erfindung, worin R^1 und/oder R^2 Mono-, Di- oder Tri-phosphatester, bedeuten, sind herstellbar aus Verbindungen der Formel (I), wenn R^1 und/oder R^2 Hydroxygruppen sind, mittels sukzessiver Phosphorylierung über die Mono-, Di- und Tri-phosphatderivate durch herkömmliche chemische Mittel oder durch enzymatische Mittel, beispielsweise unter Verwendung einer Nucleosidkinase oder Phosphotransferase in Gegenwart eines Nucleotidtriphosphats, beispielsweise ATP.

Eine Verbindung der Formel (I), worin R^1 und/oder R^2 eine Hydroxygruppe bedeutet, ist umwandelbar in einen entsprechenden pharmazeutisch annehmbaren Ether der Formel (I), wie vorstehend definiert, durch Umsetzung mit einem geeigneten Alkylierungsmittel auf herkömmliche Weise, beispielsweise mit einer Verbindung der Formel Q^1-Hal , worin Q^1 eine Gruppe $-R^6H$ oder $-R^6-Z-Ar$ bedeutet, worin R^6 und Ar vorstehend genannte Bedeutung haben und Hal ein Halogenatom, beispielsweise ein Jodatom ist.

Alternativ kann ein Alkylierungsmittel umgesetzt werden mit einem Zucker der Formel:



(worin V eine Alkoxygruppe, wie Methoxy, oder eine Acyloxygruppe, wie Acetoxy bedeutet), um einen entsprechenden 3'-, 5'- oder 3', 5'-Di-ether zu erhalten, (Bessodes M et al., Synthesis [1988] 560). Kondensation des Ethers mit einer geeigneten Purinbase der Formel PuH bildet ein Nucleodid, das anschließend gemäß Verfahren (B) von der Schutzgruppe befreit werden kann.

Ist das aus der ersten Stufe des vorstehend beschriebenen Verfahrens erhaltene Produkt ein Monoether, beispielsweise ein 5'-Ether, kann die andere Hydroxygruppe umgesetzt werden mit einer Carbonsäure oder deren Derivat, beispielsweise einem Säureanhydrid oder Säurehalogenid, beispielsweise einem Chlorid entsprechend zu einer Carbonsäure der Formel $QCOOH$, worin Q vorstehend genannte Bedeutung hat, um einen Mono-Ether-Mono-Ester-Zucker, beispielsweise einen 3'-Ester-5'-ether-Zucker zu erhalten. Dieser Zucker kann mit einem geeigneten Purin unter Bildung eines Nucleosids, wie oben erwähnt, oder nach dem Verfahren gemäß Codington J.F. et al., Carbohydr. Res. (1966) 1.455, kondensiert werden.

Erfindungsgemäße Verbindungen sind auch aus Verbindungen der Formel I', worin I' eine Verbindung entsprechend der Verbindung der Formel (I) darstellt, worin die Gruppen R^1 und R^2 durch andere Schutzgruppen ersetzt sind. Diese anderen Schutzgruppen können abgespalten oder umgesetzt werden, um die vorstehend definierten Gruppen R^1 und R^2 zu bilden.

Erfindungsgemäße Verbindungen, die auf dem vorstehend beschriebenen Weg hergestellt sind, sind verwendbar, um erfindungsgemäße Verbindungen zu erhalten, falls R^1 und/oder R^2 Hydroxygruppen sind mittels Abspalten der Ether- und/oder Ester-Schutzgruppen.

In Abhängigkeit von den Verfahrensbedingungen und den Ausgangsmaterialien wird das Endprodukt der Formel (I) entweder in Form der freien Base oder als Salz erhalten. Sowohl die freie Base und die Salze der Endprodukte sind im Rahmen dieser

Erfindung eingeschlossen. Daher können basische, neutrale oder gemischte Salze ebenso wie Hemi-, Mono-, Sesqui- oder Polyhydrate erhalten werden. Saure Additionssalze der neuen Verbindungen sind auf bekannte Weise transformierbar in freie Basen unter Verwendung basischer Agenzien, wie Alkali oder mittels Ionenaustausch. Die erhaltenen freien Basen können auch Salze mit organischen oder anorganischen Säuren bilden.

Erfindungsgemäße Salze, die für Therapie Zwecke verwendbar sind, umfassen pharmazeutisch annehmbare basische Salze, die von einer geeigneten Base, wie einem Alkalimetall (Natrium) oder Erdalkalimetall (Magnesium) abgeleitet sind oder Ammonium- und NX_4 -Salze (wobei X eine C_{1-4} -Alkylgruppe bedeutet).

Die Erfindung umfaßt folgende neue Zwischenverbindungen: 2-Amino-6-Benzylamino-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-9H-purin, 2-Amino-6-benzyloxy-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-9H-purin, 2-Amino-6-benzyloxy-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-9H-purin und 2-Amino-6-benzylthio-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-9H-purin.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können Rezipienten, wie Säugetieren, einschließlich Menschen, über irgendeinen geeigneten Behandlungsweg verabreicht werden, d. h. oral, pulmonal, rectal, nasal, topisch (einschließlich bukkal und sublingual), vaginal und parenteral (einschließlich subkutan, intramuskulär, intravenös, intradermal, intratekal und epidural). Der bevorzugte Verabreichungsweg hängt dabei von den Bedingungen des Rezipienten ab.

Die Menge des individuellen aktiven Bestandteils für die Behandlung einer viralen Infektion, einschl. Influenza- und RSV-Infektionen, hängt von einer Anzahl Faktoren wie der Schwere der zu behandelnden Krankheit und der Identität des Rezipienten ab und liegt im Ermessen des Arztes. Im allgemeinen liegt eine geeignete, wirksame Dosis im Bereich von 0,1 bis 100 mg pro Kilogramm Körpergewicht des Rezipienten pro Tag, vorzugsweise im Bereich von 5 bis 30 mg pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag und insbesondere im Bereich von 10 bis 20 mg pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag. Eine optimale Dosis liegt etwa bei 15 mg pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag (wenn nicht anders angegeben, sind alle Mengen des aktiven Bestandteils als Stammverbindung berechnet, d. h. für deren Salze und Ester müssen die Angaben proportional erhöht werden). Die wirksame Dosis kann gegebenenfalls in Form von 2, 3, 4 oder mehreren Sub-Dosen vorhanden sein, die über den Tag hinweg in geeigneten Intervallen verabreicht werden. Diese Sub-Dosen können in Einheitsdosen verabreicht werden, beispielsweise indem sie 1 bis 2000 mg, vorzugsweise 20 bis 500 mg, insbesondere 100 bis 400 mg aktiven Bestandteil pro Einheitsdosis enthalten.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können allein oder in Kombination mit anderen therapeutischen Mitteln verabreicht werden, zum Beispiel mit Amantidin oder mit Ribavirin, die als Anti-Influenzmittel bekannt sind oder mit einem Analgetikum, beispielsweise Codein, Paracetamol, Aspirin, Ibuprofen oder einem entzündungshemmenden Mittel, wie Indomethacin, Mefenaminsäure, Naproxen oder Ibuprofen oder mit anderen Mitteln, die in Kombination mit einer erfindungsgemäßen Verbindung eine vorteilhafte, therapeutische Wirkung ergeben.

Obwohl es möglich ist, die Verbindungen allein zu verabreichen, ist es bevorzugt, diese als pharmazeutische Zubereitungen darzubieten. Die Zubereitungen gemäß der Erfindung fassen wenigstens einen, wie vorstehend definierten, aktiven Bestandteil, zusammen mit einem oder mehreren pharmazeutisch annehmbaren Trägern und gegebenenfalls anderen therapeutischen Bestandteilen. Der (die) Träger müssen „annehmbar“ in dem Sinne sein, daß sie mit den anderen Bestandteilen der Zubereitung verträglich sind und dem Rezipienten nicht schaden.

Die Zubereitungen umfassen solche, die geeignet sind, um oral, pulmonal, rektal, nasal, topisch (einschließlich bukkal und sublingual), vaginal oder parenteral (einschließlich subkutan, intramuskulär, intravenös, intradermal, intrathekal und epidural) verabreicht zu werden. Die Zubereitungen können in Form von Einheitsdosen dargereicht werden und sind mittels bekannter Verfahren im Stand der Technik der Pharmazie herstellbar. Bei solchen Verfahren wird der aktive Bestandteil mit dem Träger in Verbindung gebracht, der einen oder mehrere Hilfsbestandteile bildet. Die Zubereitungen werden durch gleichförmiges und inniges Vereinigen des aktiven Bestandteils mit flüssigen Trägern oder fein verteilten festen Trägern oder beiden hergestellt und anschließend, falls es notwendig ist, wird das Produkt geformt.

Erfindungsgemäße Zubereitungen, die für eine orale Verabreichung geeignet sind, werden als diskrete Einheiten dargereicht, d. h. in Form von Kapseln, Kachets oder Tabletten, wobei jede eine vorher bestimmte Menge des aktiven Bestandteils enthält oder in Form eines Puders oder Granulats, in Form einer Lösung oder einer Suspension, in einer wäßrigen Flüssigkeit oder einer nicht wäßrigen Flüssigkeit oder als eine flüssige Öl-in-Wasser-Emulsion oder eine flüssige Wasser-in-Öl-Emulsion. Der aktive Bestandteil kann auch als Bolus oder Paste dargereicht werden oder kann innerhalb von Liposomen enthalten sein.

Eine Tablette ist herstellbar durch Kompression oder Formpressen, gegebenenfalls zusammen mit einem oder mehreren Hilfsbestandteilen. Gepreßte Tabletten werden in einer geeigneten Maschine durch Pressen des aktiven Bestandteiles in einer frei strömenden Form, wie bei Puder oder Granulaten, hergestellt, die gegebenenfalls mit einem Bindemittel (Povidon, Gelatine, Hydroxypropylmethylzellulose), Schmiermittel, inerten Verdünnungsmittel, Haltbarkeitsmittel, Zersetzungsmittel (Natriumstärkeglycolat, vernetztes Povidon, vernetzte Natriumcarboxymethylzellulose), oder einem oberflächenaktiven oder Dispergiemittel vermischt sind. Formgepreßte Tabletten werden in einer geeigneten Maschine durch Formpressen einer Mischung der pulverisierten Verbindung, die mit einem inerten, flüssigen Verdünnungsmittel befeuchtet sind, hergestellt. Die Tabletten sind gegebenenfalls beschichtet oder eingekerbt und können so zubereitet werden, daß sie eine langsame oder kontrollierte Freisetzung des aktiven Bestandteils bewirken, indem beispielsweise Hydroxypropylmethylzellulose in variierenden Verhältnissen verwendet wird, um das gewünschte Freisetzungsprofil zu schaffen.

Eine Kapsel ist herstellbar durch Füllen eines losen oder gepreßten Pulvers auf eine Füllmaschine, gegebenenfalls mit einem oder mehreren Additiven. Beispiele für geeignete Additive umfassen Bindemittel wie Povidon, Gelatine, Schmiermittel, inerte Verdünnungsmittel und Zersetzungsmittel für Tabletten. Kapseln können ebenso zubereitet werden, daß sie Pellets oder diskrete Sub-Einheiten enthalten, um eine langsame oder kontrollierte Freisetzung des Bestandteiles zu bewirken. Dies wird erreicht durch Extrudieren und Sphäronisieren einer nassen Mischung der Droge und einer Extrudierhilfe (Microkristalline Zellulose) und einem Verdünnungsmittel wie Lactose. Die kugelförmigen Körper können mit einer semipermeablen Membran (Ethylzellulose, Eudragit WE30D) beschichtet werden, um die Freisetzungseigenschaften zu erzeugen.

Bei der topischen Verabreichung werden die Zubereitungen vorzugsweise als Salbe oder Creme verabreicht, enthaltend den aktiven Bestandteil in einer Menge von beispielsweise 0,075 bis 20 Gew.-%, vorzugsweise 0,2 bis 15 Gew.-% und insbesondere von 0,5 bis 10 Gew.-%. Wenn die Zubereitung in einer Salbe erfolgt, werden die aktiven Bestandteile entweder auf einer paraffinischen oder einer wassermischbaren Salbenbase verwendet. Alternativ hierzu können die aktiven Bestandteile in einer Creme mit einer Öl-in-Wasser-Creme-Basis oder in Form einer Wasser-in-Öl-Basis zubereitet werden.

Falls gewünscht, umfaßt die wäßrige Phase der Cremebasis beispielsweise wenigstens 30 Gew.-% eines mehrwertigen Alkohols, d. h. einen Alkohol mit zwei oder mehreren Hydroxylgruppen, wie Propylen, Glycol, Butan-1,3-diol, Mannit, Sorbit, Glycerin und Polyethylenglycol und deren Mischungen. Die topischen Zubereitungen schließen wünschenswerterweise eine Verbindung mit ein, die eine Absorption oder Penetration des aktiven Bestandteils durch die Haut oder andere befallene Gebiete verstärkt. Beispiele solcher dermalen Penetrationsverstärker umfassen Dimethylsulphoxid und verwandte Analoge.

Die ölige Phase der Emulsionen gemäß der Erfindung wird von bekannten Bestandteilen auf bekannte Weise gebildet. Da diese Phase kaum einen Emulgator (Emulgiermittel) umfaßt, enthält es wunschgemäß eine Mischung von wenigstens einem Emulgator mit Fett oder Öl oder mit beiden. Vorzugsweise wird ein hydrophiler Emulgator zusammen mit einem als Stabilisator wirkendem lipophilen Emulgator verwendet. Bevorzugt wird sowohl Öl als auch Fett verwendet. Zusammen bilden der Emulgator (die Emulgatoren) mit oder ohne Stabilisator (Stabilisatoren) das emulgierende Wachs und das Wachs bildet mit dem Öl und/oder Fett die emulgierende Salbenbasis, die die ölige, dispergierte Phase der Cremezubereitungen bildet. Emulgatoren und Emulsionsstabilisatoren umfassen Tween 60, Span 80, Cetostearylalkohol, Myristylalkohol, Glycerinmonostearat und Natrium-Laurylsulphat.

Die Wahl geeigneter Öle oder Fette für die Zubereitungen hängt von den erwünschten kosmetischen Eigenschaften ab, da die Löslichkeit der aktiven Verbindung in den meisten Ölen für pharmazeutische Emulsionszubereitungen sehr niedrig ist. Daher sollte die Creme vorzugsweise ein nicht fettendes, nicht färbendes und waschbares Produkt mit geeigneter Konsistenz sein, um Verluste durch Tuben oder andere Behälter zu vermeiden. Geradkettige oder verzweigt-kettige mono- oder dibasische Alkylester, wie Diisoadipat, Isocetylstearat, Propylenglycoldiester der Kokosnuß, Fettsäuren, Isopropylmyristat, Decyloleat, Isopropylpalmitat, Butylstearat, 2-Ethylhexylpalmitat oder eine Mischung verzweigt-kettiger Ester, bekannt als Crodamol CAP, sind verwendbar, wobei die letzten drei aufgeführten Ester bevorzugt sind. Sie sind allein oder in Kombination in Abhängigkeit von den erwünschten Eigenschaften verwendbar. Alternativ hierzu sind Lipide mit hohem Schmelzpunkt, wie weißes Weichparaffin und/oder Flüssigparaffin oder andere Mineralöle verwendbar.

Geeignete Zubereitungen für die topische Verabreichung für die Augen umfassen Augentropfen, in denen der aktive Bestandteil gelöst oder in einem geeigneten Träger suspendiert ist, insbesondere ein wäßriges Lösungsmittel für den aktiven Bestandteil. Der aktive Bestandteil ist vorzugsweise in solchen Zubereitungen in einer Konzentration von 0,5 bis 20 Gew.-%, vorzugsweise 0,5 bis 10 Gew.-%, insbesondere etwa 1,5 Gew.-% vorhanden.

Geeignete Zubereitungen für die topische Verabreichung im Mund umfassen Pastillen, enthaltend den aktiven Bestandteil in einer Geschmacksbasis, üblicherweise Sucrose und Akazie oder Tragant; Pastillen umfassen den aktiven Bestandteil in einer inerten Basis; wie Gelatine und Glycerin oder Sucrose und Akazie; Mundwäschen beinhalten den aktiven Bestandteil in einem geeigneten flüssigen Träger.

Zubereitungen für die rectale Verabreichung werden als Suppositorien mit einer geeigneten Basis dargereicht und umfassen Kakaobutter oder höhere Fettalkohole (Hartwachs European Pharmacopeia) oder Triglyceride und gesättigte Fettsäuren (z. B. Witepsol).

Geeignete Zubereitungen für die nasale Verabreichung, bei denen der Träger ein Feststoff ist, umfassen ein grobes Pulver mit einer Partikelgröße im Bereich von 20–500 µm und die auf die Art und Weise wie Schnupftabak eingenommen wird, nämlich durch schnelle Inhalation durch die Nasenpassage aus einem nahe an die Nase gehaltenen Behälter Pulvers. Geeignete Zubereitungen für Nasensprays oder Nasentropfen, bei denen der Träger eine Flüssigkeit ist, umfassen wäßrige oder ölige Lösungen des aktiven Bestandteils.

Geeignete Zubereitungen für die Inhalation umfassen feine Partikelstäube oder Nebel, die freigesetzt werden durch verschiedene Mittel für abgemessene, druckbeaufschlagte Aerosoldosen, wie Zerstäuber oder Insufflatoren.

Bei der pulmonaren Verabreichung über den Mund liegt die Partikelgröße des Pulvers oder der Tröpfchen im Bereich von 0,5–10 µm, vorzugsweise 1–5 µm, um eine Abgabe in den Bronchialbaum zu sichern. Für die nasale Verabreichung ist eine Partikelgröße im Bereich von 1–500 µm bevorzugt, um eine Retention im Nasenraum zu sichern.

Inhalatoren mit abgemessener Dosis sind druckbeaufschlagte Aerosolspender, die eine Suspensions- oder Lösungszubereitung des aktiven Bestandteils in einem verflüssigten Treibmittel enthalten. Während der Anwendung geben diese Vorrichtungen ein abgemessenes Volumen von 10–150 µl durch eine Düse ab und erzeugen einen feinen Partikelnebel, der den aktiven Bestandteil enthält. Geeignete Treibmittel umfassen Propan und Butan, gewisse Chlorfluorkohlenwasserstoffverbindungen, bezeichnet als „CFS's“, z. B. Dichlordifluormethan, Trichlorfluormethan, Dichlortetrafluorethan oder deren Mischungen. Die Zubereitung kann zusätzlich Lösungsmittel enthalten, z. B. Ethanol, oberflächenaktive Mittel, wie Ölsäure oder Sorbittrioleat, Antioxidantien und/oder geeignete Geschmacksmittel.

Zerstäuber sind im Handel erwerbliche Vorrichtungen, die Lösungen oder Suspensionen des aktiven Bestandteils in einen therapeutischen Nebel überführen, entweder durch Beschleunigen eines komprimierten Gases wie Luft oder Sauerstoff durch eine enge Venturi-Öffnung (Düse) oder mittels Ultraschallbewegung. Geeignete Zubereitungen für die Verwendung in Zerstäubern bestehen aus dem aktiven Bestandteil in einem flüssigen Träger und umfassen bis 40 Gew.-% der Zubereitung, vorzugsweise weniger als 20 Gew.-%. Der Träger kann Wasser oder eine verdünnte alkoholische Flüssigkeit sein, die vorzugsweise mit der Körperflüssigkeit durch Zugabe von z. B. NaCl isotonisch gemacht wurde. Falls die Zubereitung nicht steril hergestellt wurde, umfassen wahlweise Additive Konservierungsmittel, z. B. Methylhydroxybenzoat, Antioxidantien, Geschmacksmittel leicht flüchtige Öle, Puffer und oberflächenaktive Stoffe. Geeignete Zubereitungen für die Verabreichung durch Insufflation umfassen feingemahlene Pulver, die durch einen Insufflator abgegeben werden oder die in den Nasenraum wie beim Schnupfen gelangen. Im Insufflator ist das Pulver in Kapseln oder Hüllen enthalten, die aus Gelatine oder Kunststoff hergestellt sind und die entweder durchstoßen sind oder die in situ geöffnet werden, und das Pulver wird entweder nach Inhalation durch die Vorrichtung abgegeben oder wird mittels einer manuell betätigten Pumpe abgegeben. Das in dem Insufflator verwendete Pulver besteht entweder nur aus dem aktiven Bestandteil oder aus einer Pulvermischung, umfassend den aktiven Bestandteil, ein geeignetes Pulververdünnungsmittel wie Laktose und gegebenenfalls ein oberflächenaktives Mittel. Der aktive Bestandteil umfaßt 0,1–100 Gew.-% der Zubereitung.

Druckbeaufschlagte Aerosolzubereitungen für die Inhalation sind vorzugsweise eingerichtet, daß jede abgemessene Dosis 0,05–5 mg einer erfindungsgemäßen Verbindung enthält. Auf ähnliche Weise sind Pulverzubereitungen für Insufflationen so eingerichtet, daß jede Einheitsdosis 0,5–50 mg enthält. Lösungen oder Suspensionen von Zubereitungen zum Zerstäuben sind

so eingerichtet, daß Dosen zwischen 1 und 1500 mg abgegeben werden. Die erfindungsgemäßen Verbindungen oder Zubereitungen können mittels dieser Vorrichtungen einmal oder mehrmals täglich mit einer oder mehreren Dosen, z. B. drei oder vier, je nach Gelegenheit, verabreicht werden.

Geeignete Zubereitungen für die vaginale Verabreichung werden als Pessare, Tampons, Cremes, Gele, Pasten, Schäume oder Sprays dargeboten und enthalten zusätzlich zu dem aktiven Bestandteil aus dem Stand der Technik bekannte Träger.

Geeignete Zubereitungen für die parenterale Verabreichung umfassen wäßrige und nichtwäßrige, sterile Injektionslösungen, die Antioxidantien, Puffer, bakterienhemmende Mittel und Gelöstes zur isotonischen Einstellung der Zubereitung mit dem Blut des Rezipienten enthalten; und wäßrige und nichtwäßrige sterile Suspensionen die Suspendiermittel und Verdickungsmittel und Liposome oder andere Mikropartikelsysteme enthalten, die so ausgestaltet sind, daß sie die Verbindung zu den Blutkomponenten eines oder mehrerer Organe befördern. Die Zubereitungen werden in Einheitsdosen- oder Multidosen-Behältern dargeboten, z. B. in abgedichteten Ampullen und Fläschchen und können in gefriergetrocknetem (lyophilisiertem) Zustand gelagert werden, wobei lediglich eine Zugabe eines sterilen, flüssigen Trägers, z. B. Wasser für Injektionszwecke kurz vor der Verwendung notwendig ist. Injektionslösungen und Suspensionen sind ohne Vorbereitung aus sterilen Pulvern, Granulaten und Tabletten der zuvor beschriebenen Art herstellbar. Zubereitungen mit bevorzugter Einheitsdosis sind solche, die eine Tagesdosis oder Einheit, eine tägliche Subdosis, wie zuvor beschrieben oder einen geeigneten Teil davon an aktivem Bestandteil enthalten. Zusätzlich zu den erfindungsgemäßen Bestandteilen können die Zubereitungen andere herkömmliche Mittel in Abhängigkeit von der Art der Zubereitung enthalten, so können z. B. für die orale Verabreichung Geschmacksmittel in der Zubereitung vorhanden sein.

Folgende Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern:

Beispiel 1

Herstellung von 9-(2-deoxy-3,5-di-O-propionyl-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin

Zu einer Lösung von 9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin (170 mg, 0,6 mmol), DMAP (4-Dimethylaminopyridin) (8 mg) und Triethylamin (0,41 ml, 5 eq.) in DMF (N,N-Dimethylformamid) (4 ml) wurde bei Raumtemperatur Propionsäureanhydrid (0,16 ml, 2,1 eq.) unter Rühren zugegeben. Nach 20 Stunden wurde Methanol (2 ml) zugegeben. Eine Stunde später wurde die Mischung *in vacuo* evaporiert und der Rückstand über SiO₂ unter Verwendung einer Flash-Technik chromatographiert. Die Eluierung mit CHCl₃/MeOH (10:1), anschließend (6:1), ergab die Titelverbindung als weißen Feststoff.

Schmelzpunkt: 198–200°C.

Analyse für 0,2 · Hydrat

berechnet: C 47,93; H 5,13; N 17,47
 gefunden: C 48,22; H 4,94; N 17,0

Beispiel 2

Herstellung von 9-(2-Deoxy-3,5-di-O-acetyl-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin und 9-(2-Deoxy-2-fluor-3,5-di-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-2-N-acetylguanin

Zu einer Lösung von 9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin (160 mg, 0,56 mmol), DMAP (8 mg) und Triethylamin (400 µm, 5 eq.) in DMF (4 ml) wurde Acetanhydrid (0,16 ml, 2,5 eq.) unter Rühren bei Raumtemperatur zugegeben. Nach 22 Stunden wurde die gelbe Lösung *in vacuo* evaporiert, mit Ethanol und Toluol coevaporiert und über SiO₂ unter Verwendung einer Flash-Technik chromatographiert und mit CHCl₃/MeOH (6:1) eluiert. Die erste eluierte Komponente wurde evaporiert, mit Toluol coevaporiert und ergab das Triacetylderivat in Form eines weißen Schaumes.

Analyse für 0,1 Toluolat

berechnet: C 47,69; H 4,51; N 16,65
 gefunden: C 47,47; H 4,37; N 16,82

Das Aufarbeiten und Verdampfen der die zweite eluierte Verbindung enthaltenden Fraktionen ergab das Diacetylderivat in Form eines weißen Feststoffes.

Schmelzpunkt: 232–234°C (Zersetzung)

Analyse für 0,25 Ethanolat

berechnet: C 45,73; H 4,63; N 18,39
 gefunden: C 46,02; H 4,34; N 18,19

Beispiel 3

Herstellung von 9-(2-deoxy-2-fluor-3-O-pivaloyl-β-D-ribofuranosyl)guanin und 9-(2-Deoxy-2-fluor-3,5-di-O-pivaloyl-β-D-ribofuranosyl)-guanin

Zu einer Lösung von 9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin (200 mg, 0,70 mmol), DMAP (10 mg) und Triethylamin (0,5 ml) in DMF (6 ml) wurde bei Raumtemperatur Trimethylacetanhydrid (160 µl, 1,1 eq.) zugegeben, und die Lösung wurde 24 Stunden gerührt. Anschließend wurden weitere 80 µl Trimethylacetanhydrid zugegeben und weitere 5 Tage gerührt. Die Umsetzung wurde mit Methanol (1 ml) beendet, unter vermindertem Druck zu einem weißen Feststoff evaporiert und über SiO₂ unter Verwendung der Flash-Technik chromatographiert, wobei mit CHCl₃/MeOH (15:1), anschließend (10:1), (6:1) und abschließend (4:1) eluiert wurde.

Die dritte eluierte UV absorbierende Fraktion war der 3',5'-bis Pivalatester, der sich als wachsförmiger Feststoff nach Zerreiben mit Ether ergab.

Schmelzpunkt: 250–252°C (Zersetzung)

Analyse für C₂₀H₂₈FN₅O₈ · 0,5 H₂O

berechnet: C 51,94; H 6,32; N 15,15
 gefunden: C 51,99; H 6,23; N 14,83

Die vierte eluierte UV-absorbierende Fraktion war der 3'-Pivalatester, der sich als weißes Pulver mit einem Schmelzpunkt unter stufenweiser Abdunklung von 260–320°C ergab.

Analyse für $C_{16}H_{20}FN_5O_6 \cdot 0,7 H_2O$

berechnet: C 47,17; H 5,65; N 18,34;

gefunden: C 47,10; H 5,36; N 17,93

Beispiel 4

Herstellung von 9-(2-Deoxy-2-fluor-3,5-di-O-pivaloyl- β -D-ribofuranosyl)adenin, 9-(2-Deoxy-2-fluor-3-O-pivaloyl- β -D-ribofuranosyl)adenin und 9-(2-Deoxy-2-fluor-5-O-pivaloyl- β -D-ribofuranosyl)adenin

Zu einer Lösung von 9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin (250 mg, 0,93 mmol), DMAP (10 mg) und Triethylamin (0,65 ml) in trockenem DMF (7 ml) wurde Trimethylacetanhydrid (226 μ l, 1,2 eq.) bei Raumtemperatur unter Rühren zugegeben. Nach 24 Stunden wurden weitere 60 μ l Trimethylacetanhydrid und nach weiteren 24 Stunden weitere 20 μ l zugegeben. Nach einem weiteren Tag wurde die Umsetzung mit MeOH gelöscht, in vacuo evaporiert, mit Methanol coevaporiert und mittels Flash-Chromatographie über SiO_2 gereinigt. Die Eluierung erfolgte mit $CHCl_3/MeOH$ (18:1), (15:1) und abschließend (10:1). Die erste eluierte UV-absorbierende Fraktion ergab sich als 3'5'-Bisester in Form eines weißen Feststoffes nach Zerreiben mit Ether.

Schmelzpunkt: 157–158°C

Analyse für $C_{20}H_{28}FN_5O_6 \cdot 0,3 H_2O$

berechnet: C 54,24; H 6,51; N 15,82

gefunden: C 54,40; H 6,33; N 15,48

Die zweite eluierte UV-absorbierende Fraktion ergab sich als 3'-Pivalatester in Form eines weißen Feststoffes.

Schmelzpunkt: 204–205°C.

Analyse für $C_{16}H_{20}FN_5O_4 \cdot 0,3 H_2O$

berechnet: C 50,22; H 5,79; N 19,53

gefunden: C 50,25; H 5,58; N 19,31

Die dritte eluierte UV-absorbierende Fraktion ergab sich als 5'-Pivalatester in Form eines weißen Schalles.

Schmelzpunkt: 130–134°C

Analyse für $C_{16}H_{20}FN_5O_4 \cdot 0,2 H_2O$

berechnet: C 50,46; H 5,76; N 19,62

gefunden: C 50,57; H 5,65; N 19,45

Beispiel 5

Herstellung von 9(2-Deoxy-2-fluor-3,5-di-O-valeryl- β -D-ribofuranosyl)adenin, 9(2-Deoxy-2-fluor-3-O-valeryl- β -D-ribofuranosyl)adenin und 9(2-Deoxy-2-fluor-5-O-valeryl- β -D-ribofuranosyl)adenin

Zu einer Lösung von 9(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin (300 mg, 1,1 mmol), DMAP (10 mg) und Triethylamin (0,9 ml) in trockenem DMF (8 ml) wurde bei Raumtemperatur unter Rühren Valeriansäureanhydrid (263 μ l, 1,2 eq.) zugegeben. Bei 24 und 48 Stunden wurden weitere 30 μ l Valeriansäureanhydrid zugegeben. Einen Tag nach der abschließenden Zugabe wurde die Mischung mit MeOH gelöscht, anschließend aufgearbeitet und für die Herstellung der Pivalatester chromatographiert. Die erste eluierte UV-absorbierende Komponente war der 3',5'-Bisester, der in Form weißer Nadeln nach Zerreiben mit Ether kristallisierte.

Schmelzpunkt: 96–98°C

Analyse für $C_{20}H_{28}FN_5O_6$

berechnet: C 54,91; H 6,45; N 16,01

gefunden: C 54,93; H 6,49; N 15,89

Die zweite eluierte UV-absorbierende Komponente war der 3'-Valerianatester.

Schmelzpunkt: 182–183°C

Analyse für $C_{16}H_{20}FN_5O_4$

berechnet: C 50,98; H 5,71; N 19,82

gefunden: C 50,91; H 5,82; N 19,46

Die dritte eluierte UV-absorbierende Komponente war der 5'-Valerianatester, der nach Zerreiben mit Ether kristallisierte.

Schmelzpunkt: 115–117°C

Analyse für $C_{16}H_{20}FN_5O_4$

berechnet: C 50,98; H 5,71; N 19,82

gefunden: C 50,76; H 5,81; N 19,44

Beispiel 6

2,6-Diamino-9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-9H-purin

2,6-Diaminopurin (Pacific Chemical Laboratories, 0,8 g, 4,8 mmol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil (0,4 g, 1,6 mmol), das nach J. F. Codrington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 50 ml 5 mM Kaliumphosphatpuffer, bei pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Thymidinphosphorylase (3,850 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (3,760 I. U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4,381,344) wurden zugegeben und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 12. Tag wurde die Umsetzung filtriert. Das Filtrat wurde auf eine 1,5 cm \times 15 cm Säule eines Anionenaustauschharzes (Bio-Rad AG1X2-Hydroxidform) gegeben. Nach Waschen der Säule mit Wasser/Methanol (7/3) wurde das Produkt mit Wasser/Methanol (1/1) eluiert. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden zusammengegeben und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und zum Erhalt der Titelverbindung, deren Analyse das 1,2-Hydrat ergab, lyophilisiert.

(w/v) = (Gewicht/Volumen)

Schmelzpunkt: 124°C UV λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 0,1 N HCl, 291 (10,2), 252 (11,8); pH7, 278,5 (10,3), 255 (9,69); 0,1 N NaOH, 279 (10,6), 255 (9,69).

Analyse für $C_{10}H_{13}FN_6O_{31} \cdot 2 H_2O$

berechnet: C 39,27; H 5,07; N 27,48; F 6,21

gefunden: C 39,22; H 5,09; N 27,39; F 6,45

1H -NMR (80 MHz, Me_2SO-d_6): δ 7,94 (s, 1H, H-8); 6,74 und 5,79 (2bs, 4H, 2-NH₂ und 6-NH₂); 6,04 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,5 Hz, J = 3,4 Hz); 5,64 (m, 1,5H, 0,5 [H-2'] und 3'-OH); 5,25 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,5 Hz); 4,98 (m, 0,5H, 0,5 [H-2']); 4,41 (m, 1H, H-3'); 3,93 (m, 1H, H-4'); 3,65 (m, 2H, Ha-5' und H β -5').

Beispiel 7

9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)guanin

2,6-Diamino-9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-9H-purin (0,20g, 0,64 mMol), das entsprechend Beispiel 6 hergestellt wurde, wurde in 15 ml Wasser gelöst. Kalbintestinale Adenosindeaminase (4l. U., Boehringer Mannheim) wurde zugegeben, und die Lösung wurde 4 Tage bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde auf 4°C abgekühlt. Nach drei Stunden wurde die Suspension filtriert, um die erste Charge Produktkristalle zu entfernen. Das Filtratvolumen wurde unter Vakuum eingengt und die Suspension auf 4°C abgekühlt. Die Suspension wurde zur Entfernung der zweiten Charge Produktkristalle filtriert. Die Produktkristall-Chargen wurden kombiniert, in Wasser suspendiert und zum Erhalt der Titelverbindung, deren Analyse ein 1,3-Hydrat ergab, lyophilisiert.

Schmelzpunkt: 250°C (Zersetzung)

UV λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 0,1 N HCl, 257 (12,2), 280 (sh); 0,1 N NaOH, 257–264 (10,9).

Analyse für $C_{10}H_{12}FN_6O_4 \cdot 1,3 H_2O$

berechnet: C 38,91; H 4,77; N 22,69; F 6,16

gefunden: C 38,60; H 4,82; N 22,51; F 6,44

1H -NMR (80 MHz, Me_2SO-d_6): δ 10,63 (bs, 1H, N1-H); 7,94 (s, 1H, H-8); 6,51 (bs, 2H, 2-NH₂); 6,00 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,5 Hz, J = 2,9 Hz); 5,59 (m, 1,5H, 0,5 [H-2'] und 3'-OH); 5,10 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,6 Hz); 4,90 (m, 0,5H, 0,5 [H-2']); 4,37 (m, 1H, H-3'); 3,90 (m, 1H, H-4'); 3,65 (m, 2H, Ha-5' und H β -5').

Beispiel 8

9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin

Adenin (Mann Research Laboratories, Inc., 0,8g, 5,9 mMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil (0,4g; 1,6 mMol), die entsprechend J. F. Codigton et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar sind, wurden in 20 ml eines 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH7,0, 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Thymidinphosphorylase (2400 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (3900 I. U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4,381,344) wurden zugegeben, und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 6. Tag wurde die Umsetzung auf 100 ml mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, verdünnt. Am 17. Tag wurde die Suspension filtriert, und das Filtrat wurde eingedampft. Der Rückstand wurde in warmem Wasser suspendiert. Die Suspension wurde filtriert und das Filtrat wurde auf eine 1,5 cm \times 12 cm Säule, die mit Anionenaustauschharz (Bio-Rad AG1X2-Hydroxidform) beschickt war, gegeben. Das Produkt wurde mit Wasser eluiert. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden zusammengegeben und das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, lyophilisiert und die Analyse ergab die Titelverbindung in Form eines 0,6-Hydrates.

Schmelzpunkt: 225–227°C (Zersetzung)

UV λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 0,1 N HCl, 257 (14,6); 0,1 N NaOH, 260 (14,9).

Analyse für $C_{10}H_{12}FN_6O_3 \cdot 0,6 H_2O$

berechnet: C 42,89; H 4,57; N 25,01; F 6,78

gefunden: C 42,94; H 4,76; N 24,98; F 6,89

1H -NMR (250 MHz, Me_2SO-d_6): δ 8,35 und 8,14 (2s, 2H, H-8 und H-2); 7,36 (s, 2H, 6-NH₂); 6,21 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,8 Hz, J = 3,0 Hz); 5,71 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,0 Hz); 5,42 (ddd, 1H, h-2', JF,2' = 53,0 Hz; J1',2' = 3,0 Hz, J2',3' = 4,5 Hz); 5,25 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,6 Hz); 4,47 (m, 1H, H-3'); 3,97 (m, 1H, H-4'); 3,74 (m, 1H, Ha-5'); 3,56 (m, 1H, H β -5').

Beispiel 9

2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-9H-purin

2-Aminopurin (Vega Biochemicals, 0,4g, 3,0 mMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil (0,2g, 0,71 mMol), das nach J. F. Codington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 35 ml eines 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Thymidinphosphorylase (1930 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (1880 I. U.) (T. A. Krenitsky, et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4,381,344) wurden zugegeben, und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 24. Tag wurde die Umsetzung auf 200 ml mit Wasser verdünnt und 1390 I. U. Thymidinphosphorylase und 1880 I. U. Purinnucleosidphosphorylase wurden zugegeben. Am Tag 35 wurde die Suspension evaporiert. Der Rückstand wurde in Wasser/Methanol (7/3) gelöst und auf eine 1,5 cm \times 15 cm Säule, die mit Anionenaustauschharz (Bio-Rad AG1X2-Hydroxidform) beschickt war, gegeben. Das Produkt wurde mit Wasser/Methanol (7/3) eluiert. Die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden zusammengegeben und das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, lyophilisiert und die Analyse ergab die Titelverbindung in Form eines 0,6-Hydrates.

Schmelzpunkt: 151–153°C

UV λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 0,1 N HCl, 313 (4,00), 240–245; pH7, 304 (7,00), 243; 0,1 N NaOH, 304 (7,30), 243.

Analyse für $C_{10}H_{12}FN_6O_3 \cdot 0,6 H_2O$

berechnet: C 42,89; H 4,75; N 25,01; F 6,78

gefunden: C 43,02; H 4,71; N 25,12; F 6,58

¹H-NMR (80 MHz, Me₂SO-d₆): δ 8,62 und 8,31 (2s, 2H, h-8 und H-6); 6,62 (bs, 2H, 2-NH₂); 6,16 (dd, 1H, h-1', JF,1' = 16,7 Hz, J = 2,7 Hz); 5,71 (m, 1,5H, 3'-OH und 0,5 [H-2']); 5,12 (m, 1,5H, 5'-OH und 0,5 [H-2']); 4,40 (m, 1H, H-3'); 3,97 (m, 1H, H-4'); 3,66 (M, 2H, Ha-5' und Hβ-5').

Beispiel 10**2-Amino-6-cyclopropylamino-9H-purin-hydrochlorid**

Eine Lösung von 2-Amino-6-chlor-purin (Aldrich Chemical Company, 4,66 g, 27,5 mMol) und Cyclopropylamin (Aldrich Chemical Company, 12,5 g 220 mMol) in MeOH (100 ml) wurde 18 Stunden bei 50°C erhitzt. Anschließend wurde 2-Methoxyethanol (50 ml) zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 6 Stunden bei 70°C erhitzt. Nach Abkühlen wurde eine geringe Menge nicht umgesetzten Ausgangsmaterials abfiltriert, und das Filtrat wurde eingedampft und auf einer Silicagel-Säule mit CHCl₃: 5% bis 10% MeOH, gereinigt. Das Produkt wurde anschließend zweimal aus MeOH und einmal aus EtOH als Hydrochloridsalz umkristallisiert und ergab 1,45 g (23%) des Produktes; Schmelzpunkt: 253–257°C.

¹H-NMR (Me₂SO-d₆): δ 6,70–6,82 (m, 4, CH₂CH₂), 3,04 (br, s, 1, CHN), 7,35–7,5 (br, s, 2, NH₂), 8,13 (s, 1, CH), 9,49 (br, s, 1, NHCH), 13,0–13,3 (br, s, 2, NH₂).

Analyse für C₈H₁₀N₆HCl · 1 H₂O

berechnet: C 41,57; H 5,01; N 36,35; Cl 15,34

gefunden: C 41,55; H 5,01; N 36,28; Cl 15,4

2-Amino-6-(cyclopropylamino)-9-(2-deoxy-β-D-ribofuranosyl)-9H-purin

2-Amino-6-(cyclopropylamino)-9H-purinhydrochlorid (0,3 g, 1,3 mMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)uracil (0,4 g, 1,6 mMol), das nach J. F. Codrington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 20 ml eines 5 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, gelöst. Thymidinphosphorylase (2000 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (5,540 I. U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4,381,444) wurden zugegeben, und die Reaktionsmischung wurde bei 37°C inkubiert. Am 5. Tag wurden 2000 I. U. Thymidinphosphorylase und 5540 I. U. Purinnucleosidphosphorylase zugegeben. Am 21. Tag wurde die Reaktionsmischung auf eine 2,5 cm × 8 cm Säule, die mit einem Anionenaustauschharz (Bio-Rad AG1X2-Hydroxidform) beschickt war, gegeben. Nach Waschen der Säule mit Wasser wurde das Produkt mit Wasser/Methanol (7/3) eluiert. Die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden zusammengegeben, und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, lyophilisiert, wobei die Analyse die Titelverbindung in Form eines 0,6-Hydrates ergab.

Schmelzpunkt: 120°C (Teilweises Schmelzen bei 80°C).

UV λ_{max} nm (ε × 10⁻³): 0,1 N HCl, 295,5 (14,3), 254 (12,7); pH 7, 282 (14,8) 262 (sh); 0,1 N NaOH, 282 (15,2), 262 (sh).

Analyse für C₁₃H₁₇F₂N₆O₃ · 0,6 H₂O

berechnet: C 46,59; H 5,47; N 25,08; F 5,67

gefunden: C 46,46; H 5,35; N 25,03; F 5,91

¹H-NMR (200 MHz, Me₂SO-d₆): δ 7,93 (s, 1H, H-8); 7,38 (bd, 1H, 6-NH, J = 4,5 Hz); 6,04 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,4 Hz, J = 3,3 Hz); 5,88 (bs, 2H, 2-NH₂); 5,62 (d, 1H, 3'-OH, J = 5,9 Hz); 5,30 (anschl. dt, 1H, H-2', JF,2' = 53,7 Hz, J = 3,8 Hz); 5,23 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,4 Hz); 4,38 (m, 1H, H-3'); 3,92 (m, 1H, H-4'); 3,69 (m, 1H, Ha-5'); 3,59 (m, 1H, Hβ-5'); 3,10 (m, 1H, N-CH); 0,62 (M, 4H, CH₂CH₂).

Beispiel 11**9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-6-methoxy-9H-purin**

6-Methoxypurin (Sigma Chemical Company; 0,8 g, 5,3 mMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)uracil (0,4 g, 1,6 mMol), das nach J. F. Codrington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 20 ml eines 10 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Thymidinphosphorylase (3900 I. U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4.381.344) wurden zugegeben, und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 6. Tag wurde die Reaktionsmischung auf 100 ml mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, verdünnt. Am 16. Tag wurden 2640 I. U. Thymidinphosphorylase und 4360 I. U. Purinnucleosidphosphorylase zugefügt. Am 45. Tag wurde die Reaktionsmischung evaporiert. Der Rückstand wurde in warmem Methanol suspendiert, und die Suspension wurde filtriert. Das Filtrat wurde evaporiert. Der Rückstand wurde in warmem Wasser gelöst und auf eine 2,5 cm × 7 cm Säule, die mit einem Anionenaustauschharz (Bio-Rad AG1X2-Hydroxidform) beschickt war, gegeben. Nach Waschen mit Wasser wurde das Produkt mit Methanol/Wasser (9/1) eluiert. Die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden zusammengegeben und das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und ergab die Titelverbindung, die gemäß Analyse in Form eines 0,3-Hydrates vorliegt.

Schmelzpunkt: 182°C

UV λ_{max} nm (ε × 10⁻³): 0,1 N HCl, 250 (8,72), 259 (sh); pH 7, 248 (8,95), 259 (sh); 0,1 N NaOH, 250 (9, 14), 259 (sh).

Analyse für C₁₁H₁₃FN₄O₄ · 0,3 H₂O

berechnet: C 45,61; H 4,73; N 19,34; F 6,56

gefunden: C 45,72; H 4,66; N 19,47; F 6,72

¹H-NMR (300 MHz, Me₂SO-d₆): δ 8,63 und 8,58 (2s, 2H, H-8 und H-2); 6,34 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 17,1 Hz, J = 2,4 Hz); 5,76 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,1 Hz); 5,45 (ddd, 1H, H-2', JF,2' = 52,7 Hz, J 1',2' = 2,4 Hz, J 2',3' = 4,4 Hz); 5,17 (t, 1H, 5'-OH, J = 4,1 Hz); 4,50 (m, 1H, h-3'); 4,11 (s, 3H, O-CH₃); 4,00 (m, 1H, H-4'); 3,75 (m, 1H, Ha-5'); 3,62 (m, 1H, Hβ-5').

Beispiel 12**2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-6-methoxy-9H-purin**

2-Amino-6-methoxypurin (0,8 g, 4,8 mMol), das gemäß R. W. Balsiger und J. A. Montgomery (J. Org. Chem. 20: 1573, 1960) herstellbar ist, und 1-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)uracil (0,4 g, 1,6 mMol), das gemäß J. F. Codrington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 20 ml eines 10 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Thymidinphosphorylase (2400 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (3900 I. U.) (T. A. Krenitsky et al.,

Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4.381.344) wurden zugefügt, und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 6. Tag wurde die Umsetzung auf 100 ml mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, der 0,4% (w/v) Kaliumazid enthielt, verdünnt. Am 10. Tag wurde die Umsetzung auf 200 ml mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, verdünnt. Am 16. Tag wurden 2640 I. U. Thymidinphosphorylase und 4360 I. U. Purinnucleosidphosphorylase zugegeben. Am 24. Tag wurde die Reaktionsmischung filtriert und das Filtrat evaporiert. Der Rückstand wurde in Methanol suspendiert. Die Suspension wurde filtriert und das Filtrat evaporiert. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und auf eine 2,5 cm × 7 cm Säule, die mit einem Anionenaustauschharz (Bio-Rad AG 1 X2-Hydroxidform) beschickt war, gegeben. Nach Waschen der Säule mit Wasser wurde das Produkt mit Methanol/Wasser (9/1) eluiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in Wasser gelöst und zum Erhalt der Titelverbindung, die gemäß Analyse in Form eines 0,5-Hydrates vorliegt, lyophilisiert.

Schmelzpunkt: 200–202°C

UV λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 0,1 N HCl, 288 (7,85), 244,5 (6,43); pH 7, 279,5 (8,09), 248 (8,85); 0,1 N NaOH, 280 (8,40), 248,5 (8,59).

Analyse für $C_{11}H_{14}FN_4O_4 \cdot 0,5H_2O$

berechnet: C 42,86; H 4,90; N 22,78; F 6,16

gefunden: C 42,81; H 4,92; N 22,69; F 6,29

1H -NMR (300 MHz, Me_2SO-d_6): δ 8,12 (s, 1H, H-8); 6,57 (bs, 2H, 2-NH₂); 6,11 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,6 Hz) J = 2,7 Hz; 5,69 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,10 Hz); 5,31 (ddd, 1H, H-2', JF, 2' = 53,0 Hz, J1', 2' = 2,7 Hz, J2', 2' = 4,4 Hz); 5,17 (t, 1H, 5'-OH, J = 4,2 Hz); 4,40 (m, 1H, H-3'); 3,95 (m, 4H, H-4' und O-CH₃); 3,74 (m, 1H, H_a-5'); 3,58 (m, 1H, H_b-5').

Beispiel 13

6-Cyclopropylamino-9H-purin

Eine Lösung von 6-Chlorpurin (Aldrich Chemical Company, 4,23 g, 27 mMol) und Cyclopropylamin (Aldrich Chemical Company, 12,5 g, 22 mMol) in MeOH (100 ml) wurde 48 Stunden bei 50°C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt auf einer Silicagelsäule gereinigt, wobei mit $CHCl_3$: 5% MeOH eluiert wurde, um 5,90 g eines cremeartigen Feststoffes zu erhalten. Dieser wurde aus MeOH umkristallisiert und ergab zwei Ausbeuten, 2,69 g und 1,16 g (81,4% Gesamtausbeute).

Schmelzpunkt: 237–240°C

1H -NMR (Me_2SO-d_6): δ 0,6–0,71 (m, 4, CH_2CH_2), 3,03 (br s, 1, CHNH), 7,73 (d, 1, NH), 8,05 (s, 1, CH), 8,18 (s, 1, CH), 12,7 (br, 1, NH).

Analyse für $C_8H_9N_5$

berechnet: C 54,85; H 5,18; N 39,97

gefunden: C 54,69; H 5,22; N 39,87

6-(Cyclopropylamino)-9-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-9H-purin

6-(Cyclopropylamino)-9H-purin (0,2 g, 1,1 mMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil (0,4 g, 1,5 mMol), die entsprechend J. F. Codrington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar sind, wurden in 20 ml eines 5 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Der pH-Wert der Suspension wurde mit KOH auf 7,0 eingestellt. Thymidinphosphorylase (2000 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (5540 I. U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4.381.344) wurden zugegeben, und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 5. Tag wurden 0,2 g 6-(Cyclopropylamino)purin und 2000 I. U. Thymidinphosphorylase und 5540 I. U. Purinnucleosidphosphorylase zugegeben. Am 9. Tag wurden 0,2 g 6-(Cyclopropylamino)purin zugegeben, und der pH-Wert der Umsetzung wurde mit KOH auf 7,0 eingestellt. Thymidinphosphorylase (2000 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (5540 I. U.) wurden zugegeben. Am 20. Tag wurde der pH-Wert der Umsetzung mittels NH_4OH auf 9,5 eingestellt, und die Umsetzung wurde auf eine 2,5 cm × 8,5 cm Säule, die mit einem Anionenaustauschharz (Bio-Rad AG 1 X2-Hydroxidform) beschickt war, gegeben. Nach Waschen mit Wasser wurde das Produkt mit Wasser/Methanol (7/3) eluiert. Die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden zusammengegeben, und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und ergab nach Lyophilisieren die Titelverbindung, die gemäß Analyse in Form eines 0,4-Hydrates vorlag.

Schmelzpunkt: 207–208°C

UV λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 0,1 N HCl, 264 (19,1); pH 7, 268 (18,2); 0,1 N NaOH, 268 (18,6)

Analyse für $C_{13}H_{16}FN_5O_3 \cdot 0,4H_2O$

berechnet: C 49,33; H 5,35; N 22,13; F 6,00

gefunden: C 49,33; H 5,33; N 22,11; F 6,14

1H -NMR (200 MHz), Me_2SO-d_6): δ 8,35 und 8,24 (2s, 2H, H-8 und H-2); 7,98 (bd, 1H, 6-NH, J = 4,10 Hz), 6,23 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,8 Hz, J = 2,9 Hz); 5,68 (d, 1H, 3'-OH, J = 5,9 Hz); 5,42 (ddd, 1H, H-2', JF, 2' = 53,0 Hz, J1', 2' = 2,9 Hz, J2', 3' = 4,6 Hz); 5,20 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,6 Hz); 4,46 (m, 1H, H-3'); 3,97 (m, 1H, H-4'); 3,73 (m, 1H, H_a-5'); 3,55 (m, 1H, H_b-5'); 3,04 (m, 1H, N-CH); 0,66 (m, 4H, CH_2CH_2).

Beispiel 14

2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-6-ethoxy-9H-purin

2-Amino-6-ethoxypurin (0,8 g, 4,5 mMol), das entsprechend R. W. Balsiger und J. A. Montgomery (J. Org. Chem. 25: 1573, 1960) herstellbar ist, und 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil (0,5 g, 2,1 mMol), das nach J. F. Codrington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 50 ml eines 5 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0 der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Der pH-Wert der Suspension wurde mit KOH auf 7,0 eingestellt. Thymidinphosphorylase (4000 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (14000 I. U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981) und U. S. Patent 4.381.344) wurden zugegeben, und die Reaktion wurde bei 37°C gerührt. Am 4. Tag wurden 2000 I. U. Thymidinphosphorylase und 6980 I. U. Purinnucleosidphosphorylase zugegeben, und die Umsetzung wurde auf 250 ml mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, verdünnt. Am 14. Tag wurde das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser suspendiert und Methanol wurde zugegeben, um das Protein auszufällen. Nachdem die Suspension filtriert war, wurde das Filtrat evaporiert. Der Rückstand wurde in heißem Wasser gelöst und auf eine 1,5 cm × 15 cm Säule, die mit einem Anionenaustauschharz (Bio-Rad AG 1 X2-Hydroxidform) beschickt war, gegeben. Nach Waschen der Säule mit Wasser wurde

das Produkt mit Methanol/Wasser (1/1) eluiert. Die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und ergab nach Lyophilisieren gemäß Analyse die Titelverbindung in Form eines 0,7-Hydrates.

Schmelzpunkt: 85°C (Teilweises Schmelzen bei 50°C)

UV λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 0,1 N HCl, 288 (8,78), 244,5 (7,19); pH 7, 280 (8,96), 247,5 (9,55); 0,1 N NaOH, 280 (9,25), 249 (9,15)

Analyse für $C_{12}H_{16}FN_5O_4 \cdot 0,7H_2O$

berechnet: C 44,23; H 5,38; N 21,49; F 5,83

gefunden: C 44,30; H 5,43; N 21,39; F 5,81

1H -NMR (200 MHz, Me_2SO - d_6): δ 8,09 (s, 1H, H-8); 6,49 (bs, 2H, 2-NH₂); 6,08 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,4 Hz) J = 2,7 Hz; 5,67 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,1 Hz); 5,42 (m, 0,5H, 0,5 [H-2']); 5,15 (m, 1,5H, 0,5 [H-2'] und 5'-OH); 4,44 (q, 2H, 6-OCH₂, J = 7,0 Hz); 4,0 (m, 1H, H-3'); 3,92 (m, 1H, H-4'); 3,73 (m, 1H, H_a-5'); 3,56 (m, 1H, H_b-5'); 1,34 (t, 3H, -CH₃, J = 7,0 Hz).

Beispiel 15

2-Amino-6-chlor-9-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-9H-purin

reaktion 1: 2-Amino-6-chlorpurin (Sigma Chemical Company, 0,8g, 4,7mMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil (0,4g, 1,6mMol), das gemäß J. F. Codington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 50ml eines 5mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0 der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Der pH-Wert der Suspension wurde mit KOH auf 7,0 eingestellt. Thymidinphosphorylase (3850 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (6500 I. U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4.381.444) wurden zugegeben, und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 22. Tag wurde die Umsetzung auf 100 ml mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, verdünnt und 1270 I. U. Thymidinphosphorylase und 2180 I. U. Purinnucleosidphosphorylase wurden zugegeben. Am 32. Tag wurde die Umsetzung auf 200 ml mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 der 0,04% (Gewicht/Volumen) Kaliumazid enthielt, verdünnt und 2540 I. U. Thymidinphosphorylase und 4360 I. U. Purinnucleosidphosphorylase wurden zugegeben. Am 61. Tag wurde die Umsetzung filtriert. Das Filtrat wurde evaporiert und der Rückstand bei 4°C aufbewahrt.

Reaktion 2: 2-Amino-6-chlorpurin (Sigma Chemical Company, 0,8g, 4,7mMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -ribofuranosyl)uracil (0,4g, 1,6mMol) wurden in 25ml eines 10mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Thymidinphosphorylase (4000 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (6500 I. U.) wurden zugegeben, und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 10. Tag wurde die Umsetzung auf 100 ml mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, verdünnt. Am 20. Tag wurde die Umsetzung auf 200 ml mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, verdünnt und 2640 I. U. Thymidinphosphorylase und 4360 I. U. Purinnucleosidphosphorylase wurden zugegeben. Am 53. Tag wurde die Umsetzung filtriert. Das Filtrat wurde evaporiert und der Rückstand bei 4°C aufbewahrt. Die Rückstände aus den Reaktionen 1 und 2 wurden in Wasser suspendiert und vereinigt. Die Suspension wurde erwärmt und anschließend filtriert. Das in dem Filtrat enthaltene Produkt wurde mittels Chromatographie gereinigt auf einer 7,5 cm \times 90 cm Säule, die mit Biogel P-2 (Bio-Rad) beschickt war, mit n-Propanol/Wasser (3/7) als Lösungsmittel, gereinigt und nachfolgend wurde chromatographiert auf einer 5 cm \times 90 cm Säule, die mit Sephadex G-10 (Pharmacia LKB) beschickt war, unter Verwendung von n-Propanol/Wasser (3/7) als Lösungsmittel. Die nur das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser suspendiert und ergab nach Lyophilisieren die Titelverbindung (Charge 1). Fraktionen, die das Produkt und Verunreinigungen infolge Auselüeren aus der Sephadex G-10-Säule enthielten, wurden vereinigt, und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser/MeCN (49/1) gelöst, und das Produkt wurde mittels Umkehrphasenchromatographie auf C18 Silica (Hi-Chrom Prep-40-ODS, Regis Chemical Co.) mit Wasser/MeCN (49/1) als Lösungsmittel weitergereinigt. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch einen 0,2-m-Porennylonfilter zur Entfernung von restlichem Silica filtriert. Nachdem das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen war, wurde der Rückstand in Wasser gelöst und durch ein 0,22-m-Porenmembranfilter (Millipore GS) filtriert. Lyophilisieren des Filtrats ergab die Titelverbindung (Charge 2) gemäß Analyse in Form eines 0,5-Hydrates.

Daten für Charge 1:

Schmelzpunkt: 212°C (Teilweises Schmelzen bei 205°C)

UV λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 0,1 N HCl, 309 (6,00), 247 (5,60); pH 7, 307,5 (6,30), 247 (5,80); 0,1 N NaOH, 307 (6,40), 247 (5,30).

Analyse für $C_{10}H_{11}ClFN_5O_3$

berechnet: C 39,55; H 3,65; N 23,06; Cl 11,67; F 6,26

gefunden: C 39,69; H 3,82; N 22,84; Cl 11,64; F 6,14

1H -NMR (300 MHz, Me_2SO - d_6): δ 8,37 (s, 1H, H-8); 7,07 (bs, 2H, 2-NH₂); 6,12 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,6 Hz) J = 2,0 Hz; 5,72 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,4 Hz); 5,34 (ddd, 1H, H-2', JF, 2' = 52,9 Hz, J1', 2' = 2,0 Hz, J2', 3' = 4,2 Hz); 5,19 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,3 Hz); 4,42 (m, 1H, H-3'); 3,96 (m, 1H, H_a-4'); 3,76 (m, 1H, H_b-5'); 3,61 (m, 1H, H-5').

Daten für Charge 2:

Schmelzpunkt: 215°C

UV max nm: 0,1 N HCl, 309,5, 246,5; pH 7, 307,5, 247; 0,1 N NaOH, 307,5, 247

Analyse für $C_{10}H_{11}ClFN_5O_3 \cdot 0,5 H_2O$

berechnet: C 38,41; H 3,87; N 22,40; Cl 11,34; F 6,08

gefunden: C 38,73; H 3,79; N 22,14; Cl 11,16; F 6,10

1H -NMR (80 MHz, Me_2SO - d_6): δ 8,36 (s, 1H, H-8); 7,03 (bs, 2H, 2-NH₂); 6,13 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,8 Hz, J = 3,2 Hz); 5,68 (m, 1,5H, 0,5 [H-2'] und 3'-OH); 5,15 (m, 1,5H, 0,5 [H-2'] und 5'-OH); 4,35 (m, 1H, H-3'); 3,90 (m, 1H, H-4'); 3,72 (m, 2H, H_a-5' und H_b-5').

Beispiel 16**2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-6-methylamino-9H-purin**

2-Amino-6-methylaminopurin (J. A. Montgomery und L. B. Holm, J. A. C. S. 80: 404, 1958; 0,51 g; 3,1 mMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil (0,52 g, 2,1 mMol), das nach J. F. Codington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 50 ml eines 5 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Thymidinphosphorylase (4000 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (14000 I. U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4.381.344) wurden zugegeben und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 6. Tag wurde die Umsetzung auf 250 ml mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, verdünnt und 0,49 g 2-Amino-6-methylaminopurin und 4000 I. U. Thymidinphosphorylase und 14000 I. U. Purinnucleosidphosphorylase wurden zugegeben. Am 14. Tag wurde die Umsetzung evaporiert. Der Rückstand wurde in Wasser/Methanol suspendiert und die Suspension filtriert. Das Filtrat wurde evaporiert. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und auf eine 2,5 cm \times 13 cm Säule, die mit einem Anionenaustauschharz (Bio-Rad AG 1 X2-Hydroxidform) beschickt war, gegeben. Nach Waschen der Säule mit Wasser wurde das Produkt mit Methanol/Wasser (1/1) eluiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels unter Vakuum wurde der Rückstand in Wasser gelöst und durch ein 0,22- μ m-Porenmembranfilter filtriert. Lyophilisieren des Filtrats ergab die Titelverbindung gemäß Analyse in Form eines 0,5-Hydrates.

Schmelzpunkt: 172°C

UV λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 0,1 N HCl, 292,5 (11,5), 255 (12,1); pH 7, 279,5 (13,4), 263 (sh); 0,1 N NaOH, 280 (13,7), 263 (sh)

Analyse für $C_{11}H_{16}FN_6O_3 \cdot 0,5H_2O$

berechnet: C 43,00; H 5,25; N 27,35; F 6,18
 gefunden: C 42,99; H 5,28; N 27,33; F 6,16

1H -NMR (200 MHz, Me_2SO-d_6): δ 7,92 (s, 1H, H-8); 7,28 (bs, 1H, 6-NH); 6,13 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,3 Hz) J = 3,3 Hz; 5,91 (bs, 2H, 2-NH₂); 5,64 (d, 1H, 3'-OH, J = 5,8 Hz); 5,29 (dd, 1H, H-2', JF, 2' = 53,0 Hz, J1', 2' = 3,3 Hz, J2', 3' = 4,4 Hz); 5,27 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,5 Hz); 4,37 (m, 1H, H-3'); 3,92 (m, 1H, H-4'); 3,72 (m, 1H, H_a-5'); 3,60 (m, 1H, H_b-5'); 2,86 (bs, 3H, N-CH₃).

Beispiel 17**9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)hypoxanthin**

6-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-9H-purin (0,29 g, 1,0 mMol), hergestellt Beispiel 8, wurden in 100 ml Wasser gelöst. Adenosindeaminase aus dem Kälberdarm (4 I. U., Boehringer Mannheim) wurde zugegeben, und die Lösung wurde 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser/n-Propanol (7/3) gelöst und auf einer 5 cm \times 90 cm Säule, die mit Sephadex G-10 (Pharmacia LKB) beschickt war, mit Wasser/n-Propanol (7/3) als Lösungsmittel chromatographiert. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, lyophilisiert und ergab die Titelverbindung gemäß Analyse in Form eines Hydrates.

Schmelzpunkt: 175°C (Teilweises Schmelzen bei 125°C)

UV λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 0,1 N HCl, 249 (11,8), pH 7, 248,5 (12,0); 0,1 N NaOH, 253 (13,0)

Analyse für $C_{10}H_{11}FN_4O_4 \cdot H_2O$

berechnet: C 41,67; H 4,55; N 19,44; F 6,59
 gefunden: C 41,72; H 4,58; N 19,46; F 6,37

1H -NMR (300 MHz, Me_2SO-d_6): δ 8,33 und 8,09 (2s, 2H H-8 und H-2); 6,21 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,8 Hz, J = 2,4 Hz); 5,75 (bs, 1H, 3'-OH); 5,36 (ddd, 1H, H-2', JF, 2' = 52,7 Hz, J1', 2' = 2,4 Hz, J1', 3' = 4,4 Hz); 5,20 (bs, 1H, 5'-OH); 4,43 (ansch. d m, 1H, H-3', JF, 3' = 18,9 Hz); 3,97 (m, 1H, H-4'); 3,75 (m, 1H, H_a-5'); 3,59 (m, 1H, H_b-5')

Beispiel 18**2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-6-propoxy-9H-purin**

2-Amino-6-propoxy-purin (0,3 g, 1,6 mMol), das gemäß R. W. Balsiger und J. A. Montgomery (J. Org. Chem. 25: 1573, 1960) und 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil (0,52 g, 2,1 mMol), das gemäß J. F. Codington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 50 ml eines 2 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Der pH-Wert der Suspension wurde mit KOH auf 7,0 eingestellt. Thymidinphosphorylase (4000 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (14000 I. U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4.381.344) wurden zugegeben, und die Reaktion wurde bei 37°C gerührt. Am 6. Tag wurde die Umsetzung auf 250 ml mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, verdünnt und 4000 I. U. Thymidinphosphorylase und 14000 I. U. Purinnucleosidphosphorylase wurden zugegeben. Am 14. Tag wurde das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Methanol/Wasser suspendiert, und die Suspension wurde filtriert. Das Filtrat wurde evaporiert. Der Rückstand wurde in heißem Wasser gelöst und auf eine 2,5 cm \times 13 cm Säule, die mit einem Anionenaustauschharz (Bio-Rad AG 1 X2-Hydroxidform) beschickt war, gegeben. Nach Waschen der Säule mit Wasser wurde das Produkt mit Methanol/Wasser (1/1) eluiert. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, und das Lösungsmittel wurde unter Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, lyophilisiert und ergab die Titelverbindung gemäß Analyse in Form eines 0,9-Hydrates.

Schmelzpunkt: 93°C (Teilweises Schmelzen bei 65°C)

UV λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 0,1 N HCl, 289 (9,05), 245 (7,37); pH 7, 280 (9,28), 248 (9,82); 0,1 N NaOH, 280,5 (9,67), 249,5 (9,55)

Analyse für $C_{13}H_{18}FN_5O_4 \cdot 0,9H_2O$

berechnet: C 45,69; H 5,78; N 20,49; F 5,56
 gefunden: C 45,75; H 5,61; N 20,51; F 5,60

1H -NMR (200 MHz, Me_2SO-d_6): δ 8,09 (s, 1H, H-8); 6,49 (bs, 2H, 2-NH₂); 6,08 (dd, 1H, H-1', JF, 1' = 16,4 Hz) J = 2,7 Hz; 5,65 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,0 Hz); 5,42 (ansch. t, 0,5H, 0,5 [H-2'], J = 3,5 Hz); 5,14 (m, 1,5H, 0,5 [H-2'] und 5'-OH); 4,36 (m, 3H, H-3' und 6-OCH₂); 3,92 (m, 1H, H-4'); 3,69 (m, 1H, H_a-5'); 3,60 (m, 1H, H_b-5'); 1,75 (ansch. Sextett, 2H, CH₂, J = 7,1 Hz); 0,95 (t, 3H, CH₃, J = 74 Hz).

Beispiel 19**2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-6-Jod-9H-purin**

2-Amino-6-jodpurin (0,8g, 3,1 mMol), das gemäß R. T. Koda et al. (J. Pharm. Sci. 57: 2056, 1968) herstellbar ist, und 1-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)uracil (0,39g, 1,6 mMol), das gemäß J. F. Codington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 20 ml eines 10 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Der pH-Wert der Suspension wurde mit KOH auf 7,2 eingestellt. Thymidinphosphorylase (2000 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (3250 I. U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4.381.344) wurden zugegeben, und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 12. Tag wurde der pH-Wert der Umsetzung mit Essigsäure auf 6,8 eingestellt und 2000 I. U.

Thymidinphosphorylase und 3250 I. U. Purinnucleosidphosphorylase wurden zugegeben. Am 26. Tag wurde die Umsetzung auf 500 ml mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, verdünnt und 2000 I. U.

Thymidinphosphorylase und 3250 I. U. Purinnucleosidphosphorylase wurden zugegeben. Am 40. Tag wurde die Umsetzung filtriert. Das Filtrat wurde evaporiert. Der Rückstand wurde in Wasser/n-Propanol (7/3) suspendiert und filtriert. Das Filtrat wurde evaporiert. Der Rückstand wurde in Methanol suspendiert und anschließend filtriert. Das im Filtrat enthaltene Produkt wurde mittels Chromatographie gereinigt auf einer 5 cm × 90 cm Säule, die mit Biogel P-2 (Bio-Rad) beschickt war, unter Verwendung von Wasser/n-Propanol (7/3) als Lösungsmittel. Nachfolgend wurde auf einer 5 cm × 90 cm Säule, die mit Sephadex G-10 (Pharmacia LKB) beschickt war, mit Wasser/n-Propanol (7/3) als Lösungsmittel chromatographiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand im Wasser suspendiert und ergab nach Lyophilisieren die Titelverbindung gemäß Analyse in Form eines 0,6-Hydrates.

Schmelzpunkt: 135°C (Teilweises Schmelzen bei 108–110°C)

UV λ_{max} nm (ε × 10⁻³): 0,1 N HCl, 318 (7,94); pH 7, 315 (8,30); 0,1 N NaOH, 315 (8,36).

Analyse für C₁₀H₁₁FN₅O₃ · 0,6 H₂O

berechnet: C 29,59; H 3,03; N 17,25; F 4,68; I 31,26

gefunden: C 29,69; H 3,06; N 17,22; F 4,44; I 31,47

¹H-NMR (300 MHz, Me₂SO-d₆): δ 8,33 (s, 1 H, H-8); 6,96 (bs, 2 H, 3-NH₂); 6,09 (dd, 1 H, H-1', JF,1' = 16,7 Hz, J = 2,4 Hz); 5,69 (d, 1 H, 3'-OH, J = 6,3 Hz); 5,33 (ddd, 1 H, H-2', JF,2' = 52,8 Hz, J1',2' = 2,4 Hz, J2',3' = 4,2 Hz); 5,16 (t, 1 H, 5'-OH, J = 5,3 Hz); 4,42 (m, 1 H, H-3'); 3,95 (m, 1 H, H-4'); 3,77 (m, 1 H, H_a-5'); 3,60 (m, 1 H, H_β-5').

Beispiel 20**9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-6-methylamino-9H-purin**

6-Methylaminopurin (Sigma Chemical Company, 0,8g, 5,4 mMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)uracil (0,39g, 1,6 mMol), das gemäß J. F. Codington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 20 ml eines 10 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Thymidinphosphorylase (2400 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (3900 I. U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4.381.344) wurden zugegeben, und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 6. Tag wurde die Umsetzung auf 100 ml mit 5 mM

Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, verdünnt. Am 17. Tag wurde die Umsetzung filtriert. Das Filtrat wurde evaporiert. Der Rückstand wurde in Methanol suspendiert und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde evaporiert. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und auf eine 2,5 cm × 7 cm Säule, die mit einem Anionenaustauschharz (Bio-Rad AG 1 X2-Hydroxidform) beschickt war, gegeben. Das Produkt wurde mit Wasser eluiert. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und durch ein 0,2 μm Porenmembranfilter filtriert. Lyophilisieren des Filtrats ergab die Titelverbindung.

Schmelzpunkt: 140°C (schrumpft bei 65°C, teilweises Schmelzen bei 110°C)

UV λ_{max} nm (ε × 10⁻³): 0,1 N HCl, 261,5 (16,2); pH 7, 265,5 (15,0); 0,1 N NaOH, 266 (15,3).

Analyse für C₁₁H₁₄FN₅O₃

berechnet: C 46,64; H 4,98; N 24,72; F 6,71

gefunden: C 46,48; H 5,07; N 24,63; F 6,93

¹H-NMR (300 MHz, Me₂SO-d₆): δ 8,37 und 8,25 (s, 2 H, H-8 und H-2); 7,86 (bs, 1 H, 6-NH); 6,24 (dd, 1 H, H-1', JF,1' = 16,8 Hz, J = 3,2 Hz); 5,74 (d, 1 H, 3'-OH, J = 6,1 Hz); 5,44 (ddd, 1 H, H-2', JF,2' = 53,0 Hz, J1',2' = 3,2 Hz, J2',3' = 4,4 Hz); 5,28 (t, 1 H, 5'-OH, J = 5,6 Hz); 4,49 (m, 1 H, H-3'); 3,99 (m, 1 H, H-4'); 3,75 (m, 1 H, H_a-5'); 3,58 (m, 1 H, H_β-5'); 2,95 (bs, 3 H, N-CH₃).

Beispiel 21**9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-6-ethoxy-9H-purin**

9-Ethoxypurin (Sigma Chemical Company; 0,2g, 1,2 mMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)uracil (0,4g, 1,6 mMol), das nach J. F. Codington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 20 ml eines 5 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Der pH-Wert der Suspension wurde mit KOH auf 7,0 eingestellt und Thymidinphosphorylase (2000 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (5540 I. U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4.381.344) wurden zugegeben und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 5. Tag wurden zusätzlich 2000 I. U. Thymidinphosphorylase und 2770 I. U. Purinnucleosidphosphorylase zugegeben. Am 9. Tag wurden 0,2g 6-Ethoxypurin zugegeben. Der pH-Wert der Umsetzung wurde mit KOH auf 7,0 eingestellt, und 2000 I. U.

Thymidinphosphorylase und 5540 I. U. Purinnucleosidphosphorylase wurden zugegeben. Am 28. Tag wurde die Suspension filtriert. Das Filtrat wurde auf eine 2,5 cm × 8,5 cm Säule, die mit einem Anionenaustauschharz (Bio-Rad AG 1 X2-Hydroxidform) beschickt war, gegeben. Nach Waschen mit Wasser wurde das Produkt mit Methanol/Wasser (3/7) eluiert. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen. Das im Rückstand enthaltene Produkt wurde weiterhin mittels Chromatographie gereinigt auf einer 2,5 cm × 90 cm Säule, die mit Biogel P-2 (Bio-Rad) beschickt war, wobei Wasser/Methanol (8/2) als Lösungsmittel verwendet wurde, und nach nachfolgend durch Chromatographie auf einer 2,5 cm × 50 cm Silicagel-Säule mit Acetonitril/Wasser (49/1) als Lösungsmittel weiterbehandelt wurde. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, lyophilisiert und ergab die Titelverbindung gemäß Analyse in Form eines 0,5 Hydrates.

Schmelzpunkt: 85–87°C (Teilweises Schmelzen bei 60°C)

UV λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 0,1 N HCl, 249 (11,4); pH 7, 248 (11,7); 0,1 N NaOH, 249 (12,0).

Analyse für $C_{12}H_{16}FN_4O_4 \cdot 0,5 H_2O$

berechnet: C 46,91; H 5,25; N 18,23; F 6,18

gefunden: C 46,80; H 5,23; N 18,21; F 6,65

1H -NMR (200 MHz, Me_2SO-d_6): δ 8,59 und 8,53 (2s, 2H, H-8 und H-2); 6,31 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 17,0 Hz, J = 2,5 Hz); 5,70 (d, 1H, 3'-OH, J = 6,3 Hz); 5,43 (ddd, 1H, H-2', JF1' = 52,9 Hz, J1',2' = 2,5 Hz, J2',3' = 4,4 Hz); 5,12 (t, 1H, 5'-OH, J = 5,4 Hz); 4,59 (q, 2H, 6-OCH₂, J = 7,0 Hz); 4,51 (m, 1H, H-3'); 3,98 (m, 1H, H_a-5'); 3,73 (m, 1H, H-4'); 3,61 (m, 1H, H_b-5'); 1,40 (t, 3H, -CH₃, J = 7,0 Hz).

Beispiel 22

2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-6-methylthio-9H-purin

2-Amino-6-6-methylthiopurin (Sigma Chemical Company; 0,6 g, 3,3 mMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil (0,3 g, 1,2 mMol), das gemäß J. F. Codington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 200 ml eines 5 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Thymidinphosphorylase (4000 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (6500 I. U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4.381.444) wurden zugegeben, und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 14. Tag wurde die Umsetzung auf 400 ml mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, verdünnt, und 8000 I. U. Thymidinphosphorylase und 6500 I. U. Purinnucleosidphosphorylase wurden zugegeben. Am 25. Tag wurde der pH-Wert der Umsetzung mit KOH auf 6,9 eingestellt. Am 39. Tag wurde die Umsetzung filtriert. Das Filtrat wurde auf eine 2,5 cm \times 13 cm Säule, die mit einem Anionenaustauschharz (Bio-Rad AG 1 X2-Hydroxidform) beschickt war, gegeben, und das Produkt wurde mit Methanol/Wasser (3/7) eluiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in Wasser suspendiert und lyophilisiert und ergab die Titelverbindung gemäß Analyse in Form eines 0,5-Hydrates.

Schmelzpunkt: 85–87°C

UV λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 0,1 N HCl, 327 (11,6); 250 (11,2), 263 (sh); pH 7, 311 (12,8); 257 (sh), 246 (15,1); 0,1 N NaOH, 311 (13,3), 257 (sh), 246 (14,8)

Analyse für $C_{11}H_{14}FN_5O_3S \cdot 0,5 H_2O$

berechnet: C 40,74; H 4,66; N 21,59; F 5,80; S 9,89

gefunden: C 40,79; H 4,66; N 21,55; F 5,89; S 9,84

1H -NMR (80 MHz, Me_2SO-d_6): δ 8,17 (s, 1H, H-8); 6,57 (bs, 2H, 2-NH₂); 6,14 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 16,4 Hz, J = 3,2 Hz); 5,64 (m, 1,5H, 0,5 (H-2') und 3'-OH); 5,11 (m, 1,5H, 0,5 (H-2') und 5'-OH); 4,40 (m, 1H, H-3'); 3,95 (m, 1H, H-4'); 3,65 (m, 1H, H_a-5' und H_b-5'); 2,58 (s, 3H, 6-CH₃).

Beispiel 23

9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-6-jod-9H-purin

6-Jodpurin (Sigma Chemical Company; 0,7 g, 2,7 mMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil (0,4 g, 1,7 mMol), das gemäß J. F. Codington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 20 ml eines 10 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Thymidinphosphorylase (2640 I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (4360 I. U.) (T. A. Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U. S. Patent 4.381.344) wurden zugegeben, und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 21. Tag wurde die Umsetzung auf 50 ml mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, verdünnt, und 4000 I. U. Thymidinphosphorylase und 6000 I. U. Purinnucleosidphosphorylase wurden zugegeben. Am 43. Tag wurde die Umsetzung auf 250 ml mit Wasser verdünnt, und 2000 I. U. Thymidinphosphorylase und 3250 I. U. Purinnucleosidphosphorylase wurden zugegeben. Am 57. Tag wurde die Umsetzung filtriert. Das Filtrat wurde evaporiert. Der Rückstand wurde in warmem Methanol suspendiert und filtriert. Das Filtrat wurde evaporiert. Der Rückstand wurde in Wasser/n-Propanol (7/3) gelöst und auf eine 7,5 cm \times 90 cm Säule, die mit Biogel P-2 (Bio-Rad) beschickt war, gegeben, wobei Wasser/n-Propanol (7/3) als Lösungsmittel verwendet wurde. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in heißem Methanol gelöst und Wasser wurde bis zur Bildung eines Niederschlages zugegeben. Das Methanol wurde im Wasser abgezogen. Nach Stehenlassen über Nacht wurde die Suspension filtriert. Der Filterkuchen enthielt den Hauptteil des Produktes. Das Filtrat wurde evaporiert und das vorhergehende Verfahren wurde wiederholt, um das verbleibende Produkt auszufällen. Die Filterkuchen wurden vereinigt und in Wasser suspendiert. Lyophilisieren ergab die Titelverbindung.

Schmelzpunkt: 198–200°C (Zersetzung)

UV λ_{\max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 0,1 N HCl, 275 (11,1); 257 (sh); pH 7, 275 (11,1); 258 (sh); 0,1 N NaOH, 276 (9,98), 257 (sh), 303 (sh)

Analyse für $C_{10}H_{10}FIN_4O_3$

berechnet: C 31,60; H 2,65; N 14,74; F 5,00; I 33,39

gefunden: C 31,70; H 2,70; N 14,69; F 4,96; I 33,48

1H -NMR (80 MHz, Me_2SO-d_6): δ 8,87 und 8,66 (2s, 2H, H-8 und H-2); 6,35 (dd, 1H, H-1', JF,1' = 17,0 Hz, J = 2,0 Hz); 5,76 (m, 1,5H, 0,5 (H-2') und 3'-OH); 5,14 (m, 1,5H, 0,5 (H-2') und 5'-OH); 4,51 (m, 1H, H-3'); 3,99 (m, 1H, H-4'); 3,70 (m, 2H, H_a-5' und H_b-5').

Beispiel 24

Herstellung von 9-(2-Deoxy-2-fluor-5-O-L-valinyl- β -D-ribofuranosyl)-adenin und seines Bishydrochloridsalzes

Zu einer Lösung von 9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin (500 mg, 1,86 mMol), FMOC-L-valin (820 mg, 1,3 eq.) und DMAP (10 mg) in trockenem DMF (14 ml) wurde bei 0°C eine Lösung von DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) (520 mg, 1,35 eq.) in CH_2Cl_2 (2 ml) unter Rühren zugegeben. Man ließ die Mischung Raumtemperatur erreichen, rührte 90 Minuten und evaporierte anschließend *in vacuo*. Nach Coevaporation mit Ethanol wurde der Rückstand in $CHCl_3/MeOH$ (9:1) aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde anschließend evaporiert und über SiO_2 unter Verwendung der Flash-Technik chromatographiert, wobei mit einem Gradienten von EtOH in $CHCl_3$ (5%–10%) eluiert wurde.

Die erste eluiert Fraktion war der 3',5'-Bisester (230 mg), der etwas Dicyclohexylharnstoff enthielt. Die zweite Fraktion bestand aus dem 3'-Monoester, und die dritte Fraktion bestand aus dem 5'-Monoester (190 mg).

Der durch 5'-Fmoc geschützte Valinatester wurde anschließend mit einer Piperidinlösung (1 ml) in DMF (4 ml) bei Raumtemperatur für 5 Minuten behandelt, in vacuo evaporiert, in Wasser (25 ml) gelöst und mit CHCl_3 (30 ml) gewaschen. Das Wasser wurde evaporiert, und es ergab sich ein farbloser Gummi, der in wäßriger Essigsäure aufgenommen wurde, mit Ethanol und Ether evaporiert und coevaporiert wurde und den 5'-O-Valinatester in Form eines hygroskopischen, amorphen Feststoffes (100 mg) ergab.

Schmelzpunkt: Zersetzung oberhalb 150°C
 Analyse für $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{FN}_6\text{O}_4 \cdot 1,5 \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$
 berechnet: C 44,53; H 6,23; N 17,32
 gefunden: C 44,38; H 6,32; N 16,94

Das Bishydrochloridsalz wurde durch Auflösen von 5'-O-Valinatester in Isopropanol und nachfolgender Zugabe von Isopropanol, das zuvor mit Chlorwasserstoffgas gesättigt wurde, sowie Verdampfen des Lösungsmittels hergestellt. Der weiße Feststoff wurde anschließend in MeOH aufgenommen und mit Ether bei 0°C ausgefällt. Die Filtration ergab das Bishydrochloridsalz.

Schmelzpunkt: 210–213°C (Zersetzung)
 Analyse für $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{FN}_6\text{O}_4 \cdot 2 \text{HCl} \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$
 berechnet: C 40,00; H 5,37; N 18,67
 gefunden: C 40,26; H 5,19; N 18,74

Beispiel 25

2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-9H-purinbishydrochlorid

Zu einer Lösung von 2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-9H-purin (300 mg, 1,11 mMol) in MeOH (20 ml) wurde Isopropanol (2,5 ml), das zuvor mit Chlorwasserstoffgas gesättigt wurde, zugegeben. Aceton (15 ml) wurde zugegeben, und die Lösung wurde bis zur weitgehenden Trocknung im Vakuum bei Raumtemperatur evaporiert. Zerreiben mit Ethylacetat (15 ml) ergab einen weißen Feststoff, der filtriert und mit Ether gewaschen wurde.

Schmelzpunkt: 160–163°C (Zersetzung)
 Analyse für $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FN}_5\text{O}_3 \cdot 2 \text{HCl}$
 berechnet: C 35,01; H 4,12; N 20,42; F 5,55
 gefunden: C 34,79; H 4,23; N 20,32; F 5,66

Beispiel 26

2,6-Diamino-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-9H-purinbishydrochlorid

Zu einer Lösung von 2,6-Diamino-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-9H-purin (300 mg, 1,06 mMol) in MeOH (30 ml) wurde zuvor mit HCl-Gas gesättigtes Isopropanol (2 ml) zugegeben. Die Lösung wurde auf ein kleines Volumen (5 ml) bei Raumtemperatur eingeeengt und EtOH (15 ml) zur Ausfällung des Bishydrochlorids in Form eines weißen Feststoffes zugegeben.

Schmelzpunkt: 165–168°C (Zersetzung)
 Analyse für $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FN}_6\text{O}_4 \cdot 2 \text{HCl}$
 berechnet: C 33,62; H 4,23; N 23,53; F 5,32
 gefunden: C 33,54; H 4,24; N 22,98; F 5,33

Beispiel 27

9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin-Natriumsalz

Zu 9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin (50 mg, 0,175 mMol) wurde eine Lösung von NaOH (7 mg) in Wasser (2 ml) zugegeben und die Mischung wurde bis zum Erhalt einer klaren Lösung leicht erwärmt. Die Lösung wurde anschließend lyophilisiert und ergab die Titelverbindung in Form eines weißen Feststoffes.

Schmelzpunkt: 185–190°C (Zersetzung)
 Analyse für $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{FN}_5\text{O}_4\text{N} \cdot 1,75 \text{H}_2\text{O}$
 berechnet: C 35,45; H 4,31; N 20,67
 gefunden: C 35,59; H 4,33; N 20,64

Beispiel 28

9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guaninhydrochlorid

Zu einer Lösung von 9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin (300 mg, 1,05 mMol) in MeOH (200 ml) wurde eine zuvor mit HCl-Gas gesättigte Isopropanollösung (2 ml) und anschließend Aceton (50 ml) zugegeben. Die Lösung wurde auf ein kleines Volumen (30 ml) eingedampft, Aceton (150 ml) wurde zugegeben und die Mischung wurde nochmals auf ein kleines Volumen eingeeengt. Dies wurde wiederholt bis ein abschließendes Volumen von 10 ml erhalten wurde. Dann wurden 20 ml EtOH und nachfolgend 40 ml EtOAc zugegeben. Beim Stehenlassen fiel das Produkt in Form eines weißen Feststoffes aus.

Schmelzpunkt: 192–193°C (Zersetzung)
 Analyse für $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FN}_5\text{O}_4\text{HCl} \cdot 0,4 \text{H}_2\text{O}$
 berechnet: C 36,51; H 4,23; N 21,29; Cl 10,77
 gefunden: C 36,50; H 4,54; N 21,36; Cl 10,90

Beispiel 29

9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)adeninhydrochlorid

Zu einer Lösung von 9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)adenin (500 mg, 1,86 mMol) in MeOH (40 ml) und Wasser (10 ml) wurde eine zuvor mit HCl-Gas gesättigte Isopropanollösung (15 ml) zugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur im Vakuum evaporiert, mit EtOH (25 ml) zerrieben und ergab die Titelverbindung in Form eines weißen Feststoffes.

Schmelzpunkt: 205–210°C (Zersetzung)

Analyse für $C_{10}H_{12}FN_6O_3 \cdot HCl$

berechnet: C 39,29; H 4,29; N 22,91; Cl 11,60

gefunden: C 39,36; H 4,34; N 22,89; Cl 11,52

Beispiel 30

9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin-5'-monophosphat

9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin (gemäß Beispiel 8, 0,47 g, 1,7 mMol) wurde in 7 ml 1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinon gelöst. Nach Abkühlen dieser Lösung auf -8°C in einem Eis/Methanol-Bad wurden 0,64 ml Phosphoroxchlorid (7 mMol) unter starkem Rühren zugegeben. Nach drei Minuten wurde die Umsetzung durch Zugabe von 10 ml kaltem Wasser beendet. Diese Reaktionsmischung wurde 15 Minuten auf Eis belassen und anschließend mit Ammoniumhydroxid bis zu einem pH-Wert von 8 neutralisiert.

Die Trennung der Reaktionsprodukte wurde unter Verwendung der Anionenaustauschchromatographie auf DEAE Sephadex A-25 durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde auf 600 ml mit Wasser verdünnt und auf eine Chromatographiesäule gegeben, die etwa 80 ml DEAE Sephadex A-25 enthielt, die zuvor in 50 mM Ammoniumbicarbonat equilibriert wurde. Die Säule wurde mit 2,5 l einer 50 mM Ammoniumbicarbonatlösung zur Entfernung anorganischer Phosphate gewaschen. Die Nucleotide wurden mit einem linearen 2 L Gradienten von 50–500 mM Ammoniumbicarbonatlösung eluiert. 9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin-5'-monophosphat wurde zuerst und nachfolgend wurde 9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin-3',5'-Bisphosphat eluiert. Die Fraktionen, die jedes Nucleotid enthielten, wurden gesammelt und in vacuo getrocknet, um Wasser und Ammoniumbicarbonat zu entfernen.

9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin-5'-monophosphat wurde in Form des Ammoniumsalzes gemäß des vorhergehenden Schemas erhalten, jedoch war das Natriumsalz in diesem Fall das pharmakologisch gewünschte Salz. Das Ammoniumsalz wurde gegen Natrium ausgetauscht unter Verwendung eines Dowex 50 Austauschharzes. 9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin-5'-monophosphat (1,3 mMol) in 10 ml Wasser wurde auf eine Säule gegeben, die etwa 10 ml BioRad AG 50 W-X8 (Natriumform) enthielt, das zuvor mit Wasser equilibriert wurde. Das Nucleotid wurde mit Wasser eluiert. Die Fraktionen, die das 9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin-5'-monophosphat enthielten, wurden vereinigt, lyophilisiert und ergaben 0,49 g (1,2 mMol, 72% Ausbeute).

$^1\text{H-NMR}$ d (d_6 -DMSO) δ 8,0 (1H, s, H2), 7,7 (1H, s, H8), 5,7 und 5,9 (1H, dd, H1', Aufspaltung bei H2', F), 4,8 und 5,0 (1H, dd, H2', Aufspaltung bei H1', F), 4,1 (1H, m, H3'), 3,9 (1H, m, H4'), 3,6 (2H, m, H5')

$^1\text{H-NMR}$ d (D_2O) 8,5 (1H, s, H2), 8,2 (1H, s, H8), 6,3 und 6,5 (1H, d, H1', Aufspaltung bei H2', F), 5,3 und 5,6 (1H, d, H2', Aufspaltung bei H1', F), 4,7 (1H, m, H3'), 4,4 (1H, m, H4'), 4,1 (2H, m, H5')

$^{31}\text{P NMR}$ δ (D_2O) 1,46 (s)

UV-Spektrum: in 0,1 M HCl, λ_{max} bei 256 nm; in 400 mM Ammoniumphosphat, pH 5,5, λ_{max} bei 259 nm; in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, λ_{max} bei 259 nm; in 0,1 M NaOH, λ_{max} bei 259 nm.

Das Massenspektrum zeigte zwei Haupt-Peaks bei Molekül-Ionen-Fragmentgewichten von 270 und 136 entsprechend 9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin.

Die totale Trennung zu den Nucleosiden wurde nach Inkubation mit 5'-Nucleotidase (Sigma) beobachtet.

Base/Phosphat-Verhältnis = 1,00/1,03. Die Konzentration an Gesamtphosphat wurde mittels des Verfahrens nach Ames, B. N. in *Methods in Enzymology* Vol. 8 pp. 115–118, 1966, bestimmt. Die Konzentration der Nucleobase wurde bestimmt unter Verwendung des UV-Extinktionskoeffizienten des Nucleosids.

Beispiel 31

9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin-5'-monophosphat (FMAP)

9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin (gemäß Beispiel 8, 1,2 mg, 4,3 mMol), 22 μMol p-Nitrophenylphosphat (1 M Stammansatz wurde mit Essigsäure auf pH 5,4 eingestellt) und 0,05 ml Nucleosidphosphotransferase aus *Serratia marcescens* (A. Fyfe, et al., *J. Biol. Chem.* 253, 8721–8727, 1978 und US Patent 4.136.175 Jan 23, 1979) wurden mit Wasser zusammengegeben auf ein Volumen von 22 ml. Es wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gesamte Umsetzung wurde auf eine präparative Dünnschichtchromatographieplatte aus Cellulose aufgebracht und anschließend in n-Propanol/15 M $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$: 6/3/1 entwickelt. Nach Trocknen der Platte wurde das das Nucleotid enthaltende Gebiet abgekratzt und das Nucleotid wurde aus der Cellulose mit Wasser eluiert. Das 9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin-5'-monophosphat wurde mit 1,1 μMol in einer Ausbeute von 25% erhalten.

UV-Spektrum: λ_{max} , 257 nm in Wasser.

Diese Verbindung wurde mittels alkalischer Phosphatase und 5'-Nucleotidase vollständig gespalten und ergab das Nucleosid 9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin.

Das Basen/Phosphatverhältnis betrug 1/8 und zeigte eine Verunreinigung durch anorganische Phosphate an.

Beispiel 32

9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin-3',5'-bisphosphat

Das 9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin-3',5'-bisphosphat wurde in Form des Ammoniumsalzes nach Evaporation der Fraktionen aus der Ionen-Austausch-Säule (nach Beispiel 30) erhalten (0,35 mM, 20% Ausbeute).

Dies wurde durch das Fleckenmuster charakterisiert, das bei der TLC beobachtet wurde nach der Inkubation mit Nuclease P1 (Boehringer Mannheim), alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim), 3-Nucleotidase (Sigma) und 5'-Nucleotidase.

Alkalische Phosphatase spaltete 9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin-3',3'-bisphosphat in die Eltern-Nucleoside; Nuclease P1 und 3-Nucleotidase spalteten es in 9-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)adenin-5'-monophosphat und 5'-Nucleotidase spaltete es nicht. Diese Ergebnisse sind mit dem über diese Enzyme und andere bekannte Nucleosidphosphatanaloga Bekanntem übereinstimmend.

UV-Spektrum: λ_{max} = 259 nm, in 400 mM Ammoniumphosphat; pH-Wert: 5,5

Beispiel 33**9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin-5'-monophosphat**

9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin (gemäß Beispiel 7, 0,9g, 2,9 μMol), 15 μMol p-Nitrophenylphosphat (1 M Stammlösung, die mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,4 eingestellt war) und 0,04 ml Nucleosidphosphotransferase von *Serratia marcescens* (Fyfe, et al., J. Biol. Chem. 253, 8721–8727, 1978 und US-Patent 4.136.175, Jan. 23, 1979) wurden mit Wasser zusammengegeben zu einem Endvolumen von 0,15 ml. Es wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gesamte Umsetzung wurde auf eine präparative Dünnschichtchromatographieplatte aus Cellulose aufgebracht und anschließend in n-Propanol/15 M NH₄OH/H₂O: 6/3/1 entwickelt. Nach dem Trocknen der Platte wurde das, das Nucleotid enthaltende Gebiet abgekratzt, und das Nucleotid wurde aus der Cellulose mit Wasser eluiert. Es wurden 0,33 μMol 9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin-5'-monophosphat erhalten, Ausbeute: 11%.

UV Spektrum: λ_{max} = 248 nm, in Wasser; λ = 267 nm, Schulter

Diese Verbindung wurde mittels alkalischer Phosphatase und 5'-Nucleotidase vollständig gespalten und ergab das Nucleosid 9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin.

Das Verhältnis Base/Phosphat betrug 1/30 und zeigte eine Verunreinigung durch anorganische Phosphate an.

Beispiel 34**9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin-5'-monophosphat (FGMP)**

9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin (0,0158 g, 5,2 × 10⁻⁶ Mol) wurden in 0,2 ml Triethylphosphat gelöst und auf -8°C abgekühlt. Phosphoroxchlorid (0,015 ml, 1,6 × 10⁻⁴ Mol) wurden auf einmal unter Rühren dem zum Schutz vor Licht mit Aluminiumfolie abgedeckten Reaktionsgefäß zugegeben. Man ließ die Temperatur auf 0°C einstellen und rührte 4 Std. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von Eis unterbrochen, und der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7 eingestellt. Diese wässrige Lösung wurde mit CHCl₃ mit 2 ml × 2 ml extrahiert. Der pH-Wert der wässrigen Lösung wurde auf 7,5 eingestellt. Diese Verbindung wurde ähnlich wie die 2'-FAMP-Verbindung in Beispiel 30 mittels der DEAE-Sephadex-Chromatographie gereinigt, mit der Ausnahme, daß ein 50–600 mM Ammoniumbicarbonat-Gradient verwendet wurde. Die Ausbeute betrug 40%, d. h. 9 mg oder 0,02 mM.

UV Spektrum: λ_{max} = 254 nm, in 0,1 M HCl; Schulter bei 275 nm.

Diese Verbindung wurde mittels alkalischer Phosphatase und 5'-Nucleotidase vollständig gespalten und ergab das Nucleosid 9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin.

Verhältnis Base/Phosphat = 1,0/90

Beispiel 35**9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin-5'-triphosphat (FGTP)**

Das Triphosphat wurde aus dem 5'-Monophosphat enzymatisch synthetisiert. 5 mg (12 μMol) 2'-FGMP gemäß Beispiel 34 wurden bei 37°C in einem Endvolumen von 2 ml inkubiert mit (Endkonzentration): 10 mM Adenosintriphosphat, 50 mM Kalium PIPES, pH 6,8, 10 mM Phosphoenolpyruvat, 41 U./ml Nucleosiddiphosphatkinase (Boehringer-Mannheim) und 201 U./ml Pyruvatkinase (Boehringer Mannheim). Geringe Mengen an 9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin-5'-diphosphat (FGDP) wurden mittels analytischer Ionen-Austausch-HPLC beobachtet, das Hauptprodukt bestand jedoch aus 9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin-5'-triphosphat. Dieses wurde mittels präparativer Ionen-Austausch HPLC auf einer Whatman Partisil SAX Magnum 9 Säule mit einem Gradienten von 10 mM–1 M Kaliumphosphat bei einem pH-Wert von 3,5 eluiert. Die das 2'-FGTP enthaltenden Fraktionen wurden, wie in Beispiel 30 beschrieben, auf DEAE Sephadex weiter gereinigt. Nach dem Trocknen der Fraktionen wurden 7 mg 2'-FGTP in Form des Diammoniumsalzes erhalten (80%, 10 Mol).

UV Spektrum: λ_{max} = 254 nm in 0,1 M HCl; Schulter bei 275 nm; λ_{max} = 255–262 nm in 0,1 M NaOH.

Verhältnis Base/Phosphat = 1,0/2,5

Beispiel 36**9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin-5'-triphosphat**

50 mg (120 μMol) 2'-FGMP, das auf analoge Weise wie in Beispiel 34 beschrieben hergestellt wurde, wurde in einem Endvolumen von 20 ml bei einer Temperatur von 37°C inkubiert mit (Endkonzentration): 10 mM Adenosintriphosphat, 50 mM Kalium PIPES, pH-Wert 6,8, 10 mM MgCl₂, 12,5 mM Phosphoenolpyruvat, 41 U./ml Nucleosiddiphosphatkinase (Boehringer Mannheim), 0,771 U./ml Guanilatkinase (Boehringer Mannheim) und 201 U./ml Pyruvatkinase (Boehringer Mannheim). Geringe Mengen an 9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin-5'-diphosphatester wurden mittels analytischer Ionen-Austausch-HPLC beobachtet, das Hauptprodukt bestand jedoch aus 9-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)guanin-5'-triphosphat. Dieses wurde isoliert unter Verwendung präparativer Ionen-Austausch-HPLC auf einer Whatman Partisil SAX Magnum 9 Säule, die mit einem Gradienten von 10 mM–1 M Kaliumphosphat bei einem pH-Wert von 3,5 eluiert wurde. Die das 2'-FHTP enthaltenden Fraktionen wurden wie in Beispiel 30 beschrieben auf DEAE Sephadex weiter gereinigt. Nach dem Trocknen der Fraktionen wurden 50 mg 2'-FGTP in Form des Diammoniumsalzes erhalten, das mit 2'-GDP und Adenosintriphosphat verunreinigt war. Eine erneute Reinigung mittels präparativer HPLC und nachfolgend mittels DEAE Sephadex wurde durchgeführt. Es ergab sich in 50%iger Ausbeute (36 mg, 63 μMol) das Triammoniumsalz.

UV-Spektrum: λ_{max} = 254 nm in 0,1 M HCl; λ = 275 nm: Schulter

Verhältnis Base/Phosphat = 1,0/2,9

Beispiel 37**2,6-Diamino-9-(2-deoxy-2-fluor-3,5-di-O-pivaloyl-β-D-ribofuranosyl)-9H-purin und 2,6-Diamino-9-(2-deoxy-2-fluor-5-O-pivaloyl-β-D-ribofuranosyl)-9H-purin**

Zu einer Lösung von 2,6-Diamino-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-9H-purin (100 mg, 0,35 mMol) in einer Lösung aus DMF (3 ml) und Et₃N (0,3 ml) wurde Trimethylacetanhydrid (78 μl) zugegeben, und die Lösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wurden weitere 80 μl Trimethylacetanhydrid zugegeben, und die Lösung wurde für weitere 3 Tage gerührt. Die Mischung wurde dann mit MeOH gelöst, in vacuo evaporiert und über Flash-SiO₂ chromatographiert. Eluiert wurde

mit w/CHCl₃; CHCl₃/MeOH (30:1), (20:1), (10:1), (6:1), (4:1) und abschließend (3:1). Der Bisester ergab sich hierbei in Form eines farblosen, halbfesten Stoffes (74 mg) nach Zerreiben mit Ether.

Schmelzpunkt: 143–145°C (Zers.)

Massenspektrum (hochauflösend, E.I.): C₁₆H₂₁FN₆O₄

berechnet: 368,1608

gefunden: 368,1612

Durch Sammeln und Evaporieren der geeigneten Fraktionen erhielt man ebenfalls den mono-5'-pivalatester (16 mg).

Schmelzpunkt: 123–125°C

Hochauflösendes Massenspektrum (E.I.): C₂₀H₂₉FN₆O₆

berechnet: 452,2183

gefunden: 452,2183

Beispiel 38

2-Amino-6-benzylamino-9-(2'-deoxy-2'-fluor-β-D-ribofuranosyl)-9H-purin

2-Amino-6-benzylaminopurin (0,2 g, 0,83 mMol) und 1-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)uracil (0,244 g, 1 mMol) wurden mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8 zusammengegeben. 8200 Einheiten Thymidinphosphorylase und 7850 Einheiten Purinnucleosidphosphorylase (Krenitsky et al., *Biochemistry*, **20**, 3615, 1981 und US Patent 4.381.444) wurden zugefügt und die Mischung wurde 40 Std. bei 45°C gerührt. Die Produktisolierung war durch Zugabe von Methanol (15 ml), Entfernung der Feststoffe durch Filtration und Verdampfen des Methanols in Gegenwart von 10 ml Silicagel vervollständigt. Das trockene Gel wurde am Säulenkopf (Silica, 5 cm × 23 cm) aufgegeben und das Produkt wurde mit Chloroform (99:1) eluiert. Die nur das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen und ergab 0,087 g 2-Amino-6-benzylamino-9-(2'-deoxy-2'-fluor-β-D-ribofuranosyl)-9H-purin.

¹H-NMR (200 MHz): δ 7,95 (s, 1 H, H₈), 7,85 (b, 1 H, NH), 7,2–7,5 (m, 5 H, Phenyl), 6,04 (dd, 1 H, H_{1'}, J_{1',1''} = 16,4 Hz, J = 3,1 Hz), 5,93 (b, 2 H, NH₂), 5,64 (d, 1 H, OH, J = 5,9 Hz), 5,44, 5,17 (dt, 1 H, H_{2'}), 5,26 (t, 1 H, OH_{5'}), 4,64 (b, 2 H, CH₂), 4,38 (m, 1 H, H_{3'}), 3,9 (b, 1 H, H_{4'}), 3,5–3,75 (m, 2 H, H_{5'}).

Die Reduktion der vorstehenden Verbindung kann vervollständigt werden gemäß dem Verfahren nach V. du Vigneaud und O.K. Behrens, *J. Biol. Chem.* **117**, 27 (1937).

Beispiel 39

2-Amino-6-benzylthio-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-9-purin

2-Amino-6-benzylthiopurin (Sigma Chemical Company; 0,8 g, 3,1 mMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)uracil (0,4 g, 1,7 mMol), das nach J.F. Codington et al., (*J. Org. Chem.* **29**, 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 20 ml 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH-Wert 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthält, suspendiert. Thymidinphosphorylase (2 640 I.U.) und Purinnucleosidphosphorylase (4 360 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., *Biochemistry* **20**, 3615, 1981 und US Patent 4.281.344) wurden zugegeben und die Suspension wurde bei 37°C gerührt. Am 21. Tag wurde die Umsetzung auf 150 ml verdünnt mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH-Wert 7,0 der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthält, und es wurden 4 000 I.U. Thymidinphosphorylase und 6.500 I.U. Purinnucleosidphosphorylase zugegeben. Am 43. Tag wurde die Umsetzung mit Wasser auf 250 ml verdünnt und 2.000 I.U. Thymidinphosphorylase und 3.250 I.U. Purinnucleosidphosphorylase wurden zugegeben. Am 69. Tag wurde die Umsetzung mit KOH auf einen pH-Wert von 7,1 eingest. Am 77. Tag wurde die Umsetzung evaporiert. Der Rückstand wurde in heißem Methanol/Wasser gelöst und auf eine Säule eines Anionenaustauscharzes (Bio-Rad AG 1 X2-Hydroxidform) gegeben, und das Produkt wurde mit Methanol/Wasser (9/1) eluiert. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser gelöst (49/1) und auf eine Silicagelsäule 60 (EM Science) gegeben. Das Produkt wurde mit Acetonitril/Wasser (49/1) eluiert. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser suspendiert, lyophilisiert und ergab gemäß Analyse 0,201 g der Titelverbindung in Form eines 0,1 Hydrates.

Schmelzpunkt: 180°C

UV: λ_{max} nm (ε × 10⁻³): 0,1 N HCl, 322,5 (11,8), 250 (10,6); pH 7, 311,5 (14,2), 247 (14,3); 0,1 N NaOH, 312 (14,0), 247 (13,5)

Analyse für C₁₇H₁₈FN₆O₃S · 0,1 H₂O

berechnet: C 51,93; H 4,66; N 17,81; F 4,83; S 8,15

gefunden: C 51,96; H 4,66; N 17,86; F 4,68; S 8,15

¹H-NMR (300 MHz, Me₂SO-d₆): δ 8,19 (s, 1 H, H-8), 7,47 (anschl. d, 2 H, Ar, J = 7,6 Hz), 7,28 (m, 3 H, Ar), 6,74 (bs, 2 H, 2-NH₂), 6,10 (dd, 1 H, H-1', JF, 1' = 16,6 Hz, J = 2,4 Hz), 5,68 (d, 1 H, 3'-OH, J = 6,4 Hz), 5,32 (ddd, 1 H, H-2', JF, 2' = 53,0 Hz, J_{1',2'} = 2,4 Hz, J_{2',3'} = 4,4 Hz), 5,15 (t, 1 H, 5'-OH, J = 6,0 Hz), 4,55 (ab Quartett, 2 H, 6-SCH₂, geminal J = -13,7 Hz), 4,41 (m, 1 H, H-3'), 3,94 (m, 1 H, H-4'), 3,74 (m, 1 H, H_a-5'), 3,58 (m, 1 H, H_β-5').

Beispiel 40

2,6-Diamino-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-9H-purin

2,6-Diaminopurin (Pacific Chemical Laboratories, 2,0 g, 12,7 mMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)uracil (0,8 g; 3,3 mMol), die nach J.F. Codington et al. (*J. Org. Chem.* **29**: 558, 1964) herstellbar sind, wurden in 500 ml eines 5 mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthält, suspendiert. Thymidinphosphorylase (41 700 I.U.) und Purinnucleosidphosphorylase (83 300 I.U.) (T.A. Krenitsky et al., *Biochemistry* **20**: 3615, 1981 und U.S. Patent 4.381.344), die auf 10,5 g DEAE-Zellulose (25 ml) absorbiert waren, wurden zugegeben, und die Suspension wurde bei 37°C geschüttelt. Nach 24 Stunden wurden 2,0 g 1,6-Diaminopurin zugegeben, und die Temperatur wurde auf 50°C erhöht. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Umsetzung filtriert. Der Filterkuchen wurde mit Wasser gewaschen und die Filtrate vereinigt, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in heißem Wasser gelöst und der pH-Wert mit NH₄OH auf 9,4 eingestellt. Die Lösung wurde auf eine (2,5 cm × 13 cm)-Säule eines Anionenaustauscharzes (Bio-Rad AG 1 X2-Hydroxidform) gegeben. Nach Waschen der Säule mit Wasser wurde das Produkt mit Methanol/Wasser (9/1) eluiert. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen

wurden vereinigt und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, lypholisiert und ergab 0,89 g der Titelverbindung gemäß Analyse in Form eines 0,5 Hydrates.

Schmelzpunkt: 125–127°C

UV: λ_{max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): pH 7, 279,5 (9,52), 256 (9,06)

Analyse für $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FN}_6\text{O}_3 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$

berechnet: C 40,96; H 4,81; N 28,66; F 6,48

gefunden: C 41,03; H 4,80; N 28,69; F 6,50

Die Struktur wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ weiterhin bestätigt.

Beispiel 41

2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-9H-purin

2-Aminopurin (Pacific Chemical Laboratories, 3,0g, 22,2nMol) und 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil (0,5g; 2,0mMol), die nach J.F.Codington et al. (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar sind, wurden in 25ml eines 5mM Kaliumphosphatpuffers, pH 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Thymidinphosphorylase (41.700I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (83300I. U.) (T.A.Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U.S. Patent 4.381.344), die auf 10,5g DEAE-Zellulose (25ml) absorbiert waren, wurden zugegeben, und die Suspension wurde bei 37°C geschüttelt. Nach 24 Stunden wurden 3,0g 2,6-Diaminopurin zugegeben, und die Temperatur wurde auf 50°C erhöht. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Umsetzung filtriert. Der Filterkuchen wurde mit Wasser gewaschen und die Filtrate vereinigt, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser suspendiert und filtriert. Der Filterkuchen wurde mit Wasser (25°C) extrahiert, bis kein Produkt mehr in dem Filterkuchen verblieb. Die Filtrate wurden zusammengegeben, der pH-Wert wurde mit NH_4OH auf 9,4 eingestellt, und die Lösung wurde auf eine (2,5cm \times 20cm)-Säule eines Anionenaustauscharztes (Bio-Rad AG 1X2-Hydroxidform) gegeben. Nach Waschen der Säule mit Wasser wurde das Produkt mit Methanol/Wasser (9/1) eluiert. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Chloroform/Methanol/Wasser (75:25:4) gelöst und auf eine (5cm \times 25cm)-Silicagel 60-Säule gegeben. Das Produkt wurde mit Chloroform/Methanol/Wasser (75:25:4) eluiert. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in heißem Wasser gelöst und durch ein 0,22- μm -Porenmembranfilter filtriert. Lypholisieren des Filtrats ergab 0,5g der Titelverbindung, das gemäß Analyse in Form eines 0,5 Hydrates vorlag.

Schmelzpunkt: 153–155°C

UV: λ_{max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): pH 7, 304 (6,35), 243,5 (5,95)

Analyse für $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FN}_6\text{O}_3 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$

berechnet: C 43,17; H 4,71; N 25,17; F 6,83

gefunden: C 43,08; H 4,74; N 25,11; F 6,89

Die Struktur wurde weiterhin mittels $^1\text{H-NMR}$ bestätigt.

Beispiel 42

2-Amino-9-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-6-methoxy-9H-purin

2-Amino-6-methoxypurin (2,0g, 12mMol), das nach R.W.Balsiger und J.A.Montgomery (J. Org. Chem. 20: 1573, 1960) herstellbar ist, und 1-(2-Deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)uracil (0,88g, 3,6mMol), das nach J.F.Codington et al., (J. Org. Chem. 29: 558, 1964) herstellbar ist, wurden in 250ml eines 5mM Kaliumphosphatpuffers, pH-Wert 7,0, der 0,04% (w/v) Kaliumazid enthielt, suspendiert. Der pH-Wert der Suspension wurde mit KOH auf 7,0 eingestellt. Thymidinphosphorylase (41700I. U.) und Purinnucleosidphosphorylase (83300I. U.) (T.A.Krenitsky et al., Biochemistry 20: 3615, 1981 und U.S. Patent 4.381.344), die auf 10,5g DEAE-Zellulose (25ml) absorbiert waren, wurden zugegeben und die Suspension wurde bei 37°C geschüttelt. Nach 24 Stunden wurden 1,0g 2-Amino-6-methoxypurin und 250ml des vorstehend genannten Puffers zugegeben und die Temperatur wurde auf 50°C erhöht. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Umsetzung filtriert. Der Filterkuchen wurde mit Wasser gewaschen, die Filtrate wurden vereinigt und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in warmem Wasser gelöst und der pH-Wert mit NH_4OH auf 9,4 eingestellt. Die Lösung wurde auf eine (2,5cm \times 15cm)-Säule eines Anionenaustauscharztes (Bio-Rad AG 1X2-Hydroxidform) gegeben. Nach Waschen der Säule mit Wasser wurde das Produkt mit Methanol/Wasser (9/1) eluiert. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in warmem Wasser/Methanol gelöst und durch ein 0,22- μm -Porenylonmembranfilter filtriert. Lypholisieren des Filtrats ergab 0,91g der Titelverbindung gemäß Analyse in Form eines 0,5 Hydrates.

Schmelzpunkt: 200°C

UV: λ_{max} nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): pH 7, 279,5 (9,24), 247,4 (9,99)

Analyse für $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{FN}_6\text{O}_4 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$

berechnet: C 42,86; H 4,90; N 22,72; F 6,16

gefunden: C 42,93; H 4,90; N 22,73; F 6,15

Die Struktur wurde weiterhin durch $^1\text{H-NMR}$ bestätigt.

Beispiel 43

2-Amino-6-benzyloxy-9-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-9H-purin

2-Amino-6-benzyloxy-purin (2,5g, 10,3mMol) und 2'-Deoxy-2'-fluoruridin (2,64g, 10,8mMol) wurden mit 50ml eines 10mM Kaliumphosphatpuffers, pH 6,8, zusammengegeben. 8000 Einheiten Thymidinphosphorylase und 21600 Einheiten Purinnucleosidphosphorylase wurden zugegeben, und die Mischung wurde bei 45°C gerührt. Nach 5 Tagen wurden zusätzliche 16000 Einheiten Thymidinphosphorylase und 21600 Einheiten Purinnucleosidphosphorylase zugegeben, und die Reaktionsinhalte wurden bei 45°C 48 Stunden gerührt. Der Hauptanteil des Produkts war in dem Niederschlag enthalten, der mittels Filtration gewonnen und in Methanol gelöst wurde. Das Produkt wurde mittels Chromatographie auf Silicagel mit Ethylacetat:Chloroform:Methanol (8:1:1) als mobile Phase isoliert. Die nur das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel wurde abgezogen, und es ergaben sich 1,44g 2-Amino-6-benzyloxy-9-(2-deoxy-2-fluor- β -D-ribofuranosyl)-9H-purin.

¹H-NMR (200MHz in DMSO): δ 8,11 (s, 1 H, H₈), 7,3-7,5 (m, 5 H, phenyl), 6,59 (b, 2 H, NH₂), 6,09 (dd, 1 H, H1', JF, 1' = 16,5 Hz, J = 2,6 Hz), 5,66 (d, 1 H, OH, J = 6,1 Hz), 5,48 (s, 2 H, CH₂), 5,25, 5,53 (hd, 1 H, H2'), 5,20 (m, 1 H, OH₅), 4,3-4,5 (m, 1 H, H₃'), 3,9 (b, 1 H, H₄'), 3,5-3,8 (m, 2 H, H₆').

Die Freisetzung der Verbindung gemäß Beispiel 7 aus 2-Amino-6-benzyloxy-9-(2-deoxy-2-fluor-β-D-ribofuranosyl)-9H-purin ist gemäß den Verfahren nach E 1 Amin et al., J. Org. Chem., 44, 3442 (1979) durchführbar.

Pharmazeutische Zubereitungen

In den folgenden Beispielen für eine Zubereitung kann der „Aktive Bestandteil“ jede Verbindung gemäß Formel (I) oder deren pharmazeutisch annehmbares Salz sein, beispielsweise Verbindungen gemäß den Beispielen 6, 7, 9 und 12.

Beispiel 44

Tablettenzubereitung

Die folgenden Zubereitungen A, B und C sind durch Naß-Granulation der Bestandteile mit der Povidonlösung, nachfolgender Zugabe von Magnesiumstearat und Kompression hergestellt.

Zubereitung A

	<u>mg/Tablette</u>	<u>mg/Tablette</u>
(a) Aktiver Bestandteil	250	250
(b) Laktose B. P.	210	26
(c) Povidon B. P.	15	9
(d) Natrium-Stärke-Glycollat	20	12
(e) Magnesiumstearat	5	3
	<u>500</u>	<u>300</u>

Zubereitung B

	<u>mg/Tablette</u>	<u>mg/Tablette</u>
(a) Aktiver Bestandteil	250	250
(b) Laktose	150	-
(c) Avicel PH 101	60	26
(d) Povidon B. P.	15	9
(e) Natrium-Stärke-Glycollat	20	12
(f) Magnesiumstearat	5	3
	<u>500</u>	<u>300</u>

Zubereitung C

	<u>mg/Tablette</u>
Aktiver Bestandteil	100
Laktose	200
Stärke	50
Povidon	5
Magnesiumstearat	4
	<u>359</u>

Die folgenden Zubereitungen D und E werden durch direktes Zusammenpressen der gemischten Bestandteile erhalten.

Zubereitung D

	<u>mg/Kapsel</u>
Aktiver Bestandteil	250
Vorgelatinierte Stärke NF1%	150
	<u>400</u>

Zubereitung E

	<u>mg/Kapsel</u>
Aktiver Bestandteil	250
Laktose	150
Avicel	100
	<u>500</u>

Zubereitung F (Zubereitung mit kontrollierter Freisetzung)

Die Zubereitung wird durch Nassgranulation der nachfolgenden Bestandteile mit einer Povidonlösung und nachfolgender Zugabe von Magnesiumstearat und Zusammenpressen erhalten.

	<u>mg/Tablette</u>
(a) Aktiver Bestandteil	500
(b) Hydroxypropylmethylcellulose (Methocel K4 M Premium)	112
(c) Laktose B. P.	53
(d) Povidon B. P. C.	28
(e) Magnesiumstearat	7
	<u>700</u>

Die Freisetzung der Droge erfolgte über einen Zeitraum von 6-8 Std. und ist nach 12 Std. abgeschlossen.

Beispiel 45 (Kapselzubereitungen)

Zubereitung A

Eine Kapselzubereitung wird durch Vermischen der Bestandteile der Zubereitung D in Beispiel 4 und Einfüllen in eine zweiteilige Hartgelatine kapsel hergestellt.

Zubereitung B

	<u>mg/Kapsel</u>
(a) Aktiver Bestandteil	250
(b) Laktose B. P.	143
(c) Natrium-Stärke-Glykollat	25
(d) Magnesiumstearat	<u>2</u>
	420

Die Kapseln werden durch Vermischen der vorstehend genannten Bestandteile und Einfüllen in eine zweigeteilte Hartgelatine kapsel hergestellt.

Zubereitung C

	<u>mg/Kapsel</u>
(a) Aktiver Bestandteil	250
(b) Macrogol 4000 BP	350

Die Kapseln werden durch Schmelzen des Macrogols 4000 BP, Dispergieren des aktiven Bestandteils in der Schmelze und Einfüllen der Schmelze in eine zweigeteilte Hartgelatine kapsel hergestellt.

Zubereitung D

	<u>mg/Kapsel</u>
Aktiver Bestandteil	250
Lecithin	100
Arachisöl	<u>100</u>
	450

Die Kapseln werden durch Dispergieren des aktiven Bestandteils in Lecithin/Arachisöl und Einfüllen der Dispersion in weiche, elastische Gelatine kapseln hergestellt.

Zubereitung E (Kapseln mit kontrollierter Freisetzung)

Die folgende Kapselzubereitung mit kontrollierter Freisetzung wird durch Extrudieren der Bestandteile (a), (b) und (c) unter Verwendung eines Extruders mit nachfolgender Sphäronisation des Extrudates und Trocknen hergestellt. Die getrockneten Pellets werden dann mit einer die Freisetzung kontrollierenden Membran (d) beschichtet und in eine zweiteistückige Hartgelatine kapsel eingefüllt.

	<u>mg/Kapsel</u>
(a) Aktiver Bestandteil	250
(b) Mikrokristalline Cellulose	125
(c) Laktose B. P.	125
(d) Ethylcellulose	13

Beispiel 46 (Injizierbare Zubereitung)

Zubereitung A

Aktiver Bestandteil	200 g
Salzsäurelösung, 0,1 M	eingestellt (q. s.) auf pH 4,0–7,0
Natriumhydroxidlösung, 0,1 M	eingestellt (q. s.) auf pH 4,0–7,0
Steriles Wasser	aufgefüllt (q. s.) auf 10 ml

Der aktive Bestandteil wird in dem größten Teil des Wassers (35°C–40°C) gelöst und der pH-Wert wird mit Salzsäurelösung bzw. der Natriumhydroxidlösung auf einen Wert zwischen 4,0 und 7,0 eingestellt. Der Ansatz wird anschließend mit Wasser bis zu dem gewünschten Volumen aufgefüllt und durch ein steriles Mikroporenfilter in eine 10 ml fassende, amberfarbene Glasampulle (Typ 1) filtriert und mit sterilen Verschlüssen und Dichtungen abgedichtet.

Zubereitung B

Aktiver Bestandteil	0,125 g
Steriler, pyrogenfreier Phosphatpuffer, pH 7,0	auf 25 ml

Beispiel 47

Intramuskuläre Injektion

Aktiver Bestandteil	0,20 g
Benzylalkohol	0,10 g
Glykofurfurol 75	1,45 g
Wasser für die Injektion	auf 3,00 ml

Der aktive Bestandteil wird in Glykofurfurol gelöst. Anschließend wird Benzylalkohol zugegeben, gelöst und mit Wasser auf 3 ml aufgefüllt. Die Mischung wird dann durch ein Mikroporenfilter filtriert und in 3 ml fassende Braunglasampullen (Typ 1) eingefüllt und abgedichtet.

Beispiel 48

Sirup

Aktiver Bestandteil	0,25 g
Sorbitlösung	1,50 g
Glycerin	2,00 g
Natriumbenzoat	0,005 g
Geschmacksstoff Pfirsich 17,42,3169	0,0125 ml
Gereinigtes Wasser	auf 3,00 ml

Der aktive Bestandteil wird in einer Mischung aus Glycerin und dem größten Teil des gereinigten Wasser gelöst. Anschließend wird zu der Lösung eine wäßrige Natriumbenzoatlösung zugegeben und nachfolgend die Sorbitlösung und abschließend der Geschmacksstoff zugefügt. Mit gereinigtem Wasser wird auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und gut durchgemischt.

Beispiel 49

Pulverkapseln zur Inhalation

Aktiver Bestandteil (0,5–70m Pulver)	4 mg
Laktose (30–90m Pulver)	46 mg

Die Pulver wurden zu einer homogenen Mischung vermischt und in geeignet ausgeformte Hartgelatine kapseln, in einer Menge von 50mg je Kapsel, eingefüllt.

Beispiel 50

Aerosol zur Inhalation

Aktiver Bestandteil (0,5–7,0m Pulver)	200 mg
Sorbittrioleat	100 mg
Saccharin-Natrium (0,5–7,0 m) Pulver)	5 mg
Menthol	2 mg
Trichlorfluormethan	4,2 g
Dichlordifluormethan aufgefüllt	auf 10 ml

Das Sorbittrioleat und das Menthol wurden in Trichlorfluormethan gelöst. Das Natriumsalz von Saccharin und der aktive Bestandteil wurden in der Mischung dispergiert und diese wurde anschließend in geeignete Aerosolbehälter eingefüllt und Dichlorfluormethan wurde durch das Ventilsystem eingespritzt. Diese Zusammensetzung stellt 2mg an aktivem Bestandteil pro 100µl Dosis zur Verfügung.

Antivirale Aktivität

Influenza A und B Stämme wurden in Monoschichten primärer Küken-Embryozellen in multiwell trays getestet. Die Aktivität der Verbindungen wurde in einem Ausbeute-Reduktions- oder in dem Plaque-Reduktionstest bestimmt, wobei eine Zellmonoschicht mit einer Suspension aus Influenza-Viren infiziert wurde und dann mit einem flüssigem Medium (Ausbeute-Reduktion) oder mit einem Agarnährboden in Form eines Gels überschichtet wurde, um sicherzustellen, daß keine Virenausbreitung durch die Kultur erfolgt. Ein Konzentrationsbereich der Verbindung bekannter Molarität wurde in die Oberschicht des Medium/Agarnährbodens eingebracht. Die Virenausbeute oder die Plaquezahlen jeder Konzentration werden als Prozentsatz der Kontrolle ausgedrückt und eine Dosis-Antwortkurve wird aufgezeichnet. Aus dieser Kurve wird die 50%-Inhibitorkonzentration (IC₅₀) bestimmt: Das Respirator-Synzytial-Virus (RSV) wird in BS-C-1-Zellen (Nierenzellen afrikanischer Grünaffen) mittels eines ähnlichen Plaque/Foci-Reduktionstests. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen I und II aufgeführt.

In vivo Inhibitor-Aktivität wurde für Influenza A- und B-Stämme mit einem intranasal/Lungenmodell bei Mäusen beurteilt. Die Mäuse wurden mit dem Virus in einer geschlossenen Box infiziert und danach mit den Testverbindungen zu verschiedenen Zeiten nach der Infizierung auf verschiedenen Wegen, einschließlich oral, intraperitoneal und mittels Aerosol, behandelt. Die Mäuse wurden nach 24 Std. getötet, und es wurden 10%ige Lungensuspensionen hergestellt, die auf Vorhandensein von Viren titriert wurden. Die Ergebnisse wurden aufgezeichnet als Verminderung des Virenwachstums im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

Literaturverzeichnis:

Appleyard, G., and Marber, H. B., Plaque Formation by Influenza Viruses in the presence of Trypsin, J. Gen. Vir. 25, 351–357 (1974). Collins, P., and Bauer, D. J., Relative Potencies of Anti-Herpes Compounds. Ann. N. Y. Acad. Sci. 284, 49–59 (1977). Hayden, F. G., Cotek, M., and Douglas, R. G., Plaque Inhibition Assay for Drug Susceptibility Testing of Influenza Viruses. Antimicro Agents and Chemo. 17 865–870 (1980), Tisdale, M., and Bauer, D. J., A comparison of test methods in influenza chemotherapy. J. Antimicrobio. Chemother. 1 suppl. 55–62 (1975).

Tabelle I

Beispiel	Verbindung	Anti-Influenza-Aktivität	
		CE Zellen IC ₅₀ M	Maus log 10 Reduktion im Virus-Titer (Durchschnitt 5 Mäuse)
6	OH OH NH ₂ NH ₂	0,6	+(2,1)
7	OH OH OH NH ₂	0,8–2	+(2,4)
8	OH OH OH NH ₂ H	4	+(2,3)
9	OH OH H NH ₂	–	+(1,6)
12	OH OH OMe NH ₂	0,4	+(1,9)

Tabelle II

Beispiel	Verbindung	Anti-Respirator-Synzytial-Virus
		BS-C-1-Zellen
		IC ₅₀ M
7	OH OH OH NH ₂	26,2
12	OH OH OMe NH ₂	6,3