



Republik  
österreich  
Patentamt

(11) Nummer: **AT 400 576 B**

(12)

# PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 410/91

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> : **C12P 19/38**

(22) Anmeldetag: 27. 2.1991

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 6.1995

(45) Ausgabetag: 25. 1.1996

(30) Priorität:

28. 2.1990 US 486701 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:

US 4835104A EP 0206497A2

(73) Patentinhaber:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY  
10154 NEW YORK (US).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BETA-(D)-2',3'-DIDESOXYINOSIN

(57) Neues Verfahren zur selektiven Herstellung von  $\beta$ -(D)-2',3'-Didesoxyinosin in hohen Ausbeuten aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ -anomeren Mischung von (D)-2',3'-Didesoxyadenosin durch Verwendung von Adenosindesaminase. Das gewonnene  $\beta$ -(D)-2',3'-Didesoxyinosin ist ein wertvolles antivirales und antibiotisches Mittel.

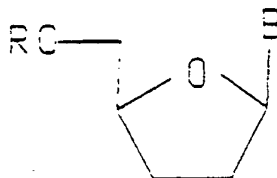
AT 400 576 B

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von  $\beta$ -(D)-2',3'-Didesoxyinosin.

In der Regel wird 2',3'-Didesoxycytidin (ddC) aus 2'-Desoxycytidin hergestellt 1,2. Dieses Verfahren stellt eine allgemeine Methode zur Synthese von 2,3'-Didesoxynucleosiden dar. Die Ausgangsmaterialien für diese Synthese sind jedoch extrem teuer und nicht in großen Mengen erhältlich. Die für die Desoxyge-

nerung erforderlichen Reagentien sind außerdem ziemlich kostspielig.

Ein noch nicht veröffentlichtes Verfahren zur Herstellung von 2',3'-Didesoxynucleosiden, die der Formel



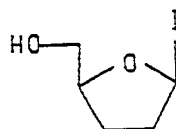
entsprechen, worin B für eine Purin- oder Pyrimidinbase und R für H oder eine Hydroxyschutzgruppe stehen, umfaßt die folgende Schritte: (a) Umwandlung eines -Carboxy- -butyrolactons in ein 5-O-Hydroxyschutzgruppe-Methyl- -butyrolacton, (b) Umwandlung des Zwischenproduktes aus Stufe (a) in die 5-O-Hydroxyschutzgruppe-Methyl-2',3'-didesoxypentofuranose, (c) Umwandlung des Zwischenproduktes aus (b) in die 1-O-Aktivierungsgruppe-5-O-Hydroxyschutzgruppe-Methyl-2',3'-didesoxypentafuranose, (d) Umwandlung des Zwischenproduktes aus Stufe (c) in die 1-Abspaltgruppe-5-O-Hydroxyschutzgruppe-2',3'-dideoxypentofuranose, (e) Umsetzung des Zwischenproduktes aus (d) mit einer aktivierten Purin- oder Pyrimidinbase und (f) Gewinnung des Didesoxynucleosids aus Stufe (e). Das entstehende Produkt umfaßt eine Mischung aus  $\beta$ - und  $\alpha$ -Anomeren, die durch Verwendung von chromatographischen und Kristallisationsverfahren, die auf dem Gebiet der vorliegenden Erfindung bekannt sind, getrennt werden können.

Es besteht jedoch nach wie vor ein Bedarf an Verfahrensverbesserungen, bei welchen das im allgemeinen aktive oder aktivere  $\beta$ -Anomere des (D)-2',3'-Desoxynucleosids selektiv erhalten werden kann, ohne die kostenaufwendige und zeitraubende chromatographische Trennung oder die Kristallisationstrennung der  $\beta$ - und  $\alpha$ -Anomeren durchführen zu müssen.

Diese Verbesserungen sind dann besonders wünschenswert, wenn große Mengen der angestrebten  $\beta$ -anomeren Form hergestellt werden sollen.

Inosin, das chemisch dem 9- $\beta$ -(D)-Ribofuranosylhypoxanthin entspricht, entsteht biochemisch bei der enzymatischen Deaminierung von Adenosin, der chemischen Verbindung 9- $\beta$ -(D)-Ribofuranosyl-6-amino-9H-purin. Dieses Verfahren, bei dem Adenosindesaminase verwendet wird, bewirkt im Stoffwechsel der höheren Tiere den Abbau der Purine zu den ausscheidbaren Hypoxanthinen. Inosin kann aus Adenosin durch Inkubierung mit gereinigter Adenosindesaminase hergestellt werden, die ihrerseits aus biologischen Quellen, wie z.B. aus Rindereingeweiden, gewonnen werden können. Bei diesen Anwendungen, wo natürliche Substrate beteiligt sind, ist es bekannt, daß das Enzym nur ein Enantiomer des racemischen Paares desaminiert. Beim Einsatz anomerer Mischungen strukturell modifizierter Nucleoside als Substrat ist bisher eine enzymatische Spezifität nicht bekannt. Spezifität auf der Basis der bekannten enantiomeren Selektionsverfahren des Enzyms erlauben keinen Rückschluß auf eine Spezifität bei anomeren Mischungen.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, daß die vorliegende Erfindung ein wirksames Verfahren zur selektiven Herstellung von  $\beta$ -(D)-2',3'-Didesoxyinosin der Formel



A /

worin I für die Purinbase Inosin steht, darstellt. Bei diesem Verfahren wird eine  $\alpha$ -, $\beta$ -anomere Mischung von (D)-2',3'-Dideoxyadenosin der selektiven enzymatischen Desaminierung unterworfen, wobei nur in dem  $\beta$ -(D)-Isomer die Adenosinbase in das Inosin umgewandelt wird. Die entstehende Verbindung ist leicht isolierbar und durch einfache Umkristallisation zu reinigen.

Im Detail betrifft die vorliegende Erfindung ein verbessertes Verfahren zur selektiven Herstellung von  $\beta$ -(D)-2',3'-Dideoxyinosin der Formel



A ;

5

in welcher I für die Purinbase Inosin steht, bei welchem Verfahren folgende Schritte vorgesehen sind:

- 1. In einer anomeren Mischung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -(D)-2',3'-Didesoxyadenosin wird das  $\beta$ -(D)-2',3'-Didesoxyadenosin-Anomere durch Kontakt der anomeren Mischung mit dem Enzym Adenosindesaminase selektiv desaminiert, worauf

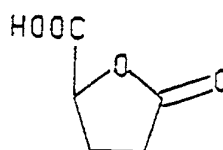
10

- 2. Gewinnung des in Stufe 1 hergestellten  $\beta$ -(D)-2',3'-Dideoxyinosins erfolgt.

Ein typisches Verfahren zur Herstellung der in Stufe 1 verwendeten anomeren Mischung umfaßt folgende Schritte:

- (a) Überführung eines (D)- $\gamma$ -Carboxy- $\gamma$ -butyrolactons der Formel

15

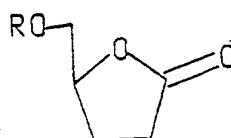


(1)

20

in ein 5-O-Hydroxyschutzgruppe-Methyl- $\gamma$ -butyrolacton der Formel

25



(2) ;

30

worin R für eine Hydroxyschutzgruppe steht, durch Reaktion der Verbindung der Formel 1 mit einem Carboxylgruppen-reduzierenden Mittel und anschließenden Schutz der entstehenden Hydroxymethylgruppe,

35

- (b) Überführung des Zwischenprodukts der Formel 2 von Stufe (a) in die 5-O-Hydroxyschutzgruppe-Methyl-2,3-Dideoxy-(D)-pentofuranose der Formel

40



(3) ;

45

in welcher R für eine Hydroxyschutzgruppe steht, durch Reaktion der Verbindung der Formel 2 mit einem Carboxylgruppen-reduzierenden Mittel,

- (c) Überführung des Zwischenprodukts der Formel 3 aus Stufe (b) in die 1-O-Aktivierungsgruppe-5-O-Hydroxyschutzgruppe-2,3-dideoxy-(D)-pentofuranose der Formel

50

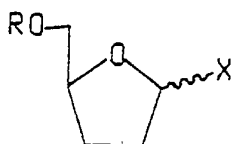


(4) ;

55

in welcher R für eine Hydroxyschutzgruppe und A für eine O-Aktivierungsgruppe steht, die ausgewählt ist aus den Alkylcarbonyl-, Arylcarbonyl-, Alkylthiocarbonyl-, Arylthiocarbonyl-, Alkylsulfonyl-, Arylsulfo-

nyl- und Carbonatgruppen, in welchen die Alkylgruppierung eine gegebenenfalls substituierte C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkylgruppe und die Arylgruppierung eine gegebenenfalls substituierte Phenylgruppe bedeutet und der Substituent an der Alkyl- und Arylgruppierung ausgewählt sein kann aus 1 bis 3 Halogen- und C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxygruppen, durch Umsetzung der Verbindung der Formel 4 mit einem der obigen Gruppe A entsprechenden Acylierungs- oder Sulfonierungs- oder Carbonylierungsmittel,  
 (d) Überführung der Zwischenverbindung der Formel 4 aus Stufe (c) durch Reaktion mit einer Verbindung der Formel HX oder mit einem Trimethylsilylhalogenid zur Gewinnung der 1-Abspaltgruppe-5-O-Schutzgruppe-2,3-didesoxy-(D)-pentofuranose der Formel



(5)

in welcher R für eine Hydroxyschutzgruppe und X für eine aus F, Cl, Br und J ausgewählte Abspaltgruppe steht,

(e) Umsetzung der Zwischenverbindung der Formel 5 aus Stufe (d) mit einem aktivierten Adeninderivat, in welchem die Base Adenin durch Reaktion der Amino- oder Hydroxygruppen des Adeninkerns mit einer als Aktivierungsverbindung dienenden Silylierungs-, Acetylierungs- oder Benzoylierungsverbindung aktiviert worden war, gegebenenfalls in Gegenwart einer Bronsted- oder einer Lewissäure und in Gegenwart eines inerten organischen Lösungsmittels und

(f) Gewinnung der anomeren Mischung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -(D)-2',3'-Didesoxyadenosin nach Abspaltung der 5-O-Hydroxyschutzgruppe von dem Zwischenprodukt der obigen Stufe (e).

Das Ausgangsmaterial (D)- $\gamma$ -Carboxy- $\gamma$ -butyrolacton wird am besten aus L-Glutaminsäure unter Verwendung üblicher, in der chemischen Literatur<sup>3</sup> beschriebener Verfahren gewonnen.

Eine Kombination chemischer Reaktionen ergibt eine geeignet blockierte 2,3-Didesoxypentafuranose 3. Diese Verbindung und ihre Derivate sind aus der Literatur bekannt.

So umfaßt die Umwandlung des Ausgangsmaterials (D)- $\gamma$ -Carboxy- $\gamma$ -butyrolacton in ein 5-O-Hydroxyschutzgruppe-Methyl-butylolacton in Stufe (a) die Reduktion der  $\gamma$ -Carboxygruppe zu einer Hydroxymethylgruppe und die anschließende Reaktion mit einem Reagenz, das eine Hydroxyschutzgruppe liefert, Beispielsweise wurden die Reduktion der  $\gamma$ -Carboxygruppe und der Schutz der entstehenden  $\gamma$ -Hydroxymethylgruppe mit Hilfe der Benzylgruppe (PhCH<sub>2</sub>) in Stufe (a) durch aufeinanderfolgende Reaktion der Ausgangsverbindung der Formel 1 mit BH<sub>3</sub>.SMe<sub>2</sub> und PhCH<sub>2</sub>Br durchgeführt.

Die primäre Alkoholfunktionsgruppe kann als Ether, wie als Trialkyl-, Dialkylaryl-, Diaryldialkyl- oder Triarylsilylether, als gegebenenfalls substituierter Benzyl-, gegebenenfalls substituierter Alkyl- oder Allylether, oder als Ester, wie z.B. als Benzoyl-, Mesitoyl-, Pivaloylester, gegebenenfalls substituierter Essigsäure- oder Carbonsäureester geschützt werden. Zu diesem Gebiet vergleiche "Protective Groups in Organic Synthesis" T.W. Greene, John Wiley, New York 1981, bezüglich detaillierter Beschreibung von Schutzgruppen und der damit im Zusammenhang stehenden chemischen Reaktionen. Bei einer bevorzugteren Ausführungsform der Erfindung wurde als Hydroxyschutzgruppe für die primäre Alkoholgruppe in der 5-Stellung die Benzyl- und insbesondere die Benzoylgruppe verwendet, da diese Gruppen stabil sind und ihre Herstellung allgemein bekannt ist.

Die Umwandlung des 5-O-Hydroxyschutzgruppe- $\gamma$ -butyrolactons in die 5-O-Hydroxyschutzgruppe-2,3-Didesoxypentafuranose der Formel 3 in Stufe (b) wurde durch Reaktion des Zwischenprodukts der Formel 2 mit NaH und HCO<sub>2</sub>Et sowie anschließende Reaktion mit HCl erreicht.

Es ist für den Fachmann einzusehen, daß jedes mögliche Reduktionsmittel zur Durchführung entweder der einzelnen oder beider Stufen (a) und (b) unabhängig voneinander (d.h. aufeinanderfolgend) oder gleichzeitig verwendet werden kann. Abgesehen von BH<sub>3</sub>.SMe<sub>2</sub> können als günstige Reduktionsmittel in einer oder beiden Stufen (a) und (b) NaBH<sub>4</sub>, NaBH<sub>4</sub> plus LiCl oder AlCl<sub>3</sub> oder BF<sub>3</sub>, LiAlH<sub>4</sub>, LiAlH(OMe)<sub>3</sub>, LiAlH(O-t-Bu)<sub>3</sub>, (Sia)<sub>2</sub>BH (Disiamylboran) oder andere Dialkylborane und dergl. verwendet werden. Disiamylboran ist wegen seiner günstigen Handhabung und seiner Reaktionsfreudigkeit das bevorzugte Reduktionsmittel.

Die in Stufe (c) stattfindende Überführung der Zwischenverbindung der Formel 3 in die Zwischenverbindung der Formel 4, die eine "aktivierte" Hydroxygruppe in der Position C(1) des 2,3-Didesoxypentofuranose-Ringsystems trägt, kann durch Einwirkung irgendeines Reagens erfolgen, das zur Überführung dieser Hydroxygruppe in eine Gruppe dient, die leicht bei Reaktion mit HCl oder HBr oder vorzugsweise TMSBr

oder TMSCl (+) katalytische Mengen von TMSI durch Cl oder Br verdrängt werden kann. ("TMS" steht für die Trimethylsilylgruppe.) Eine solche Gruppe, die auf diese Weise ersetzt werden kann, umfaßt O-Aktivierungsgruppen aus der Gruppe Alkylcarbonyl, Arylcarbonyl, Alkylthiocarbonyl, Arylthiocarbonyl, Alkylsulfonyl, Arylsulfonyl und Carbonatgruppen, in welchen die Alkylgruppierung eine gegebenenfalls substituierte C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkylgruppe und die Arylgruppierung eine gegebenenfalls substituierte Phenylgruppe bedeutet und der Substituent an der Alkyl- und Arylgruppierung ausgewählt sein kann aus 1 bis 3 Halogen- und C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxygruppen. Insbesondere kann diese Aktivierungsgruppe ausgewählt sein aus den (zu den obigen) entsprechenden Acetoxy- und Benzoyloxygruppen und kann vor allem Acetoxy sein. Stufe (c) wurde geeigneterweise unter Verwendung eines Essigsäureanhydrid/Pyridin-Reagens durchgeführt.

In Stufe (d) wurde die Verdrängung der funktionellen 1-O-Aktivierungsgruppe durch eine Abspaltgruppe Cl oder Br durch Behandlung von Verbindung 4 mit HCl (oder HBr) in Methylenchlorid bei niedriger Temperatur erreicht, wodurch die Furanosylhalogenide 5a und 5b erhalten wurden, die in Lösung als eine Mischung von Anomeren ( $\alpha$  und  $\beta$ ) vorliegen.

In Stufe (e) dieses Verfahrens wurde die Zwischenverbindung der Formel 5 aus der obigen Stufe (d) mit einem Adenin umgesetzt, das durch Reaktion mit einem bekannten Aktivierungsmittel in ein silyliertes, acetyliertes oder benzoyliertes oder anders acyliertes Adenin übergeführt worden war. Die Umsetzung mit dem aktivierten Adenin erfolgte in Gegenwart eines geeigneten polaren oder unpolaren Lösungsmittels und gegebenenfalls in Gegenwart einer Lewis-Säure, wie beispielsweise Borhalogeniden, Aluminiumhalogeniden, Titanhalogeniden, Zinn(IV)-chlorid, Zinkhalogeniden, Trimethylsilylbromid, -jodid, Triflat oder irgend einer anderen für Glycosylierungsreaktionen bekanntermaßen verwendeten Säure, oder in Gegenwart einer Bronsted-Säure, wie Chlorwasserstoff, Bromwasserstoff oder Jodwasserstoff. Insbesondere ist in dieser Stufe (e) die Verwendung von silyliertem Adenin in Gegenwart nicht-polarer Lösungsmittel, wie beispielsweise Benzol, Toluol, Tetrachlorkohlenstoff, Dichlormethan, Dichlorethan und Chloroform empfehlenswert. Beispiele geeigneter polarer Lösungsmittel sind Tetrahydrofuran und Dioxan, Nitrile, wie Acetonitril, Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid. Ein Beispiel für ein durchführbares Verfahren von Stufe (e) ist in Brundidge et al., US-PS 4 625 020 beschrieben, wo die Kupplung von silylierten Pyrimidinen, bei welchen aktive Wasserstoffe von Hydroxy- und Aminogruppen durch Silylgruppen blockiert sind, wie etwa durch die Trimethylsilylgruppe, mit einem 2-Desoxy-2-fluoroarabinofuranosylhalogenid angegeben ist. Bei Anwendung dieses genannten Verfahrens auf Stufe (e) wurde eine Adeninbase, bei der alle aktiven Aminowasserstoffe durch die Trimethylsilylgruppe blockiert sind, mit einem Zwischenprodukt der Formel 5 umgesetzt.

So ergab die Behandlung des Zwischenprodukts der Formel 5 mit einem oben angegebenen silylierten Adenin in Methylenchlorid und Chloroform das geschützte (D)-2',3'-Didesoxyadenosin als Mischung der Anomeren.

Als Abänderung von Stufe (c), in welcher "A" für Acetyl steht, kann die Zwischenverbindung aus Stufe (c) mit einem aktivierten Adeninderivat in Gegenwart einer Lewis-Säure wie in Stufe (e) umgesetzt werden, um das 5-O-Hydroxyschutzgruppe-2',3'-Didesoxyadenosin-Produkt ohne den Vorgang von Stufe (d) zu erhalten.

Wie oben erwähnt, kann in einer weiteren, bevorzugteren Ausführungsform dieses Verfahrens die 1-O-Acetyl-5-O-benzoyl-2,3-pentofuranose der Formel 4 aus Stufe (c) zuerst mit einem Bromtrimethylsilan und anschließend mit einem bis-Silyladenin in Kontakt gebracht werden, um in einer einzigen Stufe ohne Isolierung des Zwischenprodukts 1-Brom-5-O-benzoyl-2,3-pentofuranose aus Stufe (d) das 5'-O-Benzoyl-2',3'-Didesoxyadenosin als Produkt der kombinierten Stufen (d) und (e) zu gewinnen.

In Stufe (f) des Verfahrens zur Herstellung der Ausgangsverbindung für das erfindungsgemäße Verfahren wurde das 5'-O-Benzoyl-2',3'-Didesoxyadenosin einer chemischen Reaktion zur Entfernung der 5-O-Schutzgruppe unterworfen. Geeignete Verfahren zur Abtrennung dieser Schutzgruppe sind auf dem Gebiet dieser Erfindung allgemein bekannt. Beispiele hierfür sind in der oben erwähnten Literaturstelle "Protective Groups in Organic Synthesis" von T. W. Greene, John Wiley, New York, 1981 beschrieben. Insbesondere wurde 5'-O-Benzoyl-2',3'-didesoxyadenosin mit Ammoniak-gesättigtem Methanol behandelt, um 2',3'-Didesoxyadenosin als Mischung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomeren zu erhalten.

In Stufe 1 des vorliegenden erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Mischung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -(D)-2',3'-Didesoxyadenosin mit dem Enzym Adenosindesaminase (ADA) behandelt, das seinerseits aus Kalbsmilch in neutralem wässrigem Medium isoliert worden war. Dieses Enzym katalysiert selektiv die Deaminierung des  $\beta$ -Anomeren des (D)-2',3'-Didesoxyadenosins, um quantitativ das  $\beta$ -(D)-2',3'-Didesoxyinosin zu ergeben. Obwohl in den tatsächlichen Beispielen Adenosindesaminase (ADA) aus Kalbsmilch verwendet wurde, kann ohne weiteres angenommen werden, daß jedes Adenosinaminohydrolase-(oder "-Desaminase" EC 3.5.4.4)-Präparat ebenso wirksam geeignet ist. So liegt die Verwendung jedes Präparates der Adenosin-Aminohydrolase (oder "Desaminase"), das selektiv das  $\beta$ -2',3'-Didesoxyadenosin-Anomer entaminiert, innerhalb des Rahmens der vorliegenden Erfindung. Dementsprechend kann außer dem freien Enzym in einem

geeigneten Medium, wie in dem hier beschriebenen neutralen wässrigen Medium, das Enzym ADA auch in immobilisierter Form auf einem geeigneten kompatiblen Substrat, wie z.B. dem Oxyran-Acrylpolymer-Substrat Eupergit C TM (Rohm Pharma GmbH), verwendet werden. Das ADA kann unter Verwendung üblicher Verfahren an das Polymer gebunden sein.

5 Geeigneterweise gewinnt man das (D)-2',3'-Didesoxyinosin-Produkt durch Sammeln der Reaktionsmischung aus Stufe 2, Abfiltrieren der unlöslichen Bestandteile und Additive über Celit und Reinigen des entstehenden Produktes durch einfache Umkristallisation, wobei Methanol das bevorzugte Umkristallisationsmittel ist. In Stufe 2 wird eine katalytische bis etwa äquimolare bis überschüssige Menge Adenosindesaminase zu einer anomeren Mischung von (D)-2',3'-Didesoxyadenosin aus Stufe 1 in einem geeigneten  
10 Lösungsmittel zugesetzt. Es kann eine Vielzahl von Lösungsmitteln verwendet werden, doch sind polare Lösungsmittel, wie z.B. Wasser oder Alkohol, bevorzugt. Die Reaktion ist in Abhängigkeit von der Enzymmenge, den Reaktionsbedingungen und dergl. nach einem Zeitraum von weniger als einer Stunde bis zu mehreren Stunden praktisch abgeschlossen. Vorzugsweise wird die Reaktion bei etwa 20-25 °C während eines Zeitraums von 1 bis 4 Stunden durchgeführt.

15 Um verunreinigende Mengen von desaminiertem  $\alpha$ -Anomer in dem Produkt zu vermeiden, sollte der Reaktionsablauf verfolgt werden, um die maximale Kontaktzeit zu bestimmen. Das kann beispielsweise am besten durch die dem Fachmann bekannte Methode der Dünnschichtchromatographie oder der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie erfolgen.

Als Beweis dafür, daß das erfindungsgemäße Verfahren dieser selektiven enzymatischen Desaminierung nicht naheliegend war, möge die Tatsache gelten, daß in (L)-anomeren Mischungen das  $\alpha$ -Anomer und nicht das  $\beta$ -Anomer bei der enzymatischen Desaminierung begünstigt war. Da Adenosindesaminase ein ziemlich unspezifisches Enzym mit beträchtlicher Reaktionsfreudigkeit ist, war es sicher nicht naheliegend, daß ein vorteilhafter Unterschied in der Desaminierungsgeschwindigkeit zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomerem des (D)-2',3'-Didesoxyadenosins besteht.

25 Die Verwendung des Enzyms Adenosindesaminase nach dem erfindungsgemäßen Verfahren bietet den Vorteil, daß die entstehenden Anomeren ( $\alpha$  und  $\beta$ ) nicht unter Einsatz kostenaufwendiger und zeitraubender chromatographischer Methoden und Kristallisationsverfahren voneinander getrennt werden müssen, wie dies bisher auf dem Gebiet dieser Substanzen erforderlich war. Das  $\beta$ -(D)-2',3'-Didesoxyinosin-Anomer ist das gewünschte Produkt, da es ein aktives oder zumindest deutlich aktiveres antivirales Mittel darstellt als das  
30  $\alpha$ -Anomer.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung des  $\beta$ -(D)-2',3'-Didesoxyinosins unter Berücksichtigung der Herstellung des Ausgangsmaterials ist im folgenden Schema I dargestellt:

35

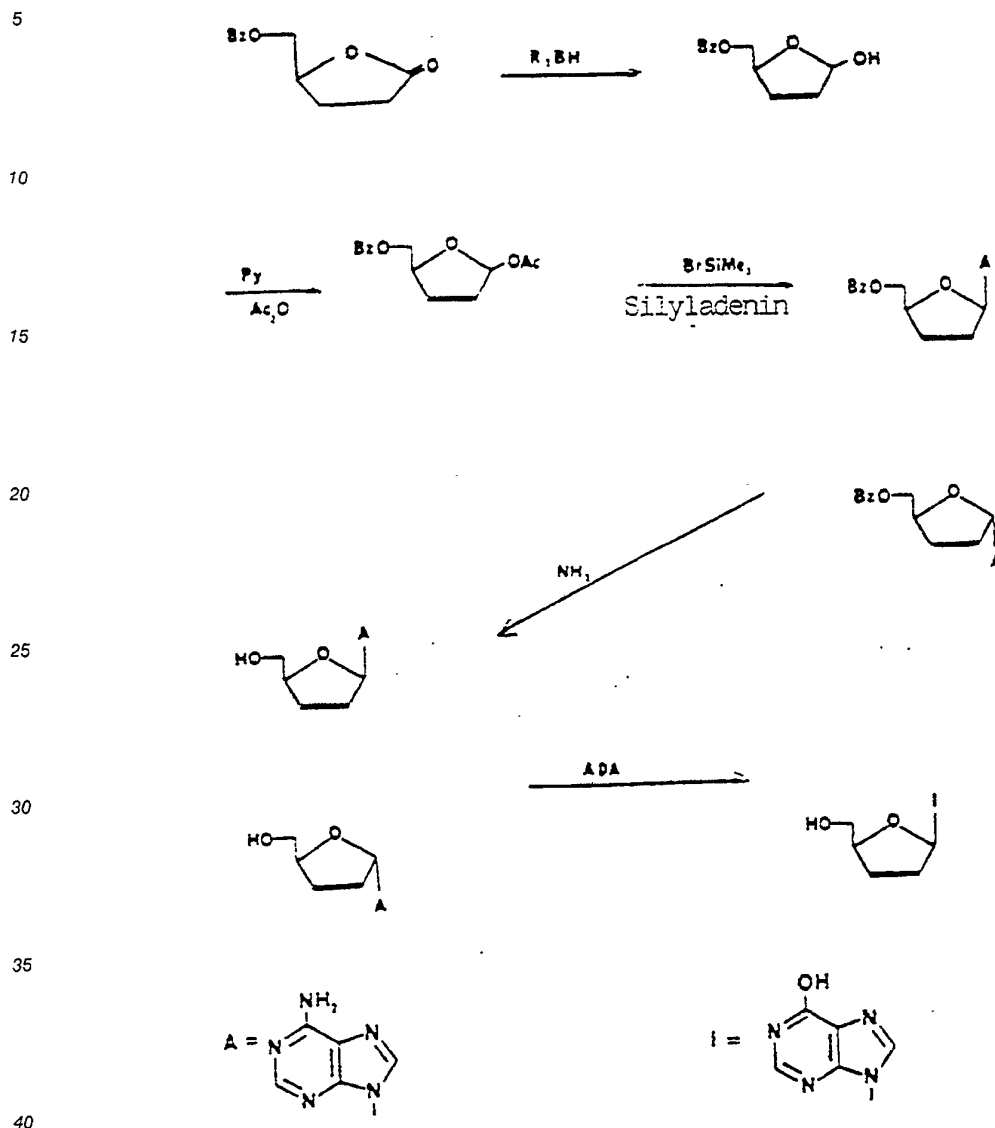
40

45

50

55

Schema I



Die folgenden Vorschriften und Beispiele erläutern nur einige wenige Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens und sollen den Erfindungsrahmen keineswegs einschränken.

Alle Teile und Prozente sind auf das Gewicht bezogen, und die Temperaturen sind, wenn nicht anders angegeben, in °C.

#### Experimenteller Teil

##### Vorschrift 1: (D)-5-O-Benzyl-2,3,-didesoxypentofuranose

Zu 200 ml einer 0,5 M Lösung von Disiamylboran in THF bei °C wurde unter Stickstoff tropfenweise eine Lösung von 15,1 g (0,069 Mol) von (D)-5'-Benzoyloxy-5-hydroxymethylbutyrolacton in 50 ml trockenem Tetrahydrofuran zugesetzt. Nach 20 min bei 0°C wurde die Reaktionsmischung auf 22°C erwärmt. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei 22°C gerührt, dann langsam durch Zusatz von 12 ml Wasser aufgearbeitet und 30 min unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C abgekühlt und langsam mit 24 ml 30%igem Wasserstoffperoxid versetzt, wobei der pH-Wert durch Zusatz von 1N Natriumhydroxid auf 7-8 gehalten wurde. Nach erfolgtem Zusatz wurde die Reaktionsmischung unter vermindertem Druck auf einem Rotovapor bei 30°C bis zu einem öligen Rückstand eingedampft. Dieser

wurde zwischen 500 ml Dichlormethan und 150 ml Wasser verteilt. Die wässrige Schicht wurde mit 2 x 100 ml Dichlormethan extrahiert und dann die vereinigten organischen Schichten mit 50 ml Wasser gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und zu einem Öl eingedampft. Ausbeute = 15,3 (100%) an (D) 5-O-Benzoyl-2,3-didesoxypentofuranose. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum bestätigte die Struktur und das Öl wurde direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

#### Vorschrift 2:

##### 1-O-Acetyl-(D)-5-O-benzoyl-2,3-didesoxypentofuranose

10

Eine Lösung von (D)-5-O-Benzoyl-2,3-didesoxypentofuranose (15,3 g, 0,069 Mol) in 32 ml Pyridin und 16 ml Essigsäureanhydrid wurde 4 h bei 22 °C gerührt, dann mit 500 ml Dichlormethan verdünnt und mit 100 g Eis versetzt. Die Reaktionsmischung wurde dann 3 mal mit 100 ml 1N Chlorwasserstoffsäure, 3 mal 100 ml gesättigter wässriger Natriumbicarbonatlösung und 100 ml Salzlösung gewaschen. Die organische Schicht wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft, wobei ein blaßgelbes Öl erhalten wurde. Dieses konnte unverändert oder nach einer Chromatographie über Silicagel 35% → 60% EtOAc/Hexan verwendet werden. Ausbeute 15,9 g (87%) 1-O-Acetyl-(D)-5-O-benzoyl-2,3-didesoxy-pentofuranose. Das NMR-Spektrum bestätigte die Struktur.

##### 20 Vorschrift 3: (D)- 5'-O-Benzoyl-2',3'-didesoxyadenosin

1-O-Acetyl-(D)-5-O-benzoyl-2,3-pentofuranose (0,522 g, 0,00198 Mol) wurde in 5 ml 1,2-Dichlorethan gelöst. Zu dieser Lösung wurden 276 µl (1,2 Äq) Trimethylsilylbromid zugesetzt. Diese Reaktionsmischung wurde 15 min bei 22 °C gerührt, bevor 11,9 ml einer 0,2M Lösung von bis-Silyladenin in 1,2-Dichlorethan zugesetzt wurden. Die Lösung wurde 88 h bei 22 °C gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung durch Abkühlen auf 0 °C und Eingießen in 40 ml kalter gesättigter Natriumbicarbonatlösung aufgearbeitet. Die Reaktionsmischung wurde zwischen 200 ml Dichlormethan und 2 x 40 ml kalter gesättigter wässriger Natriumbicarbonatlösung und 40 ml Salzlösung verteilt. Die organische Schicht wurde getrocknet und eingedampft, wobei ein farbloses Öl erhalten wurde, das über Silicagel chromatographiert und mit 8% Methanol in Methylenchlorid eluiert wurde. Die Fraktionen wurden aufgefangen und die ähnlichen Fraktionen vereinigt, wobei 420 mg (D)-5'-O-Benzoyl-2',3'-didesoxyadenosin als Mischung der Anomeren erhalten wurden (63%).

#### Beispiel: β-(D)-2',3'-Didesoxyinosin

35

Diese Mischung von Anomeren (1,66 g) wurde mit (170 ml) ammoniakgesättigtem Methanol behandelt. Das Reaktionsgefäß wurde dicht abgeschlossen und die Masse 48 h bei 18 °C gerührt. Durch Dünnschichtchromatographie wurde festgestellt, daß die Reaktion unvollständig war. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und durch neuerliche 170 ml ammoniakgesättigtes Methanol ersetzt. Dünnschichtchromatographie nach weiteren 48 h zeigte eine vollständige Reaktion an. Daher wurde das Lösungsmittel abgedampft und Ethanol (5 ml) zugesetzt. Dadurch wurden farblose Kristalle erhalten, die abgetrennt und mit 5 ml 95%igem Ethanol gewaschen wurden, wobei 1,20 g (95%) 2',3'-Didesoxyadenosin 5a gemeinsam mit seinem α-Anomer 5b in einem durch <sup>1</sup>H-NMR festgestelltem Verhältnis von 1 : 1 erhalten wurde. Die Mischung von α + β-(D)-2',3'-Didesoxyadenosin wurde in 50 ml entionisiertem Wasser gelöst und diese Lösung mit 10 mg Adenosin-desaminase (Typ II, der Firma Sigma; 9 Einheiten/mg → 0,9 µMol/min) versetzt. Die Lösung wurde bei 20 °C gerührt und die Reaktion durch HPLC überwacht. Nach 2 1/2 h wurden weitere 10 ml Adenosin-desaminase zugesetzt. Die HPLC zeigte, daß die Reaktion nach 3 h nahezu vollständig war. Die Reaktionsmischung wurde dann bei 35 °C eingeeengt (1-2 ml) und ergab ein Öl. Das Öl wurde gerieben und langsam mit 2 x 1,5 ml Methanol verdünnt, wodurch weiße Kristalle entstanden. Nach 15 min wurde die Substanz abfiltriert und die farblosen Kristalle mit 2 x 1,5 ml Methanol gewaschen, um β-(D)-2',3'-Didesoxyinosin (120 mg, 48%) zu ergeben. Die Mutterlauge wurde in gleicher Weise behandelt und lieferte weitere 29 mg (12%) eines qualitativ guten Produkts, das durch <sup>1</sup>H-NMR charakterisiert wurde. Das NMR-Spektrum bestätigte die Struktur.

#### 55 Literaturstellen:

1. Samukov, V.V.; Ofitserov, V.I. Bioorg. Khim. 1983, 9, 132.
2. Prisbe, E.J.; Martin, J.C. synth. Commun. 1985, 15, 401.



3. Taniguchi, M.; Koga, K.; Yamada, S. Tetrahedron 1974, 30, 3547.

#### Patentansprüche

- 5    1. Verfahren zur Herstellung von  $\beta$ -(D)-2',3'-Didesoxyinosin, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine anome-  
re Mischung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -(D)-2',3'-Didesoxyadenosin mit Adenosindesaminase behandelt und aus dem  
enzymatischen Reaktionsprodukt das  $\beta$ -(D)-2',3'-Didesoxyinosin gewonnen wird.
- 10    2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die verwendete Adenosindesaminase als  
Lösung in einem neutralen wässrigen Medium verwendet wird.
- 15    3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die verwendete Adenosindesaminase als  
immobilisiertes Präparat verwendet wird.

15

20

25

30

35

40

45

50

55