

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2014-502

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07H 19/10 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.07.2014**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **27.01.2016**
(Věstník č. 4/2016)

(71) Přihlašovatel:
Zentiva, k.s., Praha 10, CZ

(72) Původce:
Martin Štefko, 85101 Bratislava, SK
Ondřej Dammer, Hostivice, CZ
Lukáš Krejčík, Praha 9- Vinoř, CZ
Stanislav Man, Nezdenice, CZ

(74) Zástupce:
Rott, Růžicka & Guttman, Advokátní, patentové a
známkové kanceláře, Ing. Ivana Jírotková,
patentová zástupkyně, Vinohradská 37, 120 00
Praha 2

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Nová forma sofosbuviru a způsob její
přípravy**

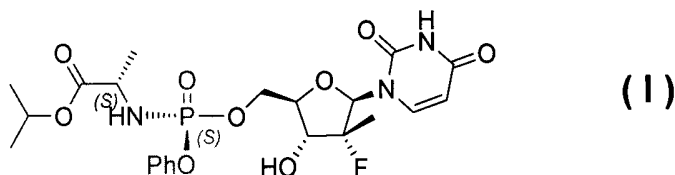
(57) Anotace:
Krystalická forma sofosbuviru Z-1, charakterizovaná
difrakčními píky 8,0; 12,3; 17,1; 19,9 a $20,8 \pm 0,2^\circ$ 2-
theta za použití CuK α záření, a způsob její přípravy.

CZ 2014 - 502 A3

Nová forma sofosbuviru a způsob její přípravy

Oblast techniky

Vynález se týká nové krystalové formy **SOFOSBUVIRU** vzorce (I), chemicky isopropyl ((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-fluor-3-hydroxy-4-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(fenoxy)fosforyl)-L-alaninát a způsobu jeho přípravy.



Dosavadní stav techniky

Sofosbuvir je látka určená pro léčbu Hepatitidy typu C. Látka byla prvně popsána v patentové přihlášce WO/2008/121634, obecný postup přípravy této a řady dalších látek s obdobným složením je uvedena v citované přihlášce na stránce 668 až 671. Syntéza je dále dokumentována v příkladech 13 až 66. Reprodukci těchto postupů byl získán sofosbuvir v amorfní formě (forma pěny, nebo oleje).

SOFOSBUVIR je tzv. proléčivo, které je snadno enzymaticky transformováno přímo v játrech na účinnou látku 2'-deoxy-2'- α -fluoro- β -C-methyluridine-5'-triphosphate, který slouží jako inhibitor RNA polymerázy (NS5B protein) a inhibuje tak syntézu virální RNA. Sofosbuvir představuje první neinterferonovou léčbu chronické hepatitidy C s úspěšností léčby dosahující 90%.

Patentová přihláška WO/2010/135569 popisuje přípravu a charakterizaci pěti polymorfů a amorfu Sofosbuviru zatímco přihláška WO/2011/123645 rozšiřuje tento seznam o formu VI. Forma VI se připravuje krystalizací z vodného roztoku, překvapivě je však nehydrofobická a stabilní na vzduchu. Formy V a IV se připravují krystalizací s anizolu a acetonitrilu. Obě však přecházejí na Formu I už pouhou filtrací. Forma III je popsána jako 1:1 solvát s chloroformem, zatímco forma II jako 1:1 solvát s dichlormethanem. Nesolvatovanou formu Sofosbuviru reprezentuje Forma I. Patent dále popisuje Single krystal X-ray kystalografické data Formy I, II, III.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je nová polymorfní forma Sofosbuviru Z-1, její příprava a charakterizace. Připravená polymorfní forma vykazuje vysokou fyzikální stabilitu, čímž se stává vhodným kandidátem použitelným ve farmaceutické kompozici.

Popis obrázků

Obrázek 1.: IR spektrum sofosbuviru, forma Z-1.

Obrázek 2.: RAMANOVE spektrum sofosbuviru, forma Z-1.

Obrázek 3.: ^{13}C ssNMR na pevné fáze SOFOSBUVIRU, Forma Z-1.

Obrázek 4.: ^{19}F ssNMR pevné fáze formy Z-1 Sofosbuviru.

Obrázek 5.: RTG práškový záznam formy Z-1 sofosbuviru.

Obrázek 6.: DVS křivka Formy Z-1 Sofosbuviru.

Podrobný popis vynálezu

Podstatou vynálezu je nová polymorfní forma Sofosbuviru označená jako Z-1 která nebyla dosud v literatuře popsána. Hlavní výhodou této nové polymorfní formy jsou lepší čistící schopnosti ve srovnání s dosud popsanou formou 1 (WO/2011/123645). Tato forma je bezvodá, nehygroskopická a ukazuje se chemicky a polymorfně stabilní. Forma Z-1 byla charakterizována následujícími analytickými metodami: RTG prášková difrakce (XRPD Ramanova spektroskopie, IČ spektroskopie, NMR spektroskopie a dynamická sorpce par (DVS).

Sofosbuvir ~~41~~ získaný podle patentu WO/2011/123645 (FORMA I) vykazuje čistotu nejvíce 98,0 % (dle HPLC). Krystalizací ze směsi DCM/Toluen podle této patentové přihlášky se látka již prakticky nečistí stejně jako opakovanou krystalizací z této směsi. Je patrné, že opakovaná krystalizace nevede ke snížení nečistot pod stanovené limity (0,10 a 0,15 %). Taková surovina poté není vhodná pro farmaceutickou výrobu.

Forma Z-1 Sofosbuviru podle tohoto vynálezu je charakterizována následujícími reflexemi v RTG práškovém záznamu: 8,0; 12,3; 17,1; 19,9 a $20,8 \pm 0,2^\circ$ 2-theta za použití $\text{CuK}\alpha$ záření. V RTG práškovém záznamu mohou být nalezeny ještě další difrakční píky: 10,3; 13,4; 16,1; 17,9; 19,3; 23,6; 24,8 a $27,0 \pm 0,2^\circ$ 2-theta. Polohy difrakčních píků a jim odpovídající mezivzdálenosti a relativní intenzity jsou shrnuty v Tabulce 1. RTG práškový záznam této polymorfní formy je uveden na obrázku 5.

Tabulka 1. Typické difrakční píky odpovídající formě Z-1 Sofosbuviru

Pos. [°2 θ .]	mezirovná vzdálenost [Å]	Rel. Int. [%]
8,01	11,033	100,0
10,30	8,584	54,4
12,34	7,168	83,1
13,38	6,614	15,1
16,12	5,495	11,2
16,72	5,298	32,1
17,13	5,172	97,5
17,90	4,950	20,0
18,57	4,773	12,1
19,29	4,597	61,2
19,93	4,451	71,1
20,75	4,277	36,9
21,89	4,056	12,0
23,22	3,828	21,7
23,55	3,774	13,9
24,82	3,585	16,3
25,21	3,530	19,0
27,02	3,297	18,7
27,87	3,198	12,6
28,46	3,134	8,1
31,20	2,864	8,7

Forma Z-1 Sofosbuviru podle tohoto vynálezu je charakterizována následujícími pásy reflexí v FTIR spektru: 3251, 1719, 1669, 1265, 1092 a $945 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$ (obr. 1).

Forma Z-1 Sofosbuviru podle tohoto vynálezu je charakterizována následujícími pásy maxim intenzit v FT-Ramanově spektru: 2987, 1718, 1671, 1373, 1217, 1007, $774 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$ (obr. 2).

Forma Z-1 Sofosbuviru podle tohoto vynálezu je dále charakterizována ^{13}C a ^{19}F ssNMR na pevné fázi. ^{13}C ssNMR spektrum pevné fáze této polymorfní formy je uveden na obrázku 3. ^{19}F ssNMR spektrum pevné fáze této polymorfní formy je uveden na obrázku 4.

^1H NMR spektra v roztoku a ^{13}C ssNMR nepotvrdila přítomnost solvátu, rovněž přítomnost co-krystalu nebyla potvrzena pomocí ssNMR spektroskopie.

^{19}F ssNMR podává další charakteristiku nové krystalické formy jediným píkem při chemickém posunu δ 154,66 ppm.

Záznam dynamické sorpce par ukazuje stabilitu polymorfu v rozmezí 0 až 70 % relativní vlhkosti, kdy nárůst obsahu vody ve vzorku byl v rozmezí 0-0,4 %. V intervalu relativních vlhkostí 70-90 % dochází k výrazné sorpci vody z 0,4 na 6,4 %. Následným obrácením cyklu (desorpce) a snižováním relativní vlhkosti z 90 % se obsahu vody nemění a zůstává na hodnotě 6,4 %. Po dosažení 60 % relativní vlhkosti dochází ke skokové desorpci vody jejíž obsah klesne při 50 % relativní vlhkosti na 0,4 % a nadále pozvolna klesá až k 0 % při 0% relativní vlhkosti. Následný opakovaný cyklus sorpce/desorpce kopíruje předešlý průběh.

Forma Z-1 je na vzduchu stabilní a odolná vůči vlhkosti.

Vynález rovněž zahrnuje postup přípravy nové formy Z-1. Forma Z-1 lze získat krystalizací sofosbuviru z esteru C3 až C5 alkoholu a C1 až C4 kyselin. Výhodně je ester volen tak, aby celkový počet uhlíků byl 5 až 8. Výhodný se tedy jeví například propyl ester kyseliny butanové, či pentyl ester kyseliny mravenčí. Ester může být složen z primárních, sekundárních nebo terciálních alkoholů. Stejně tak uhlíkový skelet kyseliny může být lineární či rozvětvený.

Nejlépeším řešením se jeví ester kyseliny octové s n-butanolem (n-butylacetát)

Výše popsané estery mohou být použity buď čisté nebo ve směsi s dalším rozpouštědlem tak zvaným ko-solventem. Ko-solventem jsou voleny méně polární rozpouštědla. Osvědčily se například C6 až C9 aromáty popřípadě C6 až C9 alicyklické uhlovodíky, popřípadě C1 až C4 chlorované uhlovodíky, substituované jedním nebo více atomy chloru. Příkladem může být cyklohexan, toluen nebo DCM

Nová polymorfní forma Z-1 sofosbuviru vykazuje čistotu 99,8 % již po první krystalizaci ze směsi n-butylacetát/toluen, následná re-krystalizace pak poskytuje produkt s čistotou 99,9 % přičemž všechny detekované nečistoty jsou pod hodnotami stanovených limitů (0,10 a 0,15 %). Takto připravená API vyhovuje svou kvalitou požadavkům pro farmaceutické použití.

Další výhodou je použití n-butylacetátu jako rozpouštědla v přípravě této nové polymorfní formy Z-1 Sofosbuviru. Toto rozpouštědlo je netoxické s limitem 5000 ppm pro finální API, netěkavé (teplota varu 126°C), netvoří výbušné páry. Stává se tak vhodným rozpouštědlem pro možnou technologickou výrobu Sofosbuviru.

Vynález je blíže objasněn v následujícím příkladu provedení. Příklad ilustrující zlepšení postupu podle vynálezu má výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezuje.

Experimentální část:

Analytické metody:

RTG prášková difrakce

Difraktogramy byly získány na práškovém difraktometru X'PERT PRO MPD PANalytical, použité záření CuK α ($\lambda=1,542$ Å), excitační napětí: 45 kV, anodový proud: 40 mA, měřený rozsah: 2 - 40° 2 θ , velikost kroku: 0,01° 2 θ při setrvání na reflexi 50 s. Měření probíhalo na plochém práškovém vzorku naneseném na Si destičku. Pro korekci primárního svazku byly užity 0,02 rad Sollerovy clonky, 10 mm maska a 1/4° fixní protirozptylová clonka. Ozářená plocha vzorku byla 10 mm, byly užity programovatelné divergenční clonky. Pro korekci sekundárního svazku byly užity 0,02 rad Sollerovy clonky a 5,0 mm protirozptylová clonka.

IR

ATR(ZnSe)-FTIR spektra byla měřena na FTIR spektrometru Nicolet Nexus (Thermo, USA). Na jedno spektrum bylo akumulováno 12 skenů s rozlišením 4 cm⁻¹.

Raman:

FT-Ramanova spektra byla měřena na FTIR spektrometru RFS 100/S (Bruker, Germany). Na jedno spektrum bylo akumulováno 128 skenů s rozlišením 4 cm⁻¹. Jako zdroj budícího záření byl použit laser s vlnovou délkou 1064 nm a výkonem 250 mW.

Nukleární magnetické rezonance (NMR)

NMR spektra byly naměřeny na přístroji Avance 500 od firmy Bruker. ¹H spektra byly měřeny při frekvenci 500.13 MHz, ¹³C při frekvenci 125,8 MHz. Vzorek byl měřen v deuterovaném rozpouštědle uvedeném u konkrétní analýzy, standartně při 25°C (pokud není u konkrétní analýzy uvedeno jinak). Chemický posun δ je udáván v ppm jednotkách, interakční konstanty J v Hz. Spektra byla standartně referencována na zbytkový signál rozpouštědla.

Solid state NMR spektra byla měřena na spektrometru Bruker Avance III 400 WB. ^{13}C CP MAS experimenty byly měřeny na 4 mm sondě s rychlostí rotace 13 kHz, kontaktní čas 2 ms

^{19}F MAS experimenty byly měřeny na 2.5 s rychlostí rotace 30 kHz . Pro CP/MAS experiment byl kontaktní čas 1 ms.

HPLC

Reakce byly rutinně sledovány pomocí HPLC Agilent 1100 s UV (PDA) detektorem vybavené kolonou Ascentis Express C18 (2,7 μm) (100 x 4,6 mm), při průtoku 1 ml/min, mobilní fáze **A**: fosfátový pufr (pH ~ 3) a fáze **B**: acetonitril (0 – 2 min 10 % MeCN, 2 – 18 min gradient 10 -> 90 % MeCN).

Dynamická sorpce par (DVS)

Záznamy dynamické sorpce par (DVS) byly naměřeny na přístroji DVS Advantage 1 od firmy Surface measurement systems. Navážka vzorku do křemenné mističky byla 20,2 mg a teplota v přístroji byla 25,4 °C. Měřicí program, který byl použit: vzorek byl zatížen dvěma cykly, které mají průběh od relativní vlhkosti 0% po 90% (sorpce) a poté od 90% do 0% RH (desorpce). Tento průběh byl v druhém cyklu zopakován. Jako nosný plyn byl použit 4.0 N₂ o průtoku 200 sccm.

Příklad 1

Příprava krystalické formy Z-1

Isopropyl ((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninát (SOFOBUVIR) připravený dle postupu popsáno v patentové přihlášce WO/2011/123668 v množství 1,5 g (2,83 mmol) bylo za tepla rozpuštěno v 8 ml *n*-butylesteru kyseliny octové (*n*BuOAc). Čirý roztok byl pozvolna ochlazen na laboratorní teplotu a míchán po dobu 3 h. Po přidání 20 mL toluénu byla bílá suspenze přefiltrována, produkt promyt toluenem (5 mL) a krystalická forma Z-1 sušena za vakua při laboratorní teplotě.

Výtěžek: 1,33 g (87 %)

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 11,50 (s, 1H), 7,53 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H), 7,33-7,36 (m, 2H), 7,18-7,21 (m, 2H), 7,117-7,20 (m, 1H), 6,03 (dd, $J = 12,7, 10,4$ Hz, 1H), 5,83 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H), 5,51 (dd, $J = 8,1, 1,6$ Hz, 1H), 5,51 (dd, $J = 8,1, 1,6$ Hz, 1H), 4,85 (hept, $J = 6,3$ Hz, 1H), 4,33 (dd, $J = 11,1, 5,7$ Hz, 1H), 4,20 (dt, $J = 11,6, 6,0$ Hz, 1H), 3,97 (dd, $J = 9,1, 4,7$ Hz, 1H), 3,85 – 3,76 (m, 1H), 1,25 (d, $J = 22,6$ Hz, 1H), 1,22 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 1,15 (dd, $J = 6,3, 0,8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 172,64 (d, $J = 5,1$ Hz), 162,78 (s), 150,71 (d, $J = 6,3$ Hz), 150,47 (s), 129,67 (s), 124,63 (s), 120,09 (d, $J = 4,9$ Hz), 102,28 (s), 101,04 (s), 99,60 (s), 79,47 (s), 71,51 (s), 68,02 (s), 64,66 (s), 49,79 (s), 26,86 (s), 21,42 (d, $J = 4,3$ Hz), 19,81 (d, $J = 6,5$ Hz), 16,56 (d, $J = 25,2$ Hz). ^{31}P NMR (101 MHz, DMSO) δ 3,80 (s). ^{13}C ssNMR (100 MHz,) δ 171,36; 164,12; 151,077; 149,765; 139,370; 123,829; 102,506; 100,263; 88,946; 81,439; 71,358; 68,353; 63,067; 52,396; 21,224; 18,303; 17,781 ppm. ^{19}F ssNMR $\delta = -154.66$ ppm
HPLC (210 nm): $R_t = 9,853$ min.

Příklad 2

Příprava krystalické formy Z-1

Isopropyl ((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-4-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninát (SOFOSBUVIR) připravený dle postupu popsaného v patentové přihlášce WO2011123668 v množství 0,9 g (1.70 mmol) byl za tepla rozpuštěn v směsi *n*BuOAc/Toluene 10 mL (1:1). Čirý roztok byl pozvolna ochlazen na laboratorní teplotu a míchán po dobu 3 h. Po přidání 20 mL toluénu byla bílá suspenze přefiltrována, produkt promyt toluenem (5 mL) a krystalická forma Z-1 sušena za vakua při laboratorní teplotě.

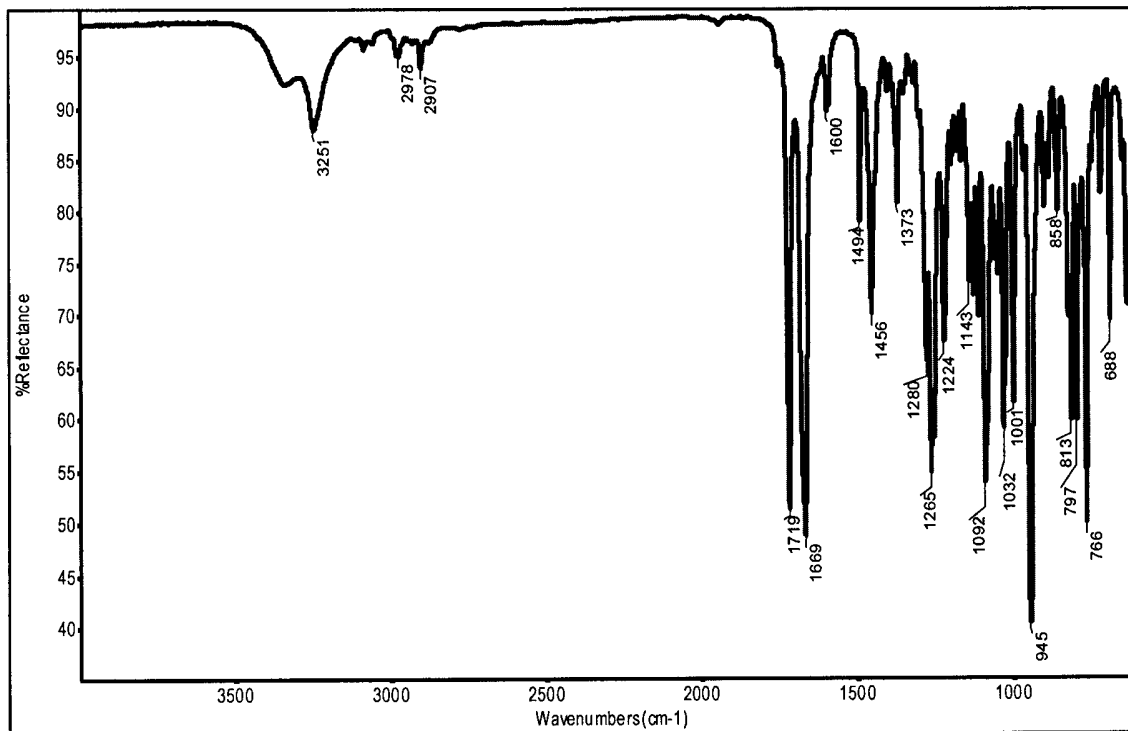
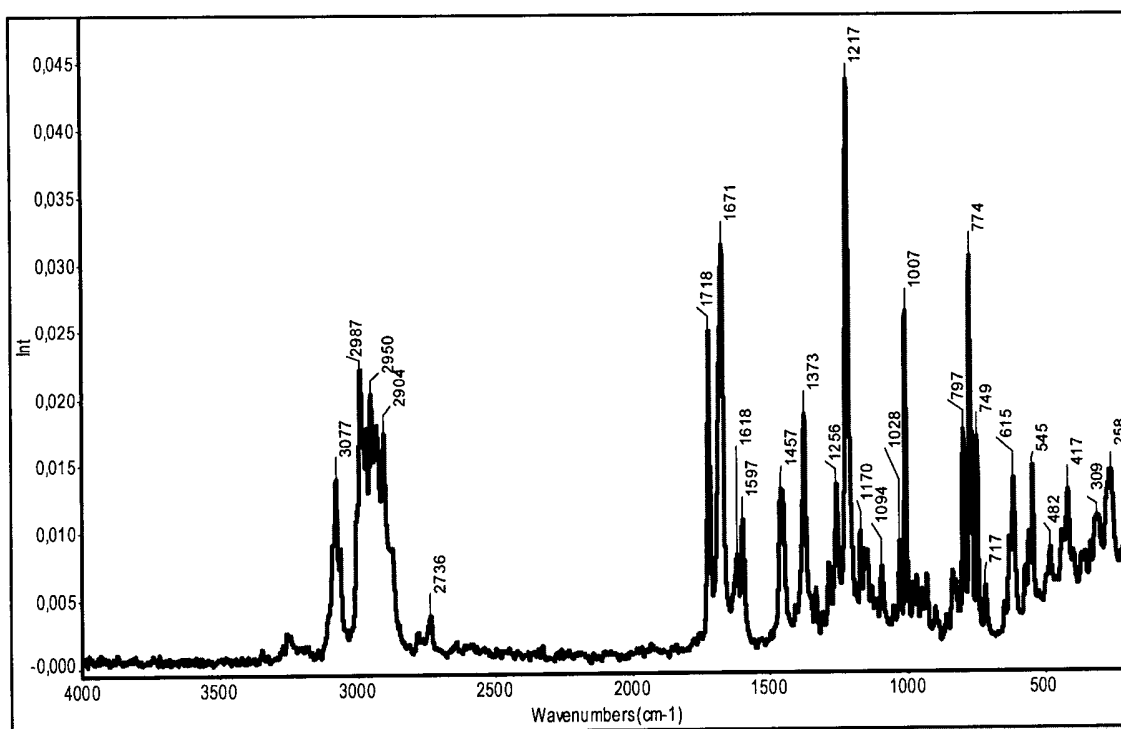
Výtěžek: 0,73 g (81 %)

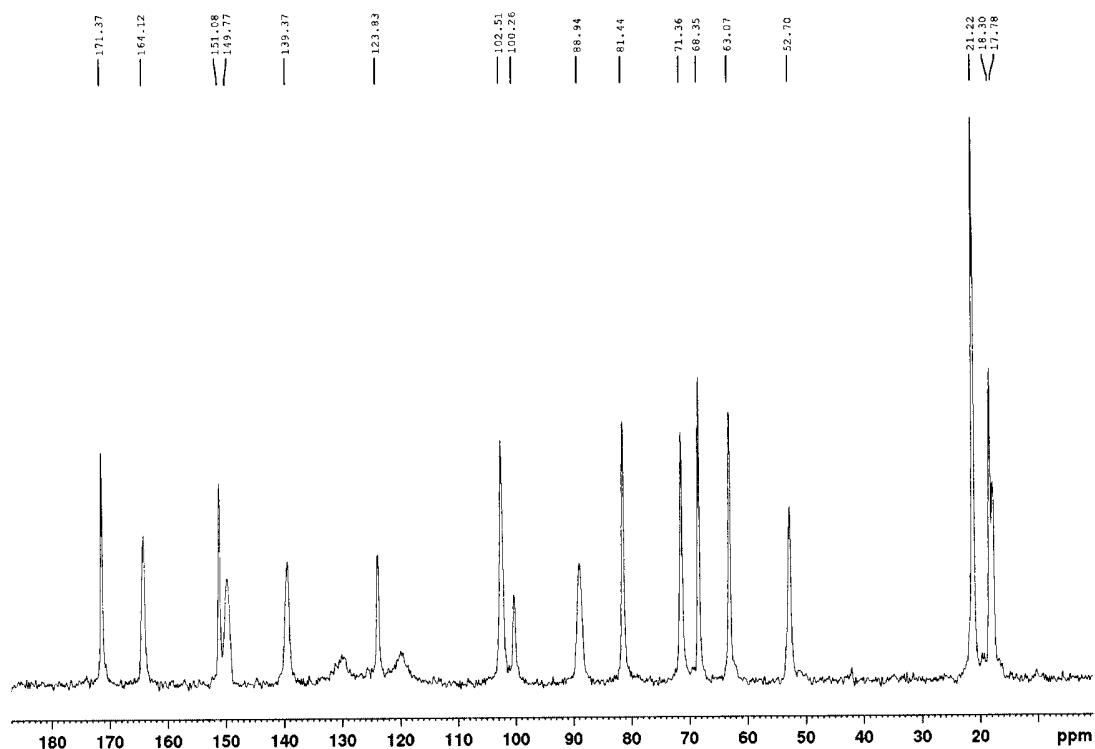
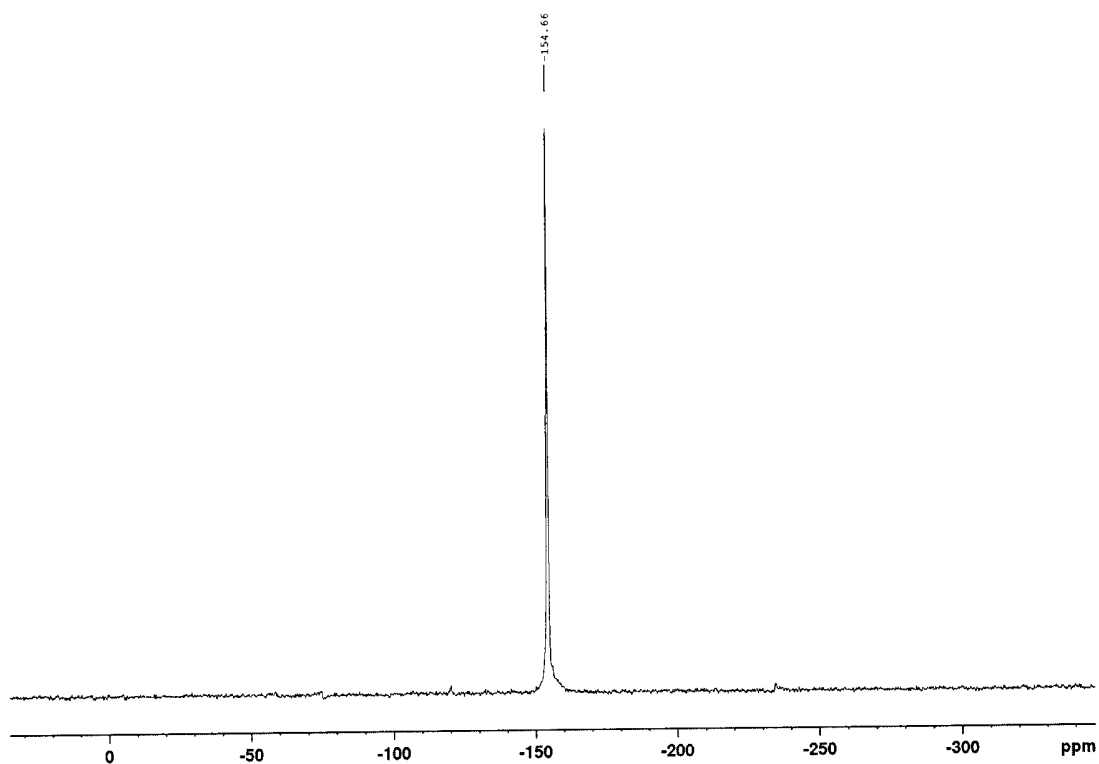
^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 11,50 (s, 1H), 7,53 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H), 7,33-7,36 (m, 2H), 7,18-7,21 (m, 2H), 7,117-7,20 (m, 1H), 6,03 (dd, $J = 12,7, 10,4$ Hz, 1H), 5,83 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H), 5,51 (dd, $J = 8,1, 1,6$ Hz, 1H), 5,51 (dd, $J = 8,1, 1,6$ Hz, 1H), 4,85 (hept, $J = 6,3$ Hz, 1H), 4,33 (dd, $J = 11,1, 5,7$ Hz, 1H), 4,20 (dt, $J = 11,6, 6,0$ Hz, 1H), 3,97 (dd, $J = 9,1, 4,7$ Hz, 1H), 3,85 – 3,76 (m, 1H), 1,25 (d, $J = 22,6$ Hz, 1H), 1,22 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 1,15 (dd, $J = 6,3, 0,8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 172,64 (d, $J = 5,1$ Hz), 162,78 (s), 150,71 (d, $J = 6,3$ Hz), 150,47 (s), 129,67 (s), 124,63 (s), 120,09 (d, $J = 4,9$ Hz), 102,28 (s), 101,04 (s), 99,60 (s), 79,47 (s), 71,51 (s), 68,02 (s), 64,66 (s), 49,79 (s), 26,86 (s), 21,42 (d, $J = 4,3$ Hz), 19,81 (d, $J = 6,5$ Hz), 16,56 (d, $J = 25,2$ Hz). ^{31}P NMR (101 MHz, DMSO) δ 3,80 (s). ^{13}C ssNMR (100 MHz,) δ

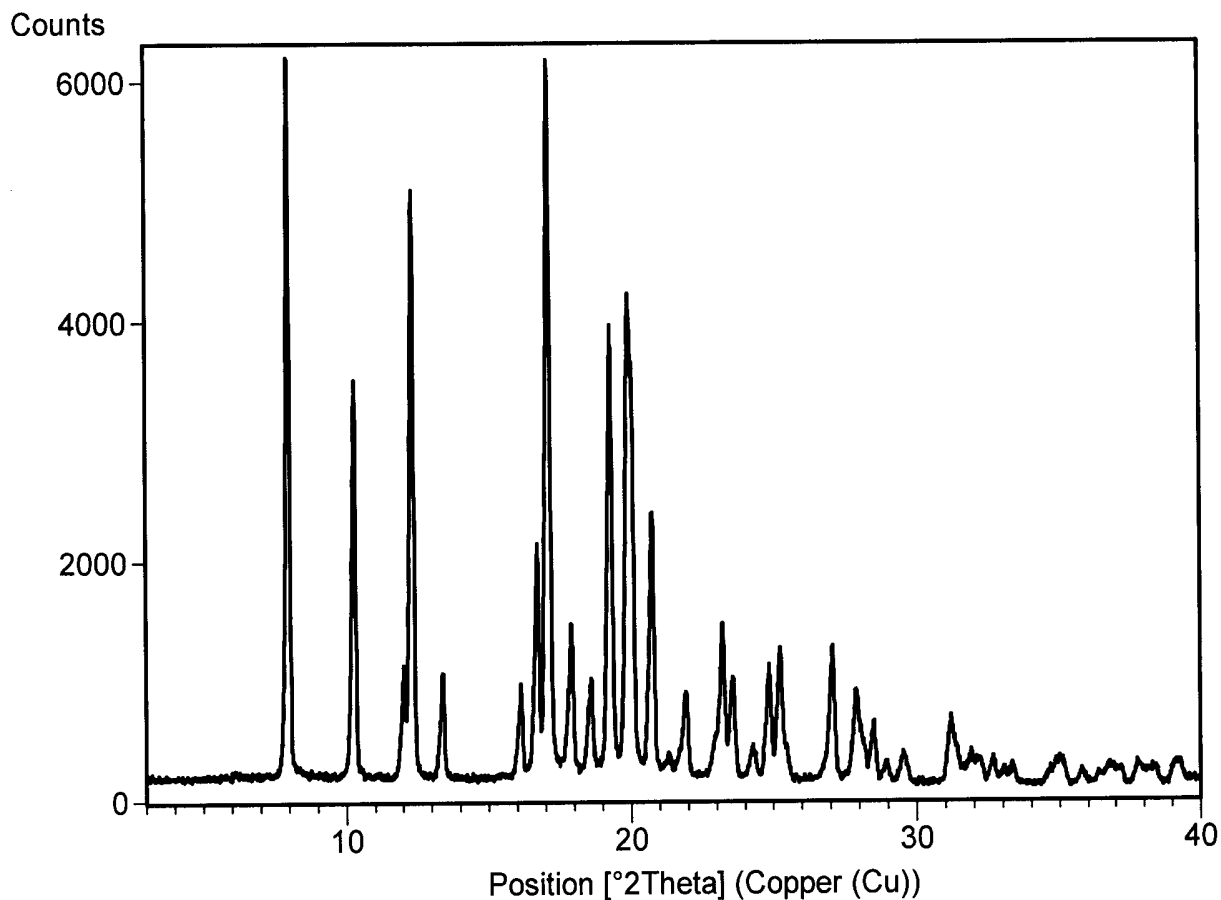
171,36; 164,12; 151,077; 149,765; 139,370; 123,829; 102,506; 100,263; 88,946; 81,439; 71,358;
68,353; 63,067; 52,396; 21,224; 18,303; 17,781 ppm. ^{19}F ssNMR δ -154,66 ppm HPLC (210
nm): $R_t = 9,853$ min.

Patentové nároky:

1. Krystalická forma sofosbuviru Z-1, charakterizovaná difrakčními píky 8,0; 12,3; 17,1; 19,9 a $20,8 \pm 0,2^\circ$ 2-theta za použití $\text{CuK}\alpha$ záření.
2. Krystalická forma podle nároku 1, která je dále charakterizovaná difrakčními píky 10,3; 13,4; 16,1; 17,9; 19,3; 23,6; 24,8 a $27,0 \pm 0,2^\circ$ 2-theta.
3. Krystalická forma sofosbuviru Z-1, charakterizovaná FTIR spektry s pásy 3251, 1719, 1669, 1265, 1092 a $945 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$.
4. Krystalická forma sofosbuviru Z-1, charakterizovaná FT-Ramanovým spektrem s maximy: 2987, 1718, 1671, 1373, 1217, 1007, $774 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$.
5. Krystalická forma sofosbuviru Z-1, charakterizovaná ^{19}F ss NMR spektry vykazujícími jediný pás odpovídající chemickému posunu $\delta - 154,66 \text{ ppm}$.
6. Způsob přípravy krystalické formy SOFOSBUVIRU Z-1 podle kteréhokoli z předchozích nároků, vyznačující se krystalizací z rozpouštědla nebo rozpouštědlové směsi ester C3 až C5 alkoholu a C1 až C4 kyseliny.
7. Způsob podle nároku 6, vyznačující se tím, že se jedná o ester s celkovým počtem uhlíků 5 až 8.
8. Způsob podle nároků 6 nebo 7, vyznačující se krystalizací z rozpouštědla nebo rozpouštědlové směsi obsahující n-butyl acetát.
9. Způsob podle nároků 6 až 8, vyznačující se tím, že se provádí z čistého nBuOAc.
10. Způsob podle nároků 6 až 8, vyznačující se tím, že se provádí ze směsi obsahující nBuOAc a ko-solventu.
11. Způsob podle nároku 10, kde ko-solvent je toluen.
12. Způsob podle nároku 10, kde ko-solvent je hexan.
13. Způsob podle nároku 10, kde ko-solvent je DCM.

Obrázek 1.: IR spektrum formy Z-1 Sofosbuviru**Obrázek 2.:** RAMANOVO spektrum formy Z-1 Sofosbuviru

Obrázek 3.: ^{13}C ssNMR pevné fáze formy Z-1 Sofosbuviru**Obrázek 4.:** ^{19}F ssNMR pevné fáze formy Z-1 Sofosbuviru

Obrázek 5. RTG práškový záznam formy Z-1 Sofosbuviru.**Obrázek 6.** DVS křivka Formy Z-1 Sofosbuviru.