

URZĄD
PATENTOWY
PRLPatent dodatkowy
do patentu nr _____Int. Cl.⁴ C07H 19/213

Zgłoszono: 84 10 09 (P. 249954)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 86 05 06

Opis patentowy opublikowano: 88 07 30

Twórcy wynalazku: Wojciech Jacek Stec, Janina Baraniak

Uprawniony z patentu: Polska Akademia Nauk, Centrum Badań
Molekularnych i Makromolekularnych,
Łódź (Polska)Sposób wytwarzania mieszaniny diastereoizomerycznych
3', 5'-cyklicznych anilidofosforanów nukleozydów

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania mieszaniny diastereoizomerycznych 3', 5'-cyklicznych anilidofosforanów nukleozydów o wzorach ogólnych 1a i 1b w których B oznacza resztę N⁶, N⁶-dibenzoiloadeniny, N²-izobutyryloguaniny, N⁴-izobutyrylocytozyny lub uracylu, a R oznacza grupę blokującą grupę hydroksylową, taką jak grupę o wzorze -C/O/C₆H₅ lub o wzorze -C/O/CH/CH₃/₂.

Związki o wzorze ogólnym 1a posiadają konfigurację Sp, a związki o wzorze ogólnym 1b posiadają konfigurację Rp.

Wytwarzane sposobem według wynalazku związki o wzorze ogólnym 1a i 1b, w którym B oznacza resztę N⁶, N⁶-dibenzoiloadeniny, gdy R oznacza grupę o wzorze -C/O/C₆H₅ lub B oznacza resztę N⁴-izobutyrylocytozyny, gdy R oznacza grupę o wzorze -C/O/CH/CH₃/₂ i w których B oznacza resztę uracylu, gdy R oznacza grupę o wzorze -C/O/C₆H₅ są związkami znanymi. Pozostałe związki o wzorach ogólnych 1a i 1b są związkami nowymi.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku są prekursorami w syntezie diastereoizomerycznych 3', 5'-cyklicznych tiofosforanów nukleozydów — siarkowych analogów 3', 5'-cyklicznych monofosforanów nukleozydów, związków wykazujących aktywność biologiczną.

Najważniejszy z tej grupy związków 3', 5'-cykliczny monofosforan adenozy (cAMP) pełniąc rolę „pośrednika drugiego rzędu” w zależności od rodzaju komórek wpływa na szereg wewnątrzkomórkowych procesów takich jak: przepuszczalność błon biologicznych, stymulacja kinazy białkowej, fosforylacja syntetazy glikogenowej, mediacja w działaniu neurotransmiterów i inicjacja transkrypcji genów (Advances in Cyclic Nucleotide Research — Wydawnictwo ciągłe, P. Greengard, G. A. Robinson et al. Ed. Raven Press N.Y. 1972).

Szczególnie interesujący aspekt stanowiła P-prochiralność cząsteczki 3', 5'-cyklicznych nukleotydów. Zmiana jednego z egzocyklicznych podstawników atomu fosforu na atom siarki wywołuje asymetrię atomu fosforu. W konsekwencji tiofosforanowe analogi 3', 5'-cyklicznych nukleotydów (cNMPS) stanowią cenne związki do badania procesów enzymatycznych.

Ostatnio ukazała się wzmianka o inhibicji glikogenolizy w izolowanych ze szczerów komórek wątroby przez Rp-cAMPS w przeciwieństwie do Sp-cAMPS, który powoduje aktywację kinazy proteinowej zależnej od cAMP i wzrost glikogenolizy (J.D. Rothermel, W. J. Stec, J. Baraniak, B. Jastorff, L.H. Parker Botelho- J. Biol. Chem. 258, 12125, 1983). Rp-3',5'-cykliczny tiofosforan adenozyiny (Rp-cAMPS) jest pierwszym spośród 600 zsyntetyzowanych analogów cAMP wykazujących antagonistyczną działalność w stosunku do cAMP polegającą na kompetycyjnym hamowaniu wiązania endogennego cAMP do holoenzymu, co powoduje zniesienie in vivo zarówno aktywacji kinazy proteinowej zależnej od cAMP jak i następnej aktywacji kinazy fosforylasy. W rezultacie następuje zahamowanie glikogenolizy czyli wydzielania glukozy. Dlatego też Rp-cAMPS może być zastosowany jako lek w chorobie „diabetes mellitus” popularnie zwanej cukrzycą, która charakteryzuje się wydzielaniem nadmiernej ilości glukozy.

Z publikacji w J.C.S. Chem. Commun., 940 (1979) znany jest sposób wytwarzania diastereoizomerów Rp- i Sp- 3', 5'-cyklicznych anilidofosforanów N⁶, N⁶, O²-tribenzoiloadenozyiny tj. związków o wzorze ogólnym 1a i 1b, w których B oznacza resztę N⁶, N⁶-dibenzoiloadeniny, a R oznacza grupę o wzorze -C/O/C₆H₅, stanowiących prekursorów do wytwarzania diastereoizomerów Rp- i Sp- 3', 5'-cyklicznego trifosforanu adenozyiny. Sposób ten polega na reakcji 3', 5'-cyklicznego fosforanu adenozyiny z chlorkiem benzoilu, a następnie działaniu trifenylofosfiny, czterochlorku węgla i aniliny w pirydynie jako rozpuszczalniku. Pozostałe znane związki o wzorach 1a i 1b otrzymano sposobem analogicznym.

Zasadniczą niedogodnością znanego sposobu jest bardzo niska wydajność, wynosząca tylko 9%, diastereoizomeru Sp- który stanowi substrat do otrzymywania aktywnego Rp-cAMPS.

Obecnie stwierdzono, że jeżeli reakcję wyjściowego zablokowanego 3', 5'-cyklicznego fosforanu nukleozydu z trifenylofosfiną i aniliną prowadzi się w obecności rozpuszczalnika aprotowego innego niż pirydyna, takiego jak nitrometan, chlorek metylenu, acetonitryl, tetrahydrofuran lub ich mieszaniny i jeżeli stosuje się perhalogenowany węglowodór o 1-6 atomach węgla lub mieszaninę tych węglowodórów, wówczas uzyskuje się wzrost wydajności izomeru Sp do 19-30%.

Stwierdzono ponadto, że wzrost wydajności izomeru Sp uzyskuje się także wtedy, gdy reakcję prowadzi się bez rozpuszczalnika, stosując tylko CCl₄ jako perhalogenowany reagent i rozpuszczalnik.

Sposób według wynalazku polega na tym, że 3', 5'-cykliczny fosforan nukleozydu o wzorze ogólnym 2, w którym R i B mają wyżej podane znaczenie, w postaci kwasu lub soli, poddaje się reakcji z trifenylofosfiną, aniliną i perhalogenowanym węglowodorem o wzorze C_nX_{2n+2}, w którym n oznacza liczbę 1-6, a X oznacza atom chloru lub bromu albo z mieszaniną perhalogenowanych węglowodórów o wzorze C_nX_{2n+2}, w którym n i X mają wyżej podane znaczenie, w obecności aprotowego rozpuszczalnika takiego jak nitrometan, chlorek metylenu, acetonitryl, tetrahydrofuran lub ich mieszaniny albo jako perhalogenowany węglowodór i rozpuszczalnik stosuje się CCl₄, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze od temperatury pokojowej do 45°C.

Korzystnie stosuje się perhalogenowany węglowodór o wzorze C_nX_{2n+2}, w którym n oznacza liczbę 2-6 lub jego mieszaninę z czterohalogenkiem węgla, w obecności rozpuszczalnika takiego jak nitrometan, chlorek metylenu, acetonitryl i tetrahydrofuran albo ich mieszaniny.

Sposób według wynalazku pozwala na pięciokrotne zwiększenie stereoselektywności reakcji w stosunku do znanej metody. W znanej metodzie Rp : Sp = 2 : 1, a w procesie prowadzonym sposobem według wynalazku Rp : Sp = 2 : 5. Tym samym zwiększa się wydajność diastereoizomerów Sp stanowiących prekursorów Rp-3', 5'-cyklicznych tiofosforanów nukleozydów. Jak już wspomniano, Rp-cAMPS może być stosowany w lecznictwie. Niżej podane przykłady ilustrują sposób według wynalazku.

Przykład I.

A) 3', 5'-cykliczny fosforan adenozyiny 0,66 g (2 mmole) dodano do 10 ml 0,5 M trietyloaminy. Otrzymany roztwór zatężono do sucha, a wodę usunięto przez 3-krotne zatężanie z 10 ml pirydyny. Trietyloamoniową sól cAMP rozpuszczono w 20 ml bezwodnej pirydyny i dodano 1,2 ml (10 mmoli) chlorku benzoilu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej w ciągu 2 godzin. Następnie nadmiar chlorku benzoilu zhydrolizowano dodając 5 ml wody. Produkt ekstrahowano 30 ml chloroformu. Warstwę ograniczoną zatężono do sucha, a ślady pirydyny usunięto przez zatężanie z toluenem. Pozostałość po rozpuszczeniu w chloroformie wytrząsano 3-krotnie z

5 ml 0,5 N kwasu solnego, a następnie przemyto wodą. Produkt krystalizowano z chloroformu otrzymując 0,90 g (70%) temperatura topnienia 153–155°C. $R_f/\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ 85:15/ 0,77; $\delta_{31} \text{P}(\text{CHCl}_3)$ -2,92 ppm.

B) do 1,92 g (3 mmole) 3', 5'-cyklicznego fosforanu N^6 , N^8 O_2' — tribenzoiloadenozyny dodano 1,2 g (4,5 mmola) trifenylofosfiny, 0,71 g (3 mmole) sześciochloroetanu i 15 ml suchego nitrometanu. Następnie wkroplono 0,46 g (3 mmole) czterochlorku węgla oraz 0,84 g (9 mmoli) świeżo destylowanej aniliny. Mieszaninę reakcyjną mieszając pozostawiono na 12 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie usunięto rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczono w chloroformie (30 ml) i warstwę chloroformową przemyto wodą. Rozdziálu mieszaniny na poszczególne diastereoizomery dokonane techniką chromatografii kolumnowej na Silicagelu 60 H stosując jako eluent układ CHCl_3 -EtOH- CH_3COOH (100:2:0,05). Frakcje zawierające bardziej mobilny izomer Sp (R_f 0,22) połączono i zatężono do sucha. Pozostałość rozpuszczono w chloroformie (4 ml) i wkroplono mieszając do mieszaniny eteru dietylowego i heksanu (1:1 400 ml). Wytrącony izomer Sp odwirowano otrzymując 0,47 g (22%) $\delta_{31} \text{P}(\text{CDCl}_3)$ + 1,41 ppm. Fd — MS: 716 m (z. Analogicznie, frakcje zawierające mniej mobilny izomer Rp (R_f 0,17) zatężone, a pozostałość krystalizowano z chloroformu otrzymując 0,13 g (6%) produktu, o temperaturze topnienia 155–157°C, $\delta_{31} \text{P}(\text{CDCl}_3)$ — 1,62 ppm, FD-MS: 716 m/z.

Przykład II. Do 1,92 g (3 mmole) 3', 5'-cyklicznego fosforanu N^6 , N^8 , O_2' -tribenzoiladenozyny dodano 1,2 g (4,5 mmola) trifenylofosfiny, 15 ml suchego czterochlorku węgla oraz 0,84 g (9 mmoli) świeżo destylowanej aniliny. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze 30–38°C w ciągu 5 godzin, a następnie pozostawiono na 12 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie postępując jak w przykładzie I, otrzymano 0,42 g (19,5%) izomeru Sp oraz 0,12 g (5,5%) izomeru Rp.

Przykład III.

A) Do 0,53 g (1 mmol) soli tri-n-butyloamoniowej 3', 5'-cyklicznego fosforanu guanozyny rozpuszczonej w 30 ml suchego dimetyloformamidu dodano 0,25 g (2 mmole) 4-dimetyloaminopirydyny i 3,3 ml (20 mmoli) bezwodnika izobutyrylowego. Mieszaninę reakcyjną mieszano 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 5 ml wody i roztwór mieszano w ciągu 4 godzin. Rozpuszczalnik usunięto zatężając na pompie olejowej. Pozostały olej rozpuszczono w 2 ml mieszaniny izopropanol — woda (85:15) i chromatografowano na kolumnie wypełnionej silicagelem (200–300 mesh) stosując jako eluent izopropanol-wodę (85:15). Otrzymane 0,50 g (74,6%) produktu; R_f 0,61, UV (H_2O) λ_{max} 254, 276 nm, $\delta_{31} \text{P}(\text{H}_2\text{O})$ — 1,75 ppm.

B) Do 2,0 g (3 mmole) soli tri-n-butyloamoniowej 3', 5'-cyklicznego fosforanu N^1 , O_2' -diizobutyryloguanozyny dodano 1,2 g trifenylofosfiny, 0,71 g (3 mmole) sześciochloroetanu i 15 ml suchego acetonitrylu. Następnie wkroplono 0,46 g (3 mmole) czterochlorku węgla oraz 0,84 g (9 mmoli) świeżo destylowanej aniliny. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 12 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie rozpuszczalnik usunięto zatężając mieszaninę reakcyjną na pompce wodnej. Suchą pozostałość rozpuszczono w 20 ml chloroformu i warstwę chloroformową przemyto wodą.

Rozdziálu mieszaniny na poszczególne diastereoizomery dokonano techniką chromatografii kolumnowej na Sicilacagelu 60H, stosując jako eluent $\text{CHCl}_3\text{CH}_3\text{OH}$ (95:5). Otrzymano w ten sposób 0,67 g (30%) izomeru Sp-, R_f 0,27, $\delta_{31} \text{P}(\text{CHCl}_3)$ — 2,12 ppm, oraz 0,13 g (6%) izomeru Rp- R_f 0,21 $\delta_{31} \text{P}(\text{CHCl}_3)$ — 1,44 ppm.

Przykład IV.

A) 3', 5'-cykliczny fosforan cytydyny 0,31 g (1 mmol) dodano do 5 ml 0,5 M trietyloaminy. Otrzymany w ten sposób roztwór zatężono do sucha, a powstały olej rozpuszczono w 10 ml bezwodnej pirydyny i ogrzano do 120°C w atmosferze argonu. Po doprowadzeniu do temperatury pokojowej dodano 3,3 ml (20 mmoli) bezwodnika izobutyrylowego. Mieszaninę ogrzewano ponownie do 120°C w ciągu 5–10 minut i później pozostawiono na 24 godziny w temperaturze pokojowej w atmosferze azotu. Następnie rozpuszczalnik usunięto zatężając na pompce wodnej. Oleistą pozostałość rozpuszczono w 5 ml chloroformu i roztwór ten wkroplono do mieszaniny 1:1 heksanu i eteru dietylowego (150 ml). Wytrącony produktu odfiltrowano, przemyto eterem i wysuszono. Otrzymano 0,43 g (78%) produktu: R_f 0,55; UV (H_2O); λ_{max} 278 nm, $\delta_{31} \text{P}(\text{H}_2\text{O})$ — 2,66 ppm.

B) Do 1,64 g (3 mmole) soli trietyloamoniowej 3', 5'-cyklicznego fosforanu N^4 , O_2' -diizobutyrylocytydyny dodano 1,2 g (4,5 mmola) trifenylofosfiny, 1,07 g (4,5 mmola) sześciochloroetanu i 15 ml suchego chlorku metylenu. Następnie wkroplono 0,84 g (9 mmoli) świeżo destylo-

wanej aniliny. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono mieszając na 12 godzin w temperaturze pokojowej. Potem rozpuszczalnik usunięto na pompce wodnej, a suchą pozostałość rozpuszczono w chloroformie (30 ml) i warstwę chloroformową przemyto wodą.

Rozdziału mieszaniny na poszczególne diastereoizomery dokonano techniką chromatografii kolumnowej na Silicagelu 60 H stosując jako eluent $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (25 : 1). Frakcje zawierające bardziej mobilny izomer Rp (R_f 0,70) połączono i zatężono do sucha. Pozostałość rozpuszczono w chloroformie (3 ml) i wkroplono do mieszaniny eteru dietylowego (300 ml). Wytrącony izomer Rp odwirowano otrzymując 0,13 g (8,3 %) $\delta_{31} \text{P(CHCl}_3\text{)}$ — 0,64 ppm, FD-MS : 520 m/z. Analogicznie frakcje zawierające mniej mobilny izomer Sp (R_f 0,60) zatężono, a następnie wytrącono z mieszaniny eteru dietylowego. Otrzymano 0,39 g (25%) produktu: $\delta_{31} \text{P(CHCl}_3\text{)}$ 0,97 ppm, FD-MS : 520 m/z.

Przykład V.

A) 0,41 g (1 mmol) soli trietyloaminowej 3', 5'-cyklicznego fosforanu urydyny rozpuszczono w 10 ml pirydyny i dodano 0,6 ml (5 mmoli) chlorku benzoilu. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej w ciągu 4 godzin. Produkt ekstrahowano z mieszaniny reakcyjnej chloroformem (3×15 ml). Warstwę chloroformową po zatężeniu do 4 ml wkroplono do 150 ml eteru dietylowego. Wytrącony produkt odfiltrowano, przemyto 2 ml eteru dietylenowego. Po wysuszeniu otrzymano 0,38 g (74,4%); ($\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$, 85 : 15 (0,64; UV (CH_3OH); λ_{max} 264 nm; $\delta_{31} \text{P(CHCl}_3\text{)}$ -3,22 ppm.

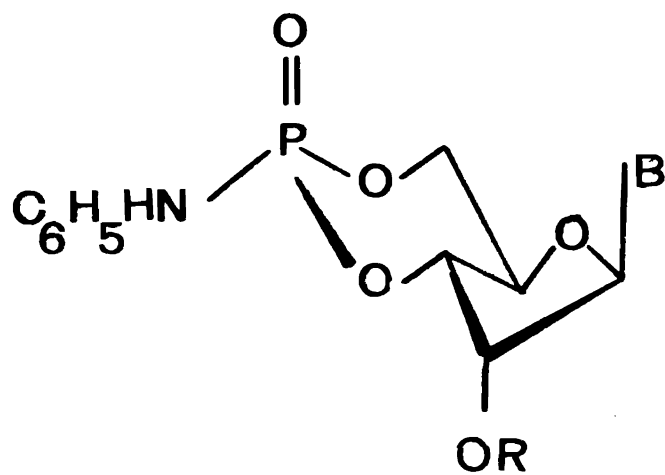
B) DO 1,23 g (3 mmole) 3', 5'-cyklicznego fosforanu O^{2'}-benzoilourydyny dodano 1,2 g (4,5 mmola) trifenylofosfiny, 0,71 g (3 mmole) sześciochloroetanu i 10 ml suchego acetonitrylu. Następnie wkroplono 0,99 g (3 mmole) czterobromku węgla oraz 0,84 g (9 mmole) świeżo destylowanej aniliny. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze 40–45°C w ciągu 5 godzin, a następnie pozostawiono na 12 godzin w temperaturze pokojowej. Dalszy sposób postępowania analogiczny jak w przykładzie IV doprowadzi do otrzymania 0,146 g (10%) izomeru Rp (R_f 0,74); $\delta_{31} \text{P(CHCl}_3\text{)}$ — 1,34 ppm, EJ — MS : 485 m/z oraz 0,41 g (28%) izomeru Sp (R_f 0,60); $\delta_{31} \text{P(CHCl}_3\text{)}$ 0,54 ppm, EJ-MS : 485 m/z.

Zastrzeżenia patentowe

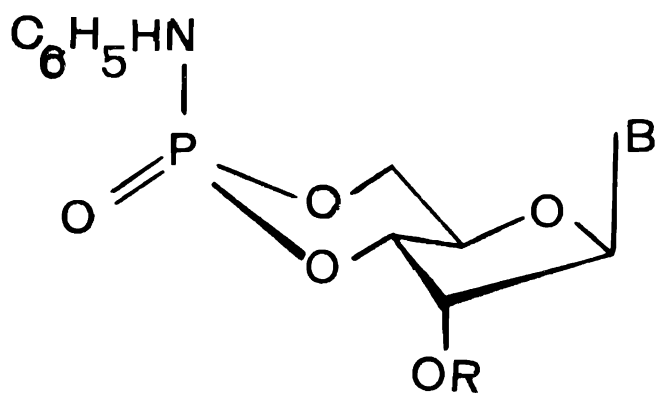
1. Sposób wytwarzania mieszaniny diastereoizomerycznych 3', 5'-cyklicznych anilidofosforanów nukleozydów o wzorach ogólnych 1a i 1b, w których B oznacza resztę N⁶, N⁶-dibenzoiloadeniny, gdy R oznacza grupę o wzorze $-\text{C/O/C}_6\text{H}_5$ lub B oznacza resztę N⁴-izobutyrylocytozyny, gdy R oznacza grupę o wzorze $-\text{C/O/CH/CH}_3/2'$, lub B oznacza resztę uracylu, gdy R oznacza grupę o wzorze $-\text{C/O/C}_6\text{H}_5$ w reakcji 3', 5'-cyklicznego fosforanu nukleozydu w postaci kwasu lub soli o wzorze ogólnym 2, w którym B i R mają wyżej podane znaczenie z trifenylofosfiną, CCl_4 stanowiącym perhalogenowany węglowodór i aniliną w rozpuszczalniku, **znamienny tym**, że stosuje się perhalogenowany węglowodór o wzorze $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}'$, w którym n oznacza liczbę 1–6 a X oznacza atom chloru lub bromu, albo mieszaninę perhalogenowanych węglowodorów, o wzorze $\text{C}_n\text{X}_{2n+2}'$, w którym n i X mają wyżej podane znaczenie, w obecności rozpuszczalnika aprotowego takiego jak nitrometan, chlorek metylenu, acetonitryl, tetrahydrofuran lub ich mieszaniny, albo jako perhalogenowany węglowodór i rozpuszczalnik stosuje się tylko CCl_4 , przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze od temperatury pokojowej do 45°C.

2. Sposób wytwarzania mieszaniny nowych diastereoizomerycznych 3', 5'-cyklicznych anilidofosforanów nukleozydów o wzorach ogólnych 1a i 1b, w których B oznacza resztę N²-izobutyryloaguaniny, gdy R oznacza grupę blokującą o wzorze $-\text{C/O/CH/CH}_3/2'$ lub o wzorze $-\text{C/O/C}_6\text{H}_5$ lub B oznacza resztę N⁶, N⁶-dibenzoileadeniny, gdy R oznacza grupę blokującą o wzorze $-\text{C/O/CH/CH}_3/2'$, lub B oznacza resztę N⁴-izobutyrylocytozyny, gdy R oznacza grupę blokującą o wzorze $-\text{C/O/C}_6\text{H}_5$ lub w których B oznacza resztę uracylu, gdy R oznacza grupę blokującą o wzorze $-\text{C/O/CH/CH}_3/2'$, **znamienny tym**, że 3', 5'-cykliczny fosforan nukleozydu, w postaci kwasu lub soli, o wzorze ogólnym 2, w którym B i R mają wyżej podane znaczenie poddaje się reakcji z trifenylofosfiną, aniliną i perhalogenowanym węglowodorem o wzorze $\text{C}_n\text{X}_{2n+2}'$, w którym n oznacza liczbę 1–6, a X oznacza atom chloru lub bromu albo z mieszaniną perhalogenowanych węglowodorów o wzorze $\text{C}_n\text{X}_{2n+2}'$, w którym n i X mają wyżej podane znaczenie w obecności rozpuszczalnika aprotowego takiego jak nitrometan, chlorek metylenu, acetonitryl, tetrahydrofuran lub ich mieszaniny albo jako perhalogenowany węglowodór i rozpuszczalnik stosuje się tylko CCl_4 , przy czym, reakcję prowadzi się w temperaturze od temperatury pokojowej do 45°C.

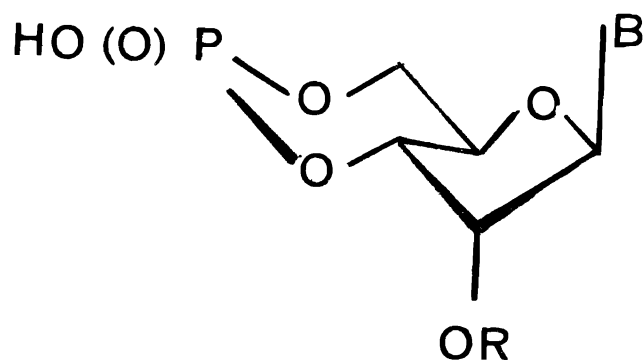
142894



WZOR 1a



WZOR 1b



WZOR 2