

(11) *Número de Publicação:* PT 88017 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C07H019/16 A

A61K031/70 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) *Data de depósito:* 1988.07.15

(30) *Prioridade:* 1987.07.17 US 074844

(43) *Data de publicação do pedido:*
1989.06.30

(45) *Data e BPI da concessão:*
08/94 1994.08.08

(73) Titular(es):

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
345 PARK AVENUE NEW YORK, N. Y. 10154 US

(72) Inventor(es):

PAUL R. BRODFUEHRER US
DANIEL A. BENIGNI US
VITTORIO FARINA US

(74) Mandatário(s):

ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
RUA DE MIGUEL LUIPI 16 R/C 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DIDESOXI-INOSINA MEDIANTE DESAMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE DIDESOXI-ADENOSINA

(57) *Resumo:*

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 88 017

REQUERENTE: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, uma sociedade organizada e existindo segundo as leis do Estado de Delaware, Estados Unidos da América, industrial, com sede em 345 Park Avenue, New York, NY 10 154, Estados Unidos da América.

EPÍGRAFE: " PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DIDESOXI -
-INOSINA MEDIANTE DESAMINAÇÃO ENZIMÁTICA
DE DIDESOXI-ADENOSINA "

INVENTORES: Vittorio Farina, Daniel A. Benigni, Paul R. Brodfuehrer.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

Estados Unidos da América, em 17 de Julho de 1987, sob o nº. 074,844.

R. 12. 4. 33. 12

1

117

DESCRIÇÃO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DIDESOXI-INOSINA MEDIANTE
DESAMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE DIDESOXI-ADENOSINA"

Referência bibliográfica

Esta patente de invenção é uma continuação em parte da patente de invenção norte-americana N° 07/074 844 depositada em 17 de Julho de 1987.

Antecedentes da invenção

Campo da invenção

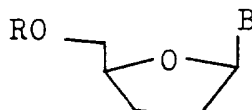
A presente invenção refere-se a um processo melhorado para a preparação de β -(D)-2'-3'-didesoxi-inosina.

Antecedentes e referências relacionadas

Normalmente sintetiza-se a 2', 3'-didesoxi-citidina (ddC) a partir de 2-desoxi-citidina[1,2]. Trata-se de um método geral para a síntese de 2',3'-didesoxinucleosidos. Os materiais iniciais para esta síntese são contudo extremamente dispendiosos e não estão disponíveis a granel. Para além disso, os reagentes necessários para esta desoxigenação também são muito dispendiosos.

A patente de invenção norte-americana da

série nº 028.817 depositada em 20 de Março de 1987, co-propriedade dos requerentes da presente invenção, descreve um processo para a produção de 2',3'-didesoxinucleosidos de fórmula geral



na qual

B representa uma base purínica ou pirimidínica e
R representa um átomo de hidrogénio ou um grupo protector do radical hidroxil

de acordo com as fases seguintes:

a) conversão de uma γ -carboxi- γ -butirolactona em uma 5-O-grupo protector do radical hidroxil-metil- γ -butirolactona b) conversão do composto intermédio obtido na fase a) em 5-O-grupo protector do radical hidroxil-metil-2', 3'-didesoxipentofuranose, c) conversão do composto intermédio obtido na fase b) em 1-O-grupo activador-5-O-grupo protector do radical hidroxil-metil-2',3'-didesoxipentafuranose, d) conversão do composto intermédio obtido na fase c) em 1-grupo eliminável-5-O-grupo protector do radical hidroxil- 2',3'-didesoxipentafuranose, e) reacção do composto intermédio da fase d) com uma base purínica ou pirimidínica activada e f) recuperação do didesoxinucleosido proveniente da fase e). O produto resultante consiste numa mistura de anómeros β e α que podem ser separados utilizando-se técnicas de cristalização e cromatograficas convencionais do campo técnico a que esta invenção

se refere.

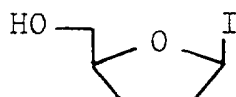
Permanece neste campo, a necessidade de melhorar o processo pelo qual se podem obter β -anómeros de (D)-2', 3'-didesoxinucleosidos geralmente activos, ou mais activos, de um modo selectivo sem utilizar a uma separação cromatográfica ou por recristalização fraccionada, dispendiosa e demorada de β - e α -anómeros, o que é particularmente importante quando se pretendem grandes quantidades de uma determinada forma β -anomérica.

A inosina, quimicamente a 9- β -(D)-ribofuranosil-hipoxantina, obtém-se bioquimicamente por desaminação enzimática da adenosina, quimicamente o 9- β -(D)-ribofuranosil-9H-purin-6-amino. Este processo, utilizando adenosinadesaminase, tem lugar para degradar metabolicamente as purinas até hipoxantinas que são excretadas pelos animais superiores. A inosina pode preparar-se a partir da adenosina por incubação com adenosinadesaminase purificada fornecida por fontes biológicas como, por exemplo, o intestino bovino. Em aplicações como estas, em que se encontram envolvidos substratos naturais, sabe-se que a enzima desamina selectivamente apenas um enantiómero do par racémico. A especificidade enzimática não seria anteriormente conhecida quando se consideravam como substratos misturas anoméricas de nucleósidos modificados estruturalmente. A especificidade com base no processo conhecido para a selecção enantiomérica da enzima não constitui o fundamento para a especificidade quando aplicada a uma mistura anomérica.

4

Resumo da presente invenção

Em resumo, a presente invenção consiste num processo eficaz para se produzir selectivamente a β -(D)-2', 3'-didesoxi-inosina representada pela fórmula



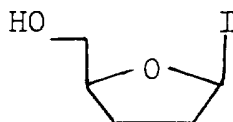
Fórmula A

na qual

I representa uma base purínica, a inosina. Este processo envolve a produção de uma mistura α -, β -anomérica de (D)-2',3'-didesoxiadenosina, que se submete depois a desaminação enzimática selectiva convertendo a base adenosínica em inosina apenas relativamente ao isómero β -(D) que é facilmente isolável e purificado por simples recristalização.

Descrição detalhada da presente invenção

A presente invenção consiste em um processo melhorado para a preparação selectiva de β -(D)-2'-3'-didesoxiinosina de fórmula



Fórmula A

na qual

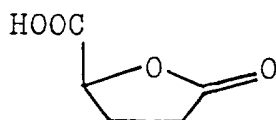
I representa uma base purina, a inosina, que consiste nas fases:

4.

1. preparação de uma mistura anomérica de α - e β -(D)-2',3'-didesoxiadenosina;
2. desaminação selectiva do anómero β -(D)-2',3'-didesoxiadenosina mediante contacto da mistura anomérica da fase 1 com uma enzima, a adenosina-desaminase; e
3. recolha da β -(D)-2',3'-didesoxiinosina preparada na fase 2.

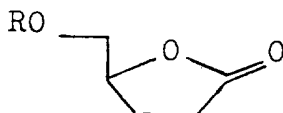
Um processo característico para a preparação da mistura anomérica utilizada na fase 1 consiste:

- a) na conversão da (D)- γ -carboxi- γ -butirolactona de fórmula



Fórmula 1

em uma 5-O-(grupo protector do radical hidroxil)-metil- γ -butirolactona de fórmula geral

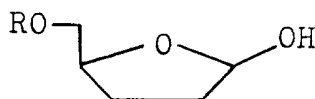


Fórmula 2

na qual

R representa um grupo protector do radical hidroxil; fazendo reagir o composto de fórmula 1 com um agente redutor do grupo carboxilo e protegendo depois o grupo hidroximetil resultante;

b) na conversão do composto intermédio obtido na fase a) de fórmula geral 2 em uma 5-O-(grupo protector do radical hidroxil)-metil-2,3-didesoxi-(D)-pentofuranose de fórmula geral

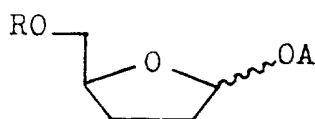


Fórmula 3

na qual

R representa um grupo protector do radical hidroxil; fazendo reagir um composto de fórmula geral 2, citada antes, com um agente redutor do grupo carbonilo;

c) na conversão do composto intermédio obtido na fase (B), de fórmula geral 3, em uma 1-O-(grupo de activação)-5-O-(grupo protector do radical hidroxil)-2,3-didesoxi-(D)-pentofuranose de fórmula geral



Fórmula 4

na qual

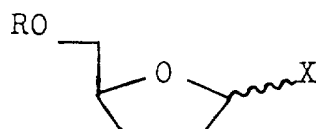
R representa um grupo protector do radical hidroxil, e

A representa um grupo activador do átomo de O escolhido entre grupos alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alquiltiocarbonilo, ariltiocarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo e carbonato em que o radical alquilo pode ser um grupo alquilo

4.

C_1-C_3 eventualmente substituído e o radical arilo pode ser um grupo fenilo eventualmente substituído comportando os grupos alquilo e arilo 1 a 3 substituintes escolhidos entre átomos de halogéneo ou grupos alcoxi C_{1-3} , fazendo reagir um composto de fórmula geral 4, citado antes, com um agente de acilação, sulfonação ou carbonilação de acordo com o grupo representado pelo símbolo A definido antes;

d) na conversão do composto intermédio proveniente da fase (c), de fórmula geral 4, mediante reacção com um composto de fórmula geral HX e um halogeneto de trimetilsililo, em uma 1-grupo-eliminável-5-O-grupo protector do radical hidroxí-2,3-didesoxi-(D)-pentofuranose de fórmula geral



Fórmula 5

na qual

R representa um grupo protector do radical hidroxí, e

X representa um grupo eliminável escolhido entre átomos de cloro, bromo, iodo ou flúor;

e) na reacção do composto intermédio obtido na fase d), de fórmula geral 5, com um derivado de adenina activado em que a base, a adenina, foi activada fazendo

reagir os grupos amino e hidroxí terminais do núcleo da adenina com um composto de activação escolhido entre agentes de sililação, acetilação e benzoilação, eventualmente na presença de um ácido de Bronsted e de um ácido de Lewis e na presença de um dissolvente orgânico inerte; e

f) na separação da mistura anomérica de α - e β -(D)-2',3'-didesoxiadenosina após cisão do grupo 5-O-grupo protector do radical hidroxí do composto intermédio preparado na fase (e) citada antes.

O material inicial (D)- γ -carboxi- γ -butirolactona pode ser obtido de um modo conveniente a partir do ácido glutâmico, mediante utilização de técnicas convencionais descritas na bibliografia química (3).

Uma associação de reacções químicas produz uma 2,3-didesoxipentofuranose bloqueada apropriada, 3. Este composto e os seus derivados são conhecidos da literatura da especialidade.

Assim, a conversão do material inicial, a (D)- γ -carboxi- γ -butirolactona, em uma 5-O-grupo protector do radical hidroxí- metil-butírolactona, na fase a) envolve a redução do grupo γ -carboxilo em um grupo hidroxí-metilo seguida da reacção com um reagente que introduz um grupo protector do radical hidroxí. Por exemplo, a redução do grupo γ -carboxilo e a protecção do grupo γ -hidroxí-metilo resultante por meio do grupo benzilo (PhCH_2 -), na fase a), conseguiram-se mediante a reacção sucessiva do composto inicial de fórmula 1 com $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$ e PhCH_2Br .

O grupo funcional álcool primário pode ser

protegido sob a forma de um grupo éter, tal como um grupo triálquilo ou dialquilo-arilo ou diaril-alquilo ou triaril-sililo, um grupo benzilo eventualmente substituído, alquilo eventualmente substituído, ou um éter alílico ou sob a forma de um grupo éster, tal como um grupo benzoílo, mesitoílo, pivaloílo, acetilo eventualmente substituído ou um éster de um carbonato.

Ver "Protective Groups in Organic Synthesis", T. W. Greene, John Wiley, New York 1981 para uma descrição mais detalhada dos grupos protectores e da química relacionada com os mesmos. No aspecto mais preferido, utilizou-se como grupo protector do radical hidroxil na função álcool primário na posição 5 o grupo benzilo e, preferivelmente, o grupo benzoílo devido à sua estabilidade e ainda porque a sua preparação é bem conhecida.

A conversão da 5-O-grupo protector do radical hidroxil- γ -butirolactona em 5-O-grupo protector do radical hidroxil-2,3-didesoxipentofuranose de fórmula 3 na fase b), foi conseguida mediante a reacção do composto intermédio de fórmula 2, com hidreto de sódio e HCO_2Et seguida de ácido clorídrico.

Os técnicos nesta matéria compreenderão que qualquer um dos numerosos agentes de redução pode ser utilizado para realizar qualquer ou ambas as fases a) e b) independentemente, isto é, uma a seguir à outra, ou simultaneamente. Outros agentes de redução utilizáveis, além do BH_3 , SMe_2 , para qualquer das fases a) e b), como referido antes, são: boro-hidreto de sódio, boro-hidreto de sódio mais cloreto de lítio ou cloreto de alumínio ou fluoreto de boro,

4.

hidreto de alumínio e lítio, $\text{LiAlH}(\text{OMe})_3$, $\text{LiAlH}(\text{O}-t\text{-Bu})_3$, $(\text{Sia})_2\text{BH}$ (disiamilborano e outros dialquilboranos) e outros semelhantes. O disiamilborano é o agente preferido devido ao seu fácil manuseamento e capacidade reactiva.

A conversão na fase c) do composto intermédio de fórmula geral 3 no composto intermédio de fórmula geral 4, que possui um grupo hidroxil activado na posição C(1) do núcleo da didesoxipentofuranose pode obter-se utilizando qualquer reagente capaz de converter este grupo hidroxil em um grupo que pode ser deslocado facilmente por um átomo de cloro ou de bromo após reacção com ácido clorídrico ou ácido bromídrico ou, preferivelmente TMSBr ou $\text{TMSCl}(+)$ quantidade catalítica de TMSI ("TMS" representa o grupo trimetilsililo). Um tal grupo que pode ser deslocado facilmente, inclui os grupos de activação do átomo de O escolhidos entre grupos alquil-carbonilo, arilcarbonilo, alquiltiocarbonilo, ariltiocarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo e carbonato em que o grupo alquilo pode ser um grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$ eventualmente substituído e o grupo arilo pode ser um grupo fenilo eventualmente substituído e em que o substituinte nos radicais alquilo ou arilo pode ser escolhido entre um a três grupos escolhidos entre átomos de halogéneo ou grupos alcoxi $\text{C}_1\text{-C}_3$. De preferência este grupo de activação é escolhido entre grupos acetoxi e benzoiloxi correspondentes, referidos antes, escolhendo-se, de preferência, um grupo acetoxi. A fase c) realizou-se de forma apropriada utilizando anidrido acético/piridina.

O deslocamento na fase d) do grupo funcional 1-O-grupo de activação com um grupo eliminável escolhido en-

tre um átomo de cloro ou de bromo, pode realizar-se mediante o tratamento de 4 com ácido clorídrico ou ácido bromídrico no seio de cloreto de metileno, a baixa temperatura, para se obterem halogenetos de furanosilo 5a e 5b que estão presentes em solução, sob a forma de uma mistura de anómeros (α e β).

Na fase e) do processo, de acordo com a presente invenção, fez-se reagir o composto intermédio de fórmula geral 5, proveniente da fase d) referida antes, com adenina activada mediante reacção com reagentes de activação bem conhecidos, para se obter uma adenina sililada, acetilada ou benzoílada, ou outra adenina acilada, na presença de um dissolvente polar ou não polar adequado e, eventualmente, na presença de um ácido de Lewis, tal como, por exemplo, halogenetos de boro, halogenetos de alumínio, halogenetos de titânio, cloreto de estanho (IV), halogenetos de zinco, brometo de trimetilsililo, iodo, trifalato e qualquer outra espécie de reagentes habitualmente utilizados nas reacções de glicolização na presença de um ácido de Bronsted, tal como o ácido clorídrico, o ácido bromídrico ou o ácido iodídrico. Nesta fase e) é particularmente útil a utilização de adenina sililada na presença de dissolventes não polares, tais como, por exemplo, o benzeno, o tolueno, o clorofórmio, o diclorometano, o dicloroetano e o tetracloreto de carbono. Exemplos de dissolventes polares úteis incluem outros dissolventes, tais como o tetrahydrofurano e o dioxano, nitrilos, tais como o acetonitrilo, a dimetilformamida e o dimetilsulfóxido. Um exemplo de um pro-

cesso útil para se realizar a fase e) é descrito por Brundidge et al., na patente de invenção norte-americana 4.625.020 que descreve o acoplamento de pirimidinas sililadas, em que átomos de hidrogénio activos de grupos hidroxil e amino são bloqueados por grupos sililo, tais como o grupo trimetilsililo, com um halogeneto de 2-desoxi-2-fluoro-arabinofuranosilo. Quando se aplicou a técnica referenciada na fase (e) fez-se reagir uma base adenínica com todos os átomos de hidrogénio activos do radical amino bloqueados pelo grupo trimetilsililo com um composto intermédio de fórmula geral 5.

Neste caso o tratamento do composto intermédio de fórmula geral 5 com uma adenina sililada, como se definiu antes, no seio de diclorometano e de clorofórmio forneceu a (D)-2',3'-didesoxiadenosina protegida sob a forma de uma mistura de anómeros.

Alternativamente, num outro aspecto de acordo com a presente invenção, quando o grupo representado por "A" na fase c) é um grupo acetilo, o composto intermédio da fase c) pode reagir com um derivado activado de adenina na presença de um ácido de Lewis como na fase e) para se obter deste modo a 5-O-grupo protector do radical hidroxil-2',3'-didesoxiadenosina sem realizar a fase d).

Como se referiu antes, ainda noutro aspecto, mais preferido de acordo com a presente invenção, fez-se contactar o composto 1-O-acetil-5-O-benzoil-2,3-pentofuranose de fórmula 4, proveniente da fase c), primeiro com bromotrimetilsilano e depois com uma bis-silil-adenina para se obter, numa única fase, sem isolamento do composto

4.

intermédio 1-bromo-5-O-benzoí1-2,3-pentofuranose, tal como na fase d), para se obter a 5-O-benzoí1-2',3'-didesoxiadenosina como o produto proveniente das fases associadas d) e e).

Na fase f) do processo de acordo com a presente invenção, submeteu-se a 5'-O-benzoí1-2',3'-didesoxiadenosina a uma reacção química para se eliminar o grupo protector do átomo de oxigénio em posição 5. Os processos apropriados para eliminar este grupo protector, são processos bem conhecidos no campo a que esta invenção se refere e os exemplos estão descritos em "Protective Groups in Organic Synthesis" de T. W. Greene, John Wiley, New York, 1981, como se referiu anteriormente. Mais preferivelmente, submeteu-se a 5'-O-benzoí1-2',3'-didesoxiadenosina a metanol saturado com amoníaco para se obter a 2',3'-didesoxiadenosina sob a forma de uma mistura de anómeros α e β .

Na fase 2. do processo, de acordo com a presente invenção, fez-se contactar a mistura de α - e β -(D)-2,3 -didesoxiadenosina proveniente da fase 1. com a enzima adenosina-desaminase (ADA), isolada do baço de vitela, num meio aquoso neutro. Esta enzima catalisa, de um modo selectivo, a desaminação do anómero β da (D)-2',3'-didesoxiadenosina para se obter quantitativamente a β -(D)-2',3'-didesoxi-inosina. Ainda que se tivesse utilizado a adenosina-desaminase (ADA) proveniente do baço de vitela nos exemplos presentes, aceita-se que qualquer preparação de adenosina-amino-hidrolase ("desaminase" EC 3.5.4.4.) seria adequada. Assim, a utilização de qualquer preparação de adenosina-amino-hidrolase (ou "desaminase") eficaz para

desaminar selectivamente o anómero β -2',3'-didesoxiadenosina é abrangido pelo âmbito do processo reivindicado na presente invenção. Assim, para além da utilização da enzima livre em um meio apropriado, tal como num meio aquoso neutro descrito antes, pode utilizar-se a enzima, ADA, imobilizada num substrato compatível apropriado tal como, por exemplo Eupergit C TM, substrato de polímero acrílico de oxirano, da Rohm Pharma GMB. A ADA pode ser ligada ao polímero utilizando-se técnicas convencionais.

Recuperou-se facilmente o produto 2',3'-didesoxi-inosina por recolha da mistura reaccional proveniente da fase 2., eliminando os reagentes insolúveis e os aditivos por filtração através de Celite e purificando o produto resultante mediante recristalização simples utilizando metanol como o dissolvente de recristalização preferido. Na fase 2., adiciona-se à mistura anomérica de (D)-2',3'-didesoxiadenosina preparada na fase 1., uma quantidade em excesso, catalítica a aproximadamente equimolar, de adenosina-desaminase no seio de um dissolvente apropriado. Embora se possa utilizar um grande número de dissolventes preferem-se os dissolventes polares como, por exemplo, a água ou o álcool. Esta reacção está essencialmente concluída após um período de tempo que pode variar entre menos de uma hora e algumas horas, o que depende da quantidade da enzima, condições reacionais ou outros factores. Esta reacção realiza-se, de preferência de, aproximadamente, 1 a 4 horas a uma temperatura compreendida entre, aproximadamente, 20° e 25°C.

Para impedir o aparecimento no produto de quantidades contaminantes do α -anómero desaminado, deve

controlar-se a reacção para determinar o tempo de contacto máximo, de acordo com técnicas que os entendidos na matéria bem conhecem como, por exemplo, cromatografia em camada fina ou cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

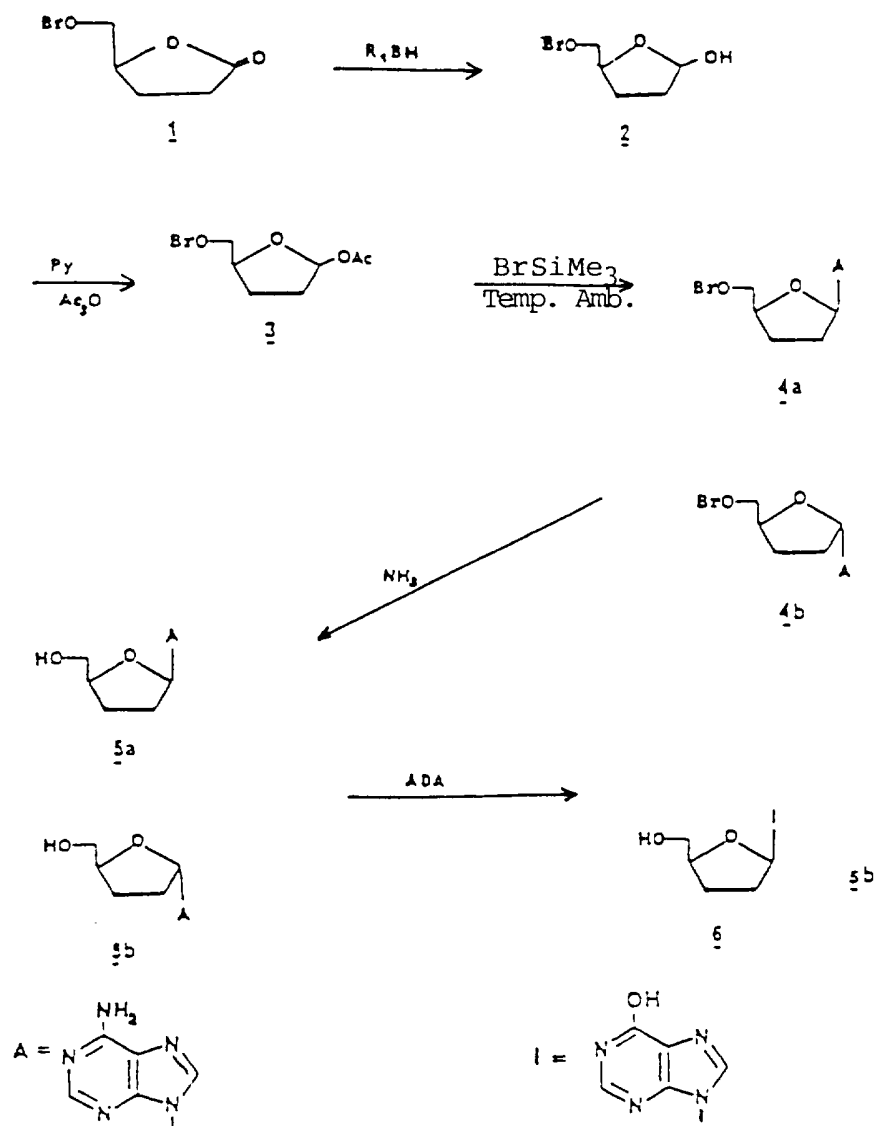
Como factor indicador da inevidência da fase de desaminação enzimática selectiva, estabeleceu-se que na mistura (L)-anomérica, foi o anómero α e não o anómero β o favorecido pela velocidade da desaminação enzimática. Uma vez que a adenosina-desaminase tende a ser uma enzima preferivelmente não específica e mais reactiva, o que foi evidenciado pela sua acção sobre substratos modificados, não era certamente óbvio no passado que existiria uma diferença de velocidade vantajosa na desaminação dos anómeros α e β da (D)-2',3'-didesoxiadenosina.

A utilização desta enzima, a adenosina-desaminase, de acordo com o processo da presente invenção, apresenta a vantagem de os anómeros resultantes, β e α , não necessitarem de serem separados mediante as técnicas dispendiosas e demoradas de cromatografia e de cristalização que têm sido aplicadas no campo técnico a que esta invenção se refere. O anómero β -(D)-2',3'-didesoxi-inosina é o pretendido porque é o anómero activo ou é, pelo menos, substancialmente mais activo como agente anti-vírico do que o anómero α .

O processo para a preparação da β -(D)-2',3'-didesoxi-inosina, de acordo com a presente invenção, utilizando como composto inicial a 5-O-grupo protector do radical hidroximetil- γ -butirolactona encontra-se descrito no

Esquema I seguinte.

ESQUEMA I





Os exemplos que se seguem, em que os compostos estão numerados em referência ao esquema I, ilustram apenas alguns aspectos representativos do processo de acordo com a presente invenção e não são descritos como limitando o seu âmbito. Todas as partes e percentagens são referidas em peso e as temperaturas em graus Celsius, a menos que especificado de outro modo.

Parte experimental

Exemplo 1:

(D)-5-0-benzil-2,3-didesoxipentofuranose (2). A 200 ml de uma solução 0,5 M. de disiamilborano em uma solução de tetrahydrofurano à temperatura de 0°C adicionaram-se, gota a gota, numa atmosfera de azoto, 15,1 g (0,069 mole) de uma solução de (D)-5'-benzoiloxi-5-hidrometilbutirolactona, 1, em 50 ml de tetrahydrofurano anidro. Após 20 minutos à temperatura de 0°C, aqueceu-se a mistura reaccional até 22°C. Agitou-se a mistura a esta temperatura durante 16 horas e em seguida misturou-se lentamente com 12 ml de água e aqueceu-se à temperatura de refluxo durante 30 minutos. Arrefeceu-se a mistura reaccional até à temperatura de 0°C e adicionou-se lentamente 24 ml de peróxido de hidrogénio a 30%, mantendo-se o pH entre 7 e 8 com hidróxido sódico 1N. Após a adição, evaporou-se a mistura reaccional a pressão reduzida num evaporador rotativo à temperatura de 30°C para se obter um resíduo oleoso. Este resíduo foi dividido entre 500 ml de diclorometano e 150 ml de água. Extraíu-se a camada aquosa duas vezes com 100 ml de diclorometano e,

em seguida, lavaram-se as fases orgânicas reunidas, com 50 ml de água, secaram-se sobre sulfato de sódio anidro e evaporaram-se até à obtenção de um óleo. Obtiveram-se 15,3 g (rendimento 100%) de 5-O-benzoil-2,3-didesoxipentofuranose. A ressonância magnética nuclear protónica apresentou-se consistente para a estrutura e o óleo foi utilizado directamente na fase seguinte.

Exemplo 2:

1-O-acetil-5-O-benzoil-2,3-didesoxipentofuranose (3).

Agitou-se uma solução de 15,3 g (0,069 mole) de 5-O-benzoil-2,3-didesoxipentofuranose em 32 ml de piridina e 16 ml de anidrido acético, à temperatura de 22°C durante 4 horas, diluiu-se seguidamente com 500 ml de diclorometano e adicionaram-se 100 g de gelo. Lavou-se em seguida a mistura reaccional com 3 x 100 ml de ácido clorídrico 1N, 3 x 100 ml de uma solução aquosa saturada de carbonato de hidrogénio e sódio e 100 ml de uma solução saturada de cloreto de sódio. Secou-se a fase orgânica sobre sulfato de sódio e evaporou-se para se obter um óleo amarelo claro. Este óleo utilizou-se tal qual ou após cromatografia sobre gel de sílica a 35% utilizando como agente de eluição uma mistura de acetato de etilo a 60% e hexano. Obtiveram-se 15,9 g (rendimento 87%) de 1-O-acetil-5-O-benzoil-2,3-didesoxipentofuranose. A ressonância magnética nuclear foi consistente com a estrutura.

Exemplo 3:

5'-O-benzoíl-2',3'-didesoxiadenosina (4). Dissolveu-se em 5 ml de 1,2-dicloroetano, 0,522 g (0,00198 mole) de 1-O-acetil-5-O-benzoíl-2,3-pentofuranose. Em seguida, adicionou-se a esta mistura 276 μ l (1,2 eq) de brometo de trimetilsililo. Agitou-se a mesma à temperatura de 22°C durante 15 minutos antes de se adicionarem 11,9 ml de uma solução 0,2 molar de bis-sililadenina em 1,2-dicloroetano. Agitou-se a solução durante 88 horas à temperatura de 22°C. A reação prosseguiu mediante arrefecimento até à temperatura de 0°C, depois do que se verteu na mesma 40 ml de uma solução aquosa saturada fria de carbonato de hidrogénio e de sódio. Dividiu-se a mistura reaccional entre 200 ml de diclorometano e duas vezes 40 ml de uma solução aquosa saturada e fria de carbonato de hidrogénio e sódio e 40 ml de uma solução saturada de cloreto de sódio. Secou-se a fase orgânica e evaporou-se para se obter um óleo incolor que, cromatografado sobre gel de sílica e eluído com metanol a 8% em cloreto de metileno permitiu a recolha de fracções das quais se reuniram as similares obtendo-se 420 mg (rendimento 63%) de 5'-O-benzoíl-2',3'-didesoxiadenosina, sob a forma de uma mistura de anómeros.

Exemplo 4:

2',3'-didesoxi-inosina (6). Trataram-se 1,66 g desta mistura de anómeros com 170 ml de metanol saturado com amoníaco. Em seguida, tapou-se cuidadosamente e agitou-se à temperatura de 18°C durante 48 horas. Uma análise por cromatografia em camada fina indicou que a reacção estava in-



completa. Evaporou-se o dissolvente que se repôs adicionando 170 ml de uma solução de amoníaco recente em metanol. Após mais 48 horas uma análise por cromatografia em camada fina indicou que a reacção estava concluída. Evaporou-se então o dissolvente e adicionaram-se 5 ml de etanol. Assim obtiveram-se cristais incolores que se recolheram e lavaram com 5 ml de etanol a 95% para se obterem 1,20 g (rendimento 95%) de 2',3'-didesoxiadenosina 5a conjuntamente com o seu α -anómero 5b numa proporção de 1:1 determinada por ^1H -RMN. Dissolveu-se a mistura de 2',3'-didesoxiadenosina α e β em 50 ml de água desionizada e adicionaram-se 10 mg de adenosina-desaminase (tipo II, da Sigma; 9 unidades/mg, correspondentes a 0,9 $\mu\text{mole/segundo}$). Agitou-se a solução à temperatura de 20°C e controlou-se a reacção por cromatografia líquida de elevada pressão (HPLC). Após 2 horas e meia adicionaram-se mais 10 mg de adenosina-desaminase. Uma cromatografia líquida de alta resolução evidenciou uma reacção quase completa após três horas. Em seguida, concentrou-se o meio reaccional até 1 a 2 ml, à temperatura de 35°C, para se obter um óleo. Este óleo foi retirado e diluído com 2 x 1,5 ml de metanol formando-se cristais brancos. Após 15 minutos, filtrou-se o material e lavaram-se os cristais incolores com 2 x 1,5 ml de metanol para se obterem 120 mg de 2',3'-didesoxi-inosina, (rendimento 48%). Tratou-se a solução mãe como anteriormente para se obterem mais 29 mg (rendimento 12%) de produto de qualidade excelente que se caracterizou por ressonância magnética nuclear protónica. O espectro

de ressonância magnética nuclear estava consistente com a estrutura.

REFERÊNCIAS:

1. Samukov, V.V.; Ofitserov, V.I. Bioorg. Khim. 1983, 9, 132.
2. Prisbo, E.J.; Martin, J.C. synth. Commun. 1985, 15, 401.
3. Taniguchi, M.; Koga, K.; Yamada, S. Tetrahedron 1974, 30, 3547.

R e i v i n d i c a ç õ e s

1. Processo melhorado para a preparação selectiva da β -(D)-2',3'-didesoxiinosina, caracterizado pelo facto de se tratar uma mistura α - e β -anomérica de (D)-2',3'-didesoxiadenosina com adenosina-desaminase, enquanto se procede à monitorização da conversão do β -anómero preferencialmente desaminado de tal modo que se controla o período de redução minimizando a desaminação do anómero α , para se obter a β -(D)-2',3'-didesoxi-inosina que se separa da mistura reaccional enzimática.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se dissolver a adenosina-desaminase em um meio aquoso neutro por contacto com a mistura anomérica de (D)-2',3'-didesoxiadenosina.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se utilizar no processo de desaminação uma preparação de adenosina-desaminase imobilizada.

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



4.

R e s u m o

Descreve-se um processo novo que consiste em utilizar adenosina-desaminase para preparar selectivamente a β -(D)-2',3'-didesoxi-inosina com rendimentos elevados a partir de uma mistura α -, β -anomérica.

A β -(D)-2',3'-didesoxi-inosina resultante é útil como agente anti-viral e antibiótico.

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

Reg. Carim.