



F10000926028

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT****92602**C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 18 12 1991

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12P 17/18, C 07D 473/00

SUOMI-FINLAND**(FI)****Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patentihakemus - Patentansökning	883339
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	13.07.88
(24) Alkupäivä - Löpdag	13.07.88
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	18.01.89
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.08.94
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
	17.07.87 US 074844 P

(71) Hakija - Sökande

1. Bristol-Myers Squibb Company, 345 Park Avenue, New York, N.Y. 10154, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Farina, Vittorio, 106 Knollwood Road, West Hartford, Conn., USA, (US)
 2. Benigni, Daniel A., 120 Mac Collum Road, Elbridge, N.Y., USA, (US)
 3. Brodfuehrer, Paul R., 203 Wellesley Road, Syracuse, N.Y., USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä β -2',3'-dideoksi-inosiin valmistamiseksi entsymaattisella deaminoinnilla
Förfarande för framställning av β -2',3'-dideoxiinosin genom enzymatiks deaminering**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

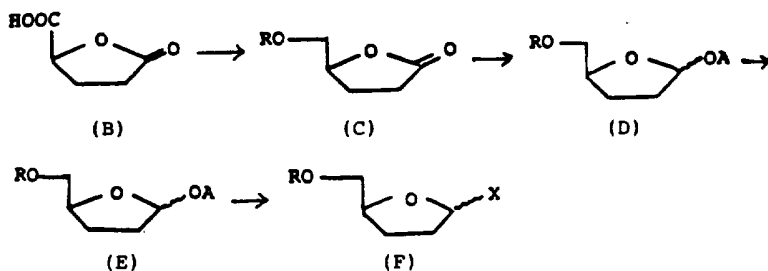
EP A 206497 (C 07D 473/16),
 Tetrahedron 30 (1974) 3547-3552 (Taniguchi et al.), Synthesis 7 (1970) 329-343
 (Zorbach et al.), J. Org. Chem. 31 (10) (1966) 3406-7 (Price et al.),
 CA 96 (1982) 143284e (Kaulina et al.), CA 76 (1972) 139050d (Tetsuro et al.),
 Eur. J. Biochem. 122 (1982) 375-380 (Rosemeyer et al.), Synthetic Comm. 15 (5) (1985),
 401-9 (Prisbe et al.), CA 98 (1983) 161094x (Samukov et al.)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää kaavan (A) mukaisen β -2',3'-dideoksi-inosiin valmistamiseksi selektiivisesti,

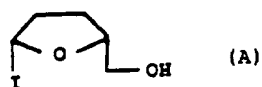


jossa kaavassa I on puriiniemäs hypoksantiini. Menetelmän mukaisesti suoritetaan ensin seuraavat reaktiovaiheet:

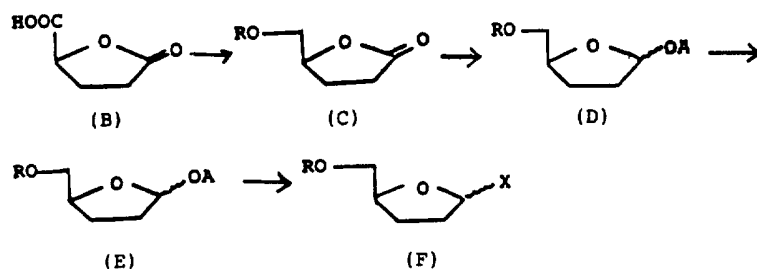


jolloin R on hydroksisuojaryhmä, A on happea aktivoiva ryhmä ja X on poistuva ryhmä. Saatu kaavan (F) mukainen yhdiste saate- taan reagoimaan aktivoitun adeniini johdannaisen kanssa ja 5-0- hydroksisuojaryhmä poistetaan, minkä jälkeen saatu β - ja α -2',3',-dideoksiadenosiinista muodostuva seos saatetaan koske- tukseen adenosindeaminaasin kanssa, jolloin saadaan kaavan (A) mukainen yhdiste.

Uppfinningen avser ett förfarande för selektiv framställning av β -2',3'-dideoxi-inosin med formeln (A)



i vilken formel I är purinbasen hypoxantin. Enligt förfarande utförs först följande reaktionssteg:



varvid R är en hydroxiskyddsgrupp, A är en syreaktiverande grupp och X är en avgående grupp. Den erhållna föreningen med formeln (F) omsätts med ett aktiverat adeninderivat och 5-0- hydroxiskyddsgruppen avlägsnas, varefter den erhållna bland- ningen, som utgörs av β - och α -2',3'-dideoxiadenosin bringas i kontakt med adenosindeaminaas, varvid erhålls en förening med formeln (A).

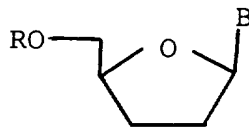
Menetelmä β -2',3'-dideoksi-inosiinin valmistamiseksi entsyymaattisella deaminoinnilla

5 Esillä oleva keksintö käsittelee parannettua menetelmää β -2',3'-dideoksi-inosiinin valmistamiseksi.

10 Tyypillisesti 2',3'-dideoksisytidiini (ddC) syntetisoidaan 2'-deoksisytidiinistä (Samukov, V.V.; Ofitserov, V.I. Bioorg. Khim. 1983, 9, 132. Prisbe, E.J.; Martin, J.C. synth. Commun. 1985, 5 15, 401) lähtien. Tämä on yleinen menetelmä syntetisoida 2,3'-dideoksinukleosideja. Tämän synteessin tarvitsemat lähtöaineet ovat kuitenkin erittäin kalliita eikä niitä ole saatavissa irtotavarana. Tähän deoksygenointiin tarvittavat reagenssit ovat lisäksi melko kalliita.

15 US-patentti 028 817, jätetty 20.3.1987, esittää menetelmän, jolla tuotetaan 2',3'-dideoksinukleosideja, joilla on seuraava kaava

20



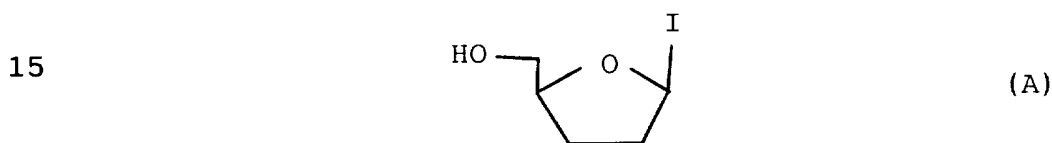
25

jossa B on puriini- tai pyrimidiiniemäs ja R on H tai hydroksisuojarahmā, ja menetelmään kuuluvat vaiheet (a) γ -karboksi- γ -butyrolaktonin muuttaminen 5-O-hydroksisuojarahmā-metyyli- γ -butyrolaktoniksi, (b) muutetaan välituote vaiheesta (a) 5-O-hydroksisuojarahmā-metyyli-2',3'-dideoksipentofuranoosiksi, (c) muutetaan vaiheen (b) välituote 30 1-O-aktivointiryhmā-5-O-hydroksisuojarahmā-metyyli-2',3'-dideoksipentofuranoosiksi, (d) muutetaan vaiheen (c) välituote 1-poistuva ryhmā-5-O-hydroksisuojarahmā-2',3'-dideoksipentofuranoosiksi, (e) vaiheen (d) välituote reagoi aktivoitun puriini- tai pyrimidiiniemäksen kanssa, ja (f) 35 otetaan talteen dideoksinukleosidi vaiheesta (e). Saatava

tuote sisältää seoksen, jossa on β - ja α -anomeerejä, jotka voidaan erottaa käyttämällä kromatografiaa ja kiteyttämismenetelmiä, jotka ovat hyvin tunnettuja alalla, jota tämä keksintö koskee.

5 Tällä alueella on tarve parantaa menetelmää, jotta yleisesti aktiivinen tai aktiivisempi 2',3'-dideoksinukleosidien β -anomeeri voidaan saada selektiivisesti ilman kalliita ja aikaavievää kromatografisia tai kiteyttämällä tapahtuvia β - ja α -anomeerien erottamisia.

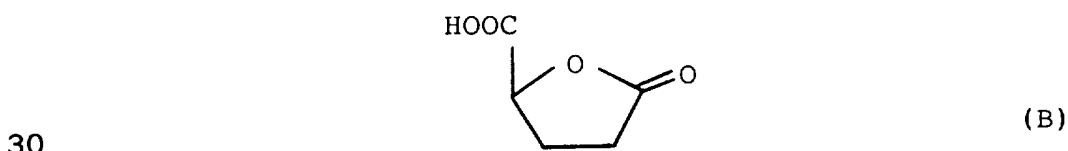
10 Yhteenvetona, tämä keksintö käsittää menetelmän, jolla selektiivisesti tuotetaan β -2',3'-dideoksi-inosiinia, jolla on kaava A



20 jossa I on puriiniemäs, hypoksantiini, ja jossa tuotetaan 2',3'-dideoksiadenosiini, jolle sitten suoritetaan entsymaattinen deaminointi ja adenosiiniemäksen korvaaminen inosiinilla.

Keksinnölle on tunnusomaista, että se käsittää seuraavat vaiheet:

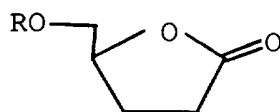
25 a) muutetaan β -karboksi- β -butyrolaktoni, jolla on kaava B



5-O-hydroksi-suojaryhmä-metyyli- β -butyrolaktoniksi, jolla on kaava C

35

:



(C)

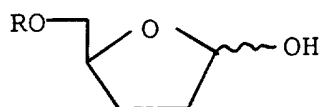
5

jossa R on hydroksisuojarahmä, saattamalla kaavan B mukainen yhdiste reagoimaan karboksyyliryhmäpelkistimen kanssa ja sitten saattamalla saatu hydroksimetyyliryhmä reagoimaan hydroksisuojarahmäreagenssin kanssa;

10

b) muutetaan vaiheen (a) mukainen välituote, jolla on kaava C, 5-O-hydroksisuojarahmä-metyyli-2,3-dideoksi-pentofuranoosiksi, jolla on kaava D

15



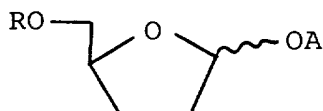
(D)

20

jossa R on hydroksisuojarahmä, saattamalla kaavan C mukainen yhdiste reagoimaan karbonyyliryhmäpelkistimen kanssa;

c) muutetaan vaiheen (b) mukainen välituote, jolla on kaava D, 1-O-aktivoiva ryhmä-5-O-hydroksisuojarahmä-metyyli-2,3-dideoksi-pentofuranoosiksi, jolla on kaava E

: 25



(E)

30

jossa R on hydroksisuojarahmä ja A on O-aktivoiva ryhmä, joka on alkyylikarbonyyliryhmä, saattamalla kaavan D mukainen yhdisteen reagoimaan asyloivan aineen kanssa, joka vastaa ryhmää A edellä;

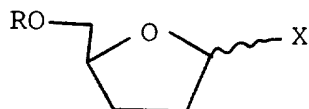
35

d) muutetaan välituote vaiheesta (c), kaavan E mukainen yhdiste, saattamalla se reagoimaan kaavan MX mukai-

:

sen yhdisteen kanssa 1-poistuva ryhmä-5-O-hydroksisuoja-ryhmä-metyyli-2,3-dideoksipentofuranoosiksi, jolla on kaava F

5



(F)

10 jossa R on hydroksisuojarahyhmä ja X on poistuva ryhmä, joka on Cl tai Br, saattamalla kaavan E mukainen yhdiste reagoimaan kaavan MX mukaisen yhdisteen kanssa, jossa M on $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$;

15 e) saatetaan vaiheen (d) mukainen, kaavan F mukainen välituote reagoimaan aktivoituneen adeniinijohdannaisen kanssa, jossa emäs, adeniini, on aktivoitu antamalla kyseisen emäksen ytimen C-6-aminoryhmän ja N-9 typpi-atomin reagoimaan aktivoivan yhdisteen kanssa, joka on silyloiva tai asyloiva tai bentsoyloiva aine siten, että läsnä on
20 Brönsted-happo tai Lewis-happo ja liuotin, joka on polaarinen tai ei-polaarinen liuotin; ja

f) suoritetaan vaiheen (e) välituotteelle kemiallinen reaktio, joka pystyy korvaamaan 5-O-hydroksisuojarahyhmän, jotta saadaan β - ja α -2',3'-dideoksiadenosiinin anomeerinen seos;
25

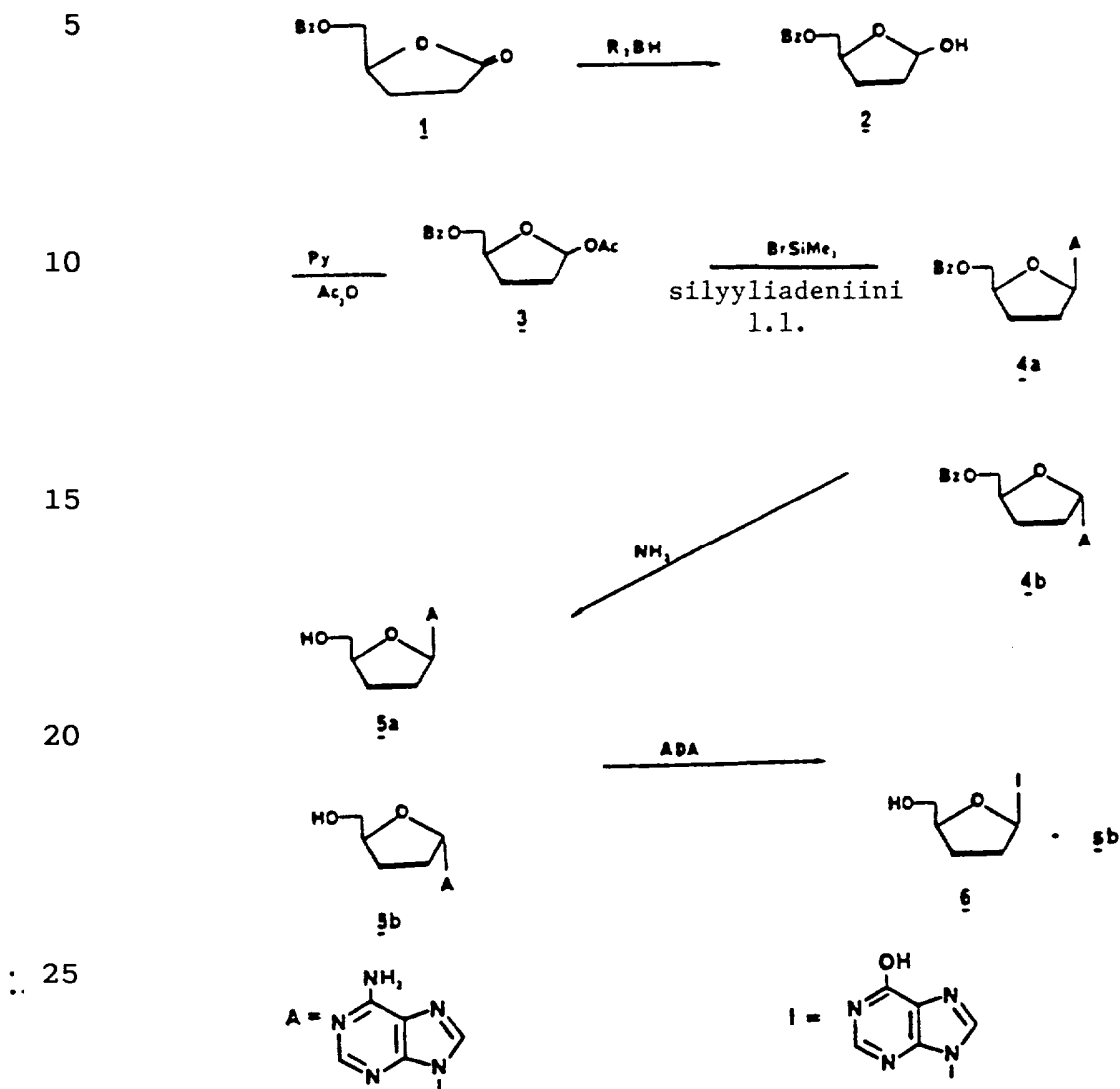
g) saatetaan β - ja α -2',3'-dideoksiadenosiinin seos vaiheesta (f) kosketukseen entsyymin, adensiinideaminaasin kanssa, jotta puriini- (adenosiini) rengassysteemin 6-
30 asemassa oleva aminoryhmä korvautuisi selektiivisesti β -2',3'-dideoksiadenosiinissa hydroksyyli-ryhmällä, jolloin adensiini muuttuu inosiiniksi; ja

h) otetaan talteen dideoksi-inosiini edellä olevasta vaiheesta (g).

35 Seuraavassa esitettävässä kaaviossa I esitetään tämän keksinnön mukainen menetelmä valmistaa β -2',3'-di-

deoksi-inosiinia lähtien 5-O-hydroksi-suojaryhmämetyyli- γ -butyrolaktonista.

Kaavio I



Kaaviokuvassa I ja todellisissa työesimerkeissä suoritetaan vaiheet (d) ja (e) kätevästi ja edullisemmin yhdessä astiassa lisäten peräkkäin halogenointiainetta ja aktivoitua adeniini johdannaista 1-O-asetyyli-5-O-bentsyyli-2,3-pentofuranoosiin, jolla on kaava 3.

Lähtöaine γ -karboksi- γ -butyrolaktoni voidaan edullisesti saada glutaamihaposta käyttäen tavallisia kemialli-

sessä kirjallisuudessa (Taniguchi, M.; Koga, K.; Yamada, S. Tetrahedron 1974, 30, 3547) käytettäviä menetelmiä.

Kemiallisten reaktioiden yhdistelmällä tuotetaan sopivasti suljettua 2,3-dideoksipentafuranoosia, 3. Tämä yhdiste ja sen johdannaiset ovat tuttuja kirjallisuudesta.

Siten lähtöaineen γ -karboksi- β -butyrolaktonin muuttaminen 5-O-hydroksisuojarahmā-metyyli-butyyrolaktoniksi, vaihe (a), vaatii γ -karboksiryhmän pelkistämisen hydroksimetyyliryhmäksi seurauksena reaktiosta hydroksisuojarahmā-reagenssin kanssa. Esimerkiksi γ -karboksiryhmän pelkistäminen ja saatavan γ -hydroksimetyyliryhmän suojaaminen bentsyyli- tai bentsoyyliryhmän (PhCH₂-) avulla, vaihe (a), suoritettiin kaavan I lähtö-aineen peräkkäisellä reaktiolla BH₃SMe₂:n, PhCH₂Br^{3,4}:n tai PhC(O)Cl:n kanssa. Bentsoyyliryhmän käyttäminen on edullisempaa kuin bentsyyli- tai bentsoyyliryhmän käyttäminen, koska seuraavan bentsoylisuojarahmān poistaminen on havaittu tapahtuvan helpommin ja siten saadaan parempia tuotteen saantoja.

Primäärinen alkoholifunktionaalinen ryhmä voidaan suojata eetterinä, kuten trialkyyli- tai dialkyyliaryyli- tai diaryylialkyyli- tai triaryylisilyyli-, substituomattomana tai substituotuna bentsyyli-, substituomattomana tai substituotuna alkyyli- tai allylieetterinä tai esterinä, kuten bentsoyyliryhmä-, mesitoyyliryhmä-, pivaloyyliryhmä-, substituomattomana tai substituotuna asetoyyliryhmä- tai karbonaattiesterinä [Katso: "Protective Groups in Organic Synthesis," T.W. Greene, John Wiley, New York (1981) suojarahmien tarkempaa esittelyä varten ja niitä koskevan kemian esittämiseksi]. Vielä edullisemmassa suoritusmuodossa käytettiin hydroksisuojarahmān primääriselle alkoholille asemassa 5-bentsoyyliryhmää, koska kuten edellä esitettiin seuraavana suoritettavan bentsoyylisuojarahmān poistamisen on havaittu tapahtuvan helpommin ja sen avulla saadaan suurempi tuotteen saanto. 5-O-bentsoyylisuojarahmā voidaan helposti korvata hydrolyysillä emäksisissä olosuh-

teissa esimerkiksi käsittelemällä metanolilla, joka on kyllästetty ammoniakilla.

5 5-O-hydroksisuojarahmä- -butyrolaktonin muuttaminen 5-O-hydroksi-suojarahmä-2,3-dideoksipentafuranoosiksi, jolla on kaava 2 vaiheessa (b), suoritettiin antamalla välituotteen, jolla on kaava 1 reagoida NaH:n ja HCO₂Et:n kanssa ja sitten HCl:n kanssa (Spry, D. V.; Bhala, A. R. Heterocycles, 1985, 23, 1901).

10 Tämän alueen asiantuntijoille tulisi olla selvää, että mitä tahansa pelkistävästä aineista voidaan käyttää suoritettaessa joko toista tai molempia vaiheista (a) ja (b) riippumattomasti (siis peräkkäin) tai samanaikaisesti. Muita käyttökelpoisia pelkistimiä BH₃·SMe₂:n ohella käytettäväksi toisessa tai molemmissa vaiheissa (a) ja (b) 15 kuten edellä esitetään, ovat [(CH₃)₂CHCH(CH₃)₂]BH (disiamyyliboraani), NaBH₄ ja LiCl tai AlCl₃ tai BH₃, LiAlH₄, LiAlH(OMe)₃, LiAlH(O-t-Bu)₃ ja vastaavat. Erityisen edullista on käyttää disiamyyliboraania vaiheessa (b) laktonirengas karbonyyliryhmän pelkistämisessä.

20 Vaihe c, jossa muutetaan kaavan 2 välituote välituotteeksi, jolla on kaava 3 ja jossa on O-aktiivointiryhmä C(1)-asemassa 2,3-dideoksipentafuranoosirengassysteemissä, suoritetaan millä tahansa reagenssilla, joka on tehokas muuttamaan tämän 1-hydroksiryhmän ryhmäksi, joka 25 voidaan helposti korvata Cl:llä tai Br:lla reaktiolla HCl:n tai HBr:n kanssa. Tällaisia ryhmiä, jotka voidaan helposti korvata, ovat O-aktiivointiryhmät, joita ovat alkyyliekarbonyyli-, aryylikarbonyyli-, alkyylitiokarbonyyli-, aryyliitiokarbonyyli-, alkyylisulfonyyli-, aryyli-sulfonyyli- ja karbonaattiryhmät, joissa alkyyliosa voi olla 30 substituoinaton tai substituoitu C₁₋₃-alkyyli-ryhmällä ja aryyliosa voi olla substituoinaton tai substituoitu fenyyli-ryhmä ja jossa substituentti alkyyli- tai aryyliosissa voi olla 1 - 3 ryhmää valittuna halogeenista tai C₁₋₃-alkoksiryhmistä. Vielä edullisemmin tämä aktiivointiryhmä on 35

vastaava (edellä olevan kanssa) asetoksi- tai bentsyloksi-ryhmä ja edullisimmin asetoksi. Vaihe (c) suoritettiin hyvin käyttäen etikka-anhydridi/pyridiinireagenssia.

Vaihe (d), jossa korvataan 1-O-aktivoiva ryhmä-
5 funktionaalinen ryhmä poistuvalla ryhmällä, joka on Cl tai Br, voidaan suorittaa käsittelemällä 3 HCl:lla, HBr:lla tai halotrialkyyilisilaanilla, jolla on kaava R_3SiX , jossa R on alkyyli ja X on halogeeni, edullisemmin $(CH_3)_3SiBr$
10 CH_2Cl_2 :ssa matalassa lämpötilassa, jotta saadaan furanosyylihalogenideja, jotka esiintyvät liuoksessa anomeerien (α ja β) seoksena.

Tämän keksinnön mukaisen valmistusmenetelmän kohdassa (e) voi välituote, jolla on kaava F vaiheesta (d), reagoida sopivasti aktivoitun adensiiniemäksen kanssa,
15 jolloin tällainen adensiiniemäs on aktivoitu reaktiolla hyvin tunnettujen aktivointiaineiden kanssa, jotta saadaan silyloitu, asetyloitu tai bentsoyloitu emäs, sopivan polaarisen tai ei-polaarisen liuottimen läsnäollessa ja valinnaisesti siten, että läsnä on Lewis-happo, kuten esimerkiksi boorihalogenidi, alumiinihalogenidi, titaanihalogenidi, tina(IV)kloridi, sinkkihalogenidi, trimetyylisilylibromidi, jodidi, triflaatti tai jokin muu hyvin tunnettu laji, jota käytetään glykosylointireaktioissa, tai siten, että läsnä on Bronsted-happo, kuten vetykloridi,
20 -bromidi tai -jodidi. Erityisen käyttökelpoinen tässä vaiheessa (e) on silyloidun adensiinin käyttäminen ei-polaaristen liuottimien, kuten esimerkiksi bentseenin, tolueenin, kloroformin, dikloorimetaanin, dikloorietaanin tai hiilitetrakloridin läsnäollessa. Käyttökelpoisten polaaristen liuottimien esimerkkejä ovat esimerkiksi tetrahydrofuraani ja dioksaani, sekä nitriilit, kuten asetonitriili, dimetyyliformamidi ja dimetyylisulfoksidi. Esimerkin käyttökelpoisesta menetelmästä suorittaa vaihe (e) esittävät Brundidge et al., US-patentti 4 625 020, jossa
35 esitetään silyloitujen pyrimidiinien liittäminen, jolloin hydroksi- ja aminoryhmien aktiivisia vetyjä suljetaan si-

lyyliryhmällä, kuten trimetyylisilyyliryhmällä, käyttäen 2-deoksi-2-fluoriarabinofuranosyylihalogenidia.

Vaihtoehtoisesti toisessa tämän keksinnön mukaisessa suoritussuorituksessa, kun vaiheesta (c) ryhmä "A" on aset-
5 tyyli, voidaan vaiheen (c) välituotteen antaa reagoida aktivoituneen adeniinijohdannaisen kanssa Lewis-hapon läsnäollessa kuten vaiheesta (e), jolloin saadaan 5-O-hydroksisuojarahmā-2',3'-dideoksiadenosiinivälituote ilman erillistä vaihetta (d).

10 Kuten edellä on mainittu vielä toisessa edullisemmassa tämän keksinnön mukaisessa suoritussuorituksessa kaavan 3 1-O-asetyyli-5-O-bentsoyyli-2,3-pentofuranoosi vaiheesta (c) yhdistettiin ensin bromitrimetyylisilaanin kanssa ja sitten bis-silyyliadeniinin kanssa, jolloin saatiin yhdes-
15 sä vaiheesta ilman 1-bromi-5-O-bentsoyyli-2,3-pentofuranoosivälituotteen erottamista vaiheesta (d) 5'-O-bentsoyyli-2',3'-dideoksiadenosiinia tuotteena yhdistetyistä vaiheista (d) ja (e).

Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä
20 vaiheesta (f) suoritettiin 5'-O-bentsoyyli-2',3'-dideoksiadenosiinille kemiallinen reaktio 5-O-suojaryhmän poistamiseksi. Tämän suojaryhmän sopivat poistomenetelmät ovat hyvin tunnettuja tämän keksinnön alueella [kts. esimerkiksi: "Protective Groups in Organic Synthesis", T.W.
: 25 Greene, John Wiley, New York, (1981), joka on mainittu edellä]. Kun suojaryhmä on bentsyyli-ryhmä, voidaan helposti poistaa katalyyttisesti hydraamalla ($H_2/PdCl_2$). Vielä edullisemmin käsiteltiin 5'-O-bentsoyyli-2',3'-dideoksiadenosiini ammoniakilla kyllästetyllä metanolilla, jolloin
30 saatiin 2',3'-dideoksiadenosiini α - ja β -anomeerien seoksena.

Tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä vaiheesta (g) yhdistettiin β - ja α -2',3'-dideoksiadenosiinien seos vaiheesta (f) entsyymillä, adenosinideaminaasilla (ADA), joka
35 on eristetty vasikan pernasta, kanssa neutraalissa vesipi-

toisessa väliaineessa (Secrist, J. A. et al. J. Med. Chem. 1987, 30, 746). Tämä entsyymi katalysoi selektiivisesti β -2',3'-dideoksiadenosiinin deaminointia, jolloin saadaan kvantitatiivisesti β -2',3'-dideoksi-inosiinia. Vaikka
5 esillä olevassa esimerkissä käytettiin vasikan pernasta saatua adensiinideaminaasia (ADA), uskotaan, että sopivia ovat kaikki adensiiniaminohydrolaasivalmisteet ("deaminaasi", EC 3.5.4.4). Siten tämän keksinnön alueeseen kuuluu kaikkien adensiiniaminohydrolaasivalmisteiden
10 (tai "deaminaasivalmisteiden") käyttö, jotka pystyvät selektiivisesti deaminoimaan β -2',3'-dideoksiadenosiinianoomeerin. Siten sen lisäksi, että käytetään vapaata entsyymiä sopivassa väliaineessa, kuten tässä esitettyssä inertissä vesipitoisessa väliaineessa, voidaan käyttää entsyymiä, ADA, joka on sidottu sopivaan kantajaan, kuten esimerkiksi oksiraani-akryylipolymeerkantajaan Eupergit[®] C (Rohm Pharma GmbH). ADA voidaan sitoa polymeeriin käyttäen konventionaalisia menetelmiä.

2',3'-dideoksi-inosiinituote otettiin edullisesti
20 talteen keräämällä reaktioseos vaiheesta (g), poistamalla liukenemattomat reagenssit ja lisäaineet suodattamalla Celiten läpi ja puhdistamalla saatu tuote pylväskromatografisesti esimerkiksi silikageelipylväällä käyttäen eluoinnissa 1 - 5-%:ista metanoliliuosta kloroformissa.

25 Käyttämällä entsyymiä, adensiinideaminaasia esillä olevan keksinnön menetelmän mukaisesti, saadaan se etu, että tuloksena saatavia anomeereja (α ja β) ei tarvitse erottaa käyttämällä kalliita ja aikaavieviä kromatografisia ja kiteyttämiseen perustuvia menetelmiä, jotka tähän
30 asti ovat olleet hyvin tunnettuja keksinnön alueella. β -2',3'-dideoksi-inosiinianomeeri esitetään, koska se on aktiivinen anomeeri tai on ainakin aktiivisempi antiviraalisena aineena kuin α -anomeeri.

Seuraavat esimerkit, joissa yhdisteet on numeroitu,
35 viitaten reaktiokaavioon I, esittelevät muutamia edustavia

esillä olevan keksinnön mukaisia suoritusmuotoja ja niitä ei ole tarkoitettu rajoittamaan keksinnön aluetta. Kaikki osat ja prosentit ovat painoa kohti ja lämpötilat ovat Celsius-asteita, ellei toisin ole mainittu.

5

Esimerkki 1

(D)-5-O-bentsyyli-2,3-dideoksipentofuranoosi (2)

200 ml 0,5 M disiamyyliboraanin THF-liuosta 0°C:ssa lisättiin tipoitain typen alla liuokseen, jossa oli 155,1 g (0,069 mol) (D)-5'-bentsoyylioksi-5-hydroksime-
10 tyylibutyrolaktonia 1 50 ml:ssa kuivaa tetrahydrofuraania. Pidettiin 20 minuuttia 0°C:ssa, jonka jälkeen reaktioseos kuumennettiin 22°C:seen. Reaktioseosta sekoitettiin 22°C:ssa 16 tuntia, sitten siihen lisättiin hitaasti 12 ml vettä ja kuumennettiin palautusjäähdyttäen 30 minuuttia.
15 Reaktioseos jäähdytettiin 0°C:seen ja sitten lisättiin hitaasti 24 ml 30-%:ista vetyperoksidia säilyttäen pH välillä 7 - 8 1N NaOH:lla. Lisäämisen jälkeen reaktioseos haihdutettiin alipaineessa rotavaporissa 30°C:ssa, jolloin saatiin öljyinen jäännös. Tämä jaettiin 500 ml:aan dikloorimetaania ja 150 ml:aan vettä. Vesikerros uutettiin käyttäen 2 x 100 ml dikloorimetaania ja sitten yhdistetyt orgaaniset faasit pestiin 50 ml:lla vettä, kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla ja haihdutettiin öljyksi. Saanto 15,3 g (100 %) 5-O-bentsoyyli-2,3-dideoksipentofuranoosia. ¹H-NMR vastasi rakennetta ja öljy käytettiin suoraan seuraavassa vaiheessa.

20

25

Esimerkki 2

1-O-asetyyli-5-O-bentsoyyli-2,3-dideoksipentofuranoosi (3)

30

35

Seosta, jossa oli 5-O-bentsoyyli-2,3-dideoksipentofuranoosia (15,3 g, 0,069 mol) 32 ml:ssa pyridiiniä ja 16 ml:ssa etikka-anhydridia, sekoitettiin 22°C:ssa 4 tuntia ja laimennettiin sitten 500 ml:lla dikloorimetaania ja lisättiin 100 g jäitä. Tämän jälkeen reaktioseos pestiin käyttäen 3 x 100 ml 1N kloorivetyhappoa, 3 x 100 ml kylästettyä natriumbikarbonaatin vesiliuosta ja 100 ml kyl-

lästettyä suolaliuosta. Orgaaninen kerros kuivattiin natriumsulfaatilla ja haihdutettiin, jolloin saatiin vaalean keltaista öljyä. Tämä voitiin käyttää sellaisenaan tai kromatografioida silikageelillä 35 - 60 % EtOAc/heksaanilla. Saanto 15,9 g (87 %) 1-O-asetyyli-5-O-bentsoyyli-2,3-dideoksipentofuranoosia. Sen NMR vastasi rakennetta.

Esimerkki 3

5'-O-bentsoyyli-2',3'-dideoksiadenosiini (4)

1-O-asetyyli-5-O-bentsoyyli-2,3-pentofuranoosia (0,522 g, 0,00198 mol) liuotettiin 5 ml:aan 1,2-dikloorietaania. Tähän lisättiin 276 µl (1,2 ekv.) trimetyyllisilylibromidia. Tätä sekoitettiin 22°C:ssa 15 minuuttia ennen kuin siihen lisättiin 11,9 ml 0,2M bis-silyyliadeniinin liuosta 1,2-dikloorietaanissa. Liuosta sekoitettiin 88 tuntia 22°C:ssa. Tämän jälkeen reaktio lopetettiin jäädyttämällä 0°C:seen ja sitten seos kaadettiin 40 ml:aan kylmää kyllästettyä natriumbikarbonaatin vesiliuosta. Reaktioseos jaettiin käyttäen 200 ml dikloorimetaania ja 2 x 40 ml kylmää kyllästettyä natriumbikarbonaatin vesiliuosta ja 40 ml kyllästettyä suolaliuosta. Orgaaninen kerros kuivattiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin väritöntä öljyä, joka kromatografioitiin silikageelillä ja eluoitiin 8-%:isella metanolilla metyleenikloridissa. Fraktiot otettiin talteen ja näin saatiin 420 mg 5'-O-bentsoyyli-2',3'-dideoksiadenosiinia anomeerien seoksena (63 %).

Esimerkki 4

2',3'-dideoksi-inosiini (6)

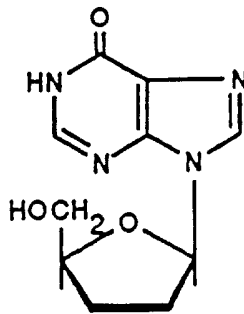
Tämä anomeerien seos (1,66 g) käsiteltiin käyttäen 170 ml ammoniakilla kyllästettyä metanolia. Tämä suljettiin tiiviisti ja sitä sekoitettiin 18°C:ssa 48 tuntia. TLC osoitti reaktion olevan täydellinen. Liuotin haihdutettiin ja korvattiin 170 ml:lla tuoretta ammoniakin metanoliliuosta. 48 tunnin kuluttua osoitti TLC jälleen reaktion olevan täydellinen. Siten liuotin haihdutettiin ja lisättiin etanolia (5 ml). Näin saatiin värittömiä kitei-

tä, jotka otettiin talteen ja pestiin käyttäen 5 ml
95-%:ista etanolia, jolloin saatiin 1,20 g (95 %) 2',3'-
dideoksiadenosiinia 5a yhdessä sen α -anomeerin 5b kanssa
1:1-suhteessa $^1\text{H-NMR}$:lla. $\alpha + \beta$ -2',3'-dideoksiadenosiini-
5 seos liuotettiin 50 ml:aan deionisoitua vettä ja tähän
liuokseen lisättiin 10 mg adenosiinideaminaasia (tyyppi
II, Sigma; 9 yksikköä/mg \rightarrow 9 $\mu\text{mol/min}$). Liuosta sekoitet-
tiin 20°C:ssa ja reaktiota seurattiin HPLC:lla. 2 tunnin 30
minuutin kuluttua lisättiin toiset 10 mg adenosiinideami-
10 naasia. HPLC osoitti, että reaktio oli lähes täydellinen 3
tunnin kuluttua. Tämän jälkeen reaktioseos konsentroitiin
(1 - 2 ml) 35°C:ssa, jolloin saatiin öljyä. Öljy otettiin
talteen ja laimennettiin hitaasti käyttäen 2 x 1,5 ml:n
annoksia metanolia, jolloin saatiin valkeita kiteitä. 15
15 minuutin kuluttua aine suodatettiin ja värittömät kiteet
pestiin käyttäen 2 x 1,5 ml:n annoksia metanolia, jolloin
saatiin 2',3'-dideoksi-inosiinia (120 mg, 48 %). Emälius
käsiteltiin kuten edellä, jolloin saatiin vielä 29 mg
20 (12 %) hyvälaatuista tuotetta, joka karakterisoitiin käyt-
tään $^1\text{H-NMR}$:a. NMR-spektri vastasi rakennetta.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä, jolla selektiivisesti tuotetaan β -2',3'-dideoksi-inosiinia, joka vastaa kaavaa A

5



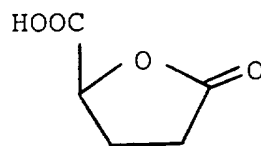
(A)

10

tunnettu siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet:

15

a) muutetaan γ -karboksi- γ -butyrolaktoni, jolla on kaava B

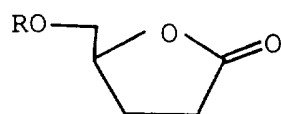


(B)

20

5-O-hydroksi-suojaryhmä-metyyli- γ -butyrolaktoniksi, jolla on kaava C

25



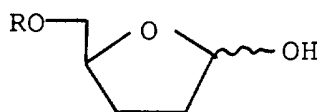
(C)

30

jossa R on hydroksisuojaryhmä, saattamalla kaavan B mukainen yhdiste reagoimaan karboksyyli-ryhmäpelkistimen kanssa ja sitten saattamalla saatu hydroksimetyyli-ryhmä reagoimaan hydroksisuojaryhmäreagenssin kanssa;

35

b) muutetaan vaiheen (a) mukainen välituote, jolla on kaava C, 5-O-hydroksisuojaryhmä-metyyli-2,3-dideoksi-pentofuranoosiksi, jolla on kaava D



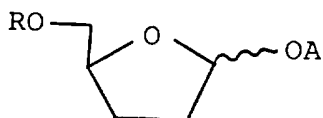
(D)

5

jossa R on hydroksisuojaryhmä, saattamalla kaavan C mukainen yhdiste reagoimaan karbonyyliryhmäpelkistimen kanssa;

c) muutetaan vaiheen (b) mukainen välituote, jolla on kaava D, 1-O-aktivoiva ryhmä-5-O-hydroksisuojaryhmä-metyyli-2,3-dideoksipentofuranoosiksi, jolla on kaava E

10



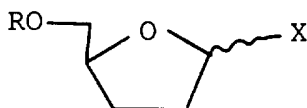
(E)

15

jossa R on hydroksisuojaryhmä ja A on O-aktivoiva ryhmä, joka on alkyylkarbonyyliryhmä, saattamalla kaavan D mukainen yhdisteen reagoimaan asyloivan aineen kanssa, joka vastaa ryhmää A edellä;

20

d) muutetaan välituote vaiheesta (c), kaavan E mukainen yhdiste, saattamalla se reagoimaan kaavan MX mukaisen yhdisteen kanssa 1-poistuva ryhmä-5-O-hydroksisuojaryhmä-metyyli-2,3-dideoksipentofuranoosiksi, jolla on kaava F

: 25
..

(F)

30

jossa R on hydroksisuojaryhmä ja X on poistuva ryhmä, joka on Cl tai Br, saattamalla kaavan E mukainen yhdiste reagoimaan kaavan MX mukaisen yhdisteen kanssa, jossa M on $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$;

35

..

e) saatetaan vaiheen (d) mukainen, kaavan F mukainen välituote reagoimaan aktivoitun adeniini johdannaisen kanssa, jossa emäs, adeniini, on aktivoitu antamalla kyseisen emäksen ytimen C-6-aminoryhmän ja N-9 typpi-atomin reagoita aktivoivan yhdisteen kanssa, joka on silyloiva tai asyloiva tai bentsoyloiva aine siten, että läsnä on Brönsted-happo tai Lewis-happo ja liuotin, joka on polaarinen tai ei-polaarinen liuotin; ja

f) suoritetaan vaiheen (e) välituotteelle kemiallinen reaktio, joka pystyy korvaamaan 5-O-hydroksisuoja-ryhmän, jotta saadaan β - ja α -2',3'-dideoksiadenosiinin anomeerinen seos;

g) saatetaan β - ja α -2',3'-dideoksiadenosiinin seos vaiheesta (f) kosketukseen entsyymien, adenosiinideaminaasin kanssa, jotta adenosiini-rengassysteemin 6-asemassa oleva aminoryhmä korvautuisi selektiivisesti β -2',3'-dideoksiadenosiinissa hydroksyyli-ryhmällä, jolloin adenosiini muuttuu inosiiniksi; ja

h) otetaan talteen dideoksi-inosiini edellä olevasta vaiheesta (g).

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheissa (a) ja (b) käytettävä pelkistin on BH_3 (B_2H_6), BH_3SMe_2 , $[(\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3))_2\text{BH}]$, NaBH_4 , NaBH_4 ja joko LiCl tai AlCl_3 tai BF_3 , LiAlH_4 , $\text{LiAlH}(\text{OMe})_3$ tai $\text{LiAlH}(\text{OBu-t})_3$

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa (b) käytettävä pelkistin on $[(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{CH}_3)]_2\text{BH}$

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa (a) käytettävä hydroksisuojarahyhmä on bentsoyyli-ryhmä.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheen (c) mukainen välituote reagoi $(\text{CH}_3)_3\text{SiBr}$:n kanssa, joka tällöin toimii kaavan MX mukaisena yhdisteenä.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa (e) adenosiniemäsyhdiste, aktivoituna reaktiolla halotrialkyyllisilaanin kanssa, tämän toimiessa silyloivana aineena, jossa halo on bromi tai jodi, reagoi 1-poistuva ryhmä-5-O-suojaryhmä-2',3'-dideoksipentafuranoosivälituotteen kanssa, jolla on kaava F vaiheesta (d), jolloin saadaan 5'-O-hydroksi-suojaryhmä-2',3',-dideoksiadenosiinivälituote.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että reaktiovaihe (e) suoritetaan ei-polaarisessa liuottimessa, joka on CHCl_3 , CH_2Cl_2 , $\text{ClCH}_2\text{-CH}_2\text{Cl}$ tai CCl_4 .

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että reaktiot vaiheissa (d) ja (e) suoritetaan yhdessä astiassa lisäten peräkkäin halogenointiainetta ja aktivoitua adenosinijohdannaista vaiheen (c) välituotteeseen.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että halogenointiaine on bromitrimetyyllisilaani ja aktivoitu adenosinijohdannainen on bis-silyliadeniini.

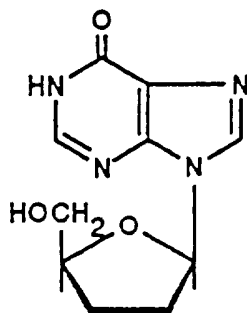
10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa (f) vaiheen (e) mukainen välituote, jossa suojaryhmä on bentsoyyli, reagoi ammoniakilla kyllästetyn metanolin kanssa, jolloin 5-O-hydroksisuojaryhmä korvautuu.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa (g) käytetään entsyymi, adenosinideaminaasi, liuoksena neutraalissa vesipitoisessa väliaineessa tai sidottuna entsyymivalmisteenä.

Patentkrav

1. Förfarande varmed selektivt framställes β -2',3'-
dideoxiinosin, med formeln A

5



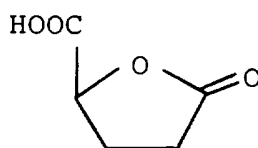
(A)

10

k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar följande
steg:

15

a) man omvandlar en γ -karboxi- γ -butyrolakton med
formeln B

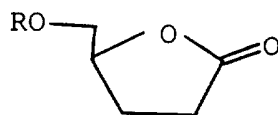


20

(B)

till en 5-O-hydroxiskyddsgrupp-metyl- γ -butyrolakton med
formeln C

25



(C)

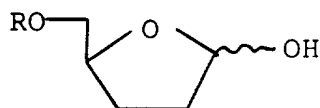
30

vari R är en hydroxiskyddsgrupp, genom att man bringar en
förening med formeln B att reagera med ett karboxylgrupp-
reducerande reagens och därefter bringar den erhållna hyd-
roximetylgruppen att reagera med ett hydroxiskyddsgrupps-
reagens;

35

b) man omvandlar mellanprodukten från steg (a) med formeln C, till 5-O-hydroxiskyddsgrupp-metyl-2,3-dideoxi-pentofuranos med formeln D

5

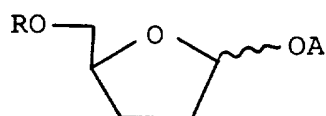


(D)

vari R är en hydroxiskyddsgrupp, genom att bringa en förening med formeln C att reagera med ett karbonylgrupp-reducerande reagens;

c) man omvandlar mellanprodukten från steg (b) med formeln D, till en 1-O-aktiverande grupp-5-O-hydroxiskyddsgrupp-metyl-2,3-dideoxipentofuranos med formeln E

15



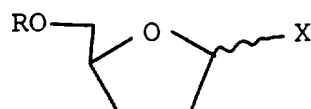
(E)

20

vari R är en hydroxiskyddsgrupp och A är en O-aktiverande grupp, som är en alkylkarbonylgrupp, genom att bringa en förening med formeln D att reagera med ett acylerande ämne som motsvarar grupp A ovan;

d) man omvandlar mellanprodukten från steg (c), en förening med formeln E, genom reaktion med en förening med formeln MX till 1-avgående grupp-5-O-hydroxiskyddsgrupp-metyl-2,3-dideoxipentofuranos med formeln F

30



(F)

35 vari R är en hydroxiskyddsgrupp och X är en avgående

grupp, som är Cl eller Br, genom att bringa en förening med formeln E att reagera med en förening med formeln MX, vari M är en $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$;

5 e) man bringar mellanprodukten från steg (d) med formeln F att reagera med ett aktiverat adeninderivat vari basen, adenin, är aktiverad genom att låta C-6-aminogruppen i ringen hos nämnda bas och N-9 kväveatomen reagera med en aktiverande förening som är ett silylerande eller acylerande eller bensoylerande ämne, sålunda, att närvarande är en Brönstedsyra eller en Lewissyra och ett lösningsmedel, som är ett polärt eller ej polärt lösningsmedel; och

10 f) man utför en kemisk reaktion med mellanprodukten från steg (e) som förmår substituera 5-O-hydroxiskyddsgruppen, varvid man erhåller en blandning av β - och α -2',3'-dideoxiadenosinanomerer;

20 g) man bringar blandningen av β - och α -2',3'-dideoxiadenosin från steg (f) i kontakt med enzymet adenosin-deaminas för att aminogruppen i adenosinringsystemet i 6-ställning skall substitueras selektivt hos β -2',3'-dideoxiadenosinet med en hydroxylgrupp, varvid adenosinet omvandlas till inosin; och

h) man tager tillvara dideoxiinosinet från föregående steg (g).

25 2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e - t e c k n a t därav, att det vid stegen (a) och (b) använda reduktionsmedlet är BH_3 (B_2H_6), BH_3SMe_2 , $[(\text{CH}_3\text{CHCH}(\text{CH}_3))]_2\text{BH}$, NaBH_4 , NaBH_4 och antingen LiCl eller AlCl_3 eller BF_3 , LiAlH_4 , $\text{LiAlH}(\text{OMe})_3$ eller $\text{LiAlH}(\text{OBu-t})_3$.

30 3. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e - t e c k n a t därav, att det vid steget (b) använda reduktionsmedlet är $[(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{CH}_3)]_2\text{BH}$.

35 4. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e - t e c k n a t därav, att den vid steget (a) använda hydroxiskyddsgruppen är en bensoylgrupp.

5. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att mellanprodukten enligt steg (c)
reagerar med $(\text{CH}_3)_3\text{SiBr}$ som härvid fungerar som en förening
med formeln MX.

5 6. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att vid steg (e) reagerar adenosin-
basföreningen, aktiverad genom reaktion med en halotrial-
kylsilan, varvid denna fungerar som silylerande ämne, vari
halo är brom eller jod, reagerar med 1-avgående grupp-5-
10 O-skyddsgrupp-2',3'-dideoxipentafuranosmellanprodukten
med formeln F från steg (d), varvid man erhåller en 5'-O-
hydroxi-skyddsgrupp-2',3,-dideoxiadenosinmellanprodukt.

7. Förfarande enligt patentkrav 6, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att reaktionssteg (e) utföres i ett
15 ej polärt lösningsmedel är CHCl_3 , CH_2Cl_2 , $\text{ClCH}_2\text{-CH}_2\text{Cl}$ eller
 CCl_4 .

8. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att reaktionerna vid stegen (d) och
(e) utföres i ett kärl genom successiv tillsättning av ha-
20 logeneringsmedel och aktiverat adenosinderivat till mel-
lanprodukten från steg (c).

9. Förfarande enligt patentkrav 8, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att halogeneringsmedlet är bromtri-
metylsilan och det aktiverade adenosinderivatet är bis-
25 silyladenin.

10. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att mellanprodukten vid steg (f)
reagerar mellanprodukten från steg (e), vari skyddsgruppen
är bensoyl, med ammoniakmättad metanol, varvid 5-O-hyd-
30 roxiskyddsgruppen substitueras.

11. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att vid steg (g) användes enzymet,
adenosindeaminas i form av en lösning i ett neutralt vat-
tenhaltigt medium eller i form av ett immobiliserat enzym-
35 preparat.