SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) Dátum podania: 03.02.94

(31) Číslo prioritnej prihlášky: RM93A000608, MI93A002324

(32) Dátum priority: 10.09.93, 03.11.93

(33) Krajina priority: IT, IT

(40) Dátum zverejnenia: 02.10.96

(86) Číslo PCT: PCT/EP94/00308, 03.02.94

(21) Číslo dokumentu:

293-96

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6] :

C 07D 473/00

(71) Prihlasovateľ: RECORDATI S.A., CHEMICAL & PHARMACEUTICAL COMPANY, Chiasso, CH;

(72) Pôvodca vynálezu: Turchetta Stefano, Milano, IT;
Pucci Sabina, Milano, IT;
Piccoli Gianfranco, Milano, IT;
Frare Giovanni, Milano, IT;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob prípravy 9-(2-hydroxy)-etoxymetyl-guanínu**

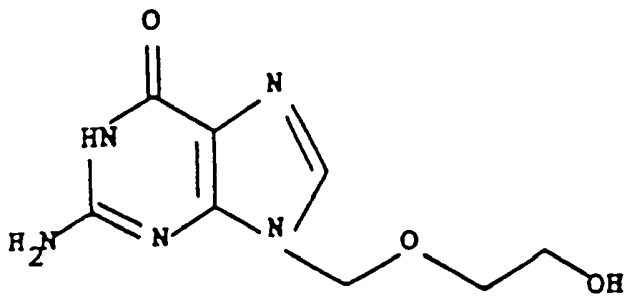
(57) Anotácia:
Je opísaný spôsob prípravy 9-(2-hydroxy)-etoxymetyl-guanínu (acykloviru) alkyláciou N^2-formylguanínu s 2-oxy-1,4-diacyloxybutánom a následnou alkalickou hydrolýzou vzniknutého medziproduktu.

PV 293 - 96

Spôsob prípravy 9-(2-hydroxy)-etoxymetyl-guanínu

Oblasť techniky

Vynález sa týka nového zlepšeného spôsobu prípravy 9-(2-hydroxy)-etoxymetyl-guanínu so vzorcom (I)



(I)

Doterajší stav techniky

Príprava látky (I) známej ako "acyklovir" a široko používanej v terapii ako antivírusový prostriedok bola opísaná napríklad v Belgickom patente 833,006 vychádzajúc z guanínu, ktorý sa najprv podrobí trimetylsilanizácii v troch polohách 2-amino, 6 a 9. Vzniknutý silanizovaný medziprodukt sa potom opracuje s 2-benzoyletoxymetylchloridom, čím sa tvorí (po deprotekcii N^2 a N^6 polohy) 9-(2-benzoyloxy)-etoxymetyl-guanín, z ktorého sa acyklovir získa amonolýzou v metanole. Proces zahrňuje použitie veľmi silného prebytku silanizačného reagentu, s obvyklými problémami, aj čo sa týka cien a odpadov, naviac vedie k produktu, ktorý je značne znečistený prítomnosťou 7-substituovaného izoméru v množstvách neprijateľných z hľadiska farmaceutického použitia.

Britský patent 1.567.671 opisuje iný proces, v ktorom je ochrana aminoskupiny v 2-polohe uskutočnená acyláciou; patent nárokuje ako acylačné skupiny acetyl, propionyl, butyryl a benzoyl, hoci v jedinom opísanom príklade je to N^2,9-diacetylguanín, ktorý reaguje s 2-oxy-1,4-diacetoxybutánom, čím poskytne N^2-acetyl-9-(2-acetoxy)-etoxymetylguanín, ktorý sa hydrolyzuje a poskytne tak konečný acyklo-

vir s výťažkami, ktoré by mohli byť dostatočné, ak by sa netvorili významné množstvá (do 13 % hmotnostných) 7-izoméru, ktorý - okrem poškodzovania požadovaného produktu - prináša ďalšie drahé kroky čistenia.

US 4,146,671 poskytuje metódu prípravy guanínových derivátov, ktorá zahrňuje acyklovir, reagovaním diacylovaného guanínu s diesterom 2-oxy- alebo 2-tia-butándiolu a následnou hydrolýzou.

EP 0 532 878 opisuje prípravu acykloviru vychádzajúc z guanozínu a diesteru 2-oxy-butándiolu a anhydridu kyseliny octovej s následnou hydrolýzou. Požadovaný produkt sa získa spolu so 7-izomérom, ktorý sa musí konvertovať na požadovaný 9-izomér.

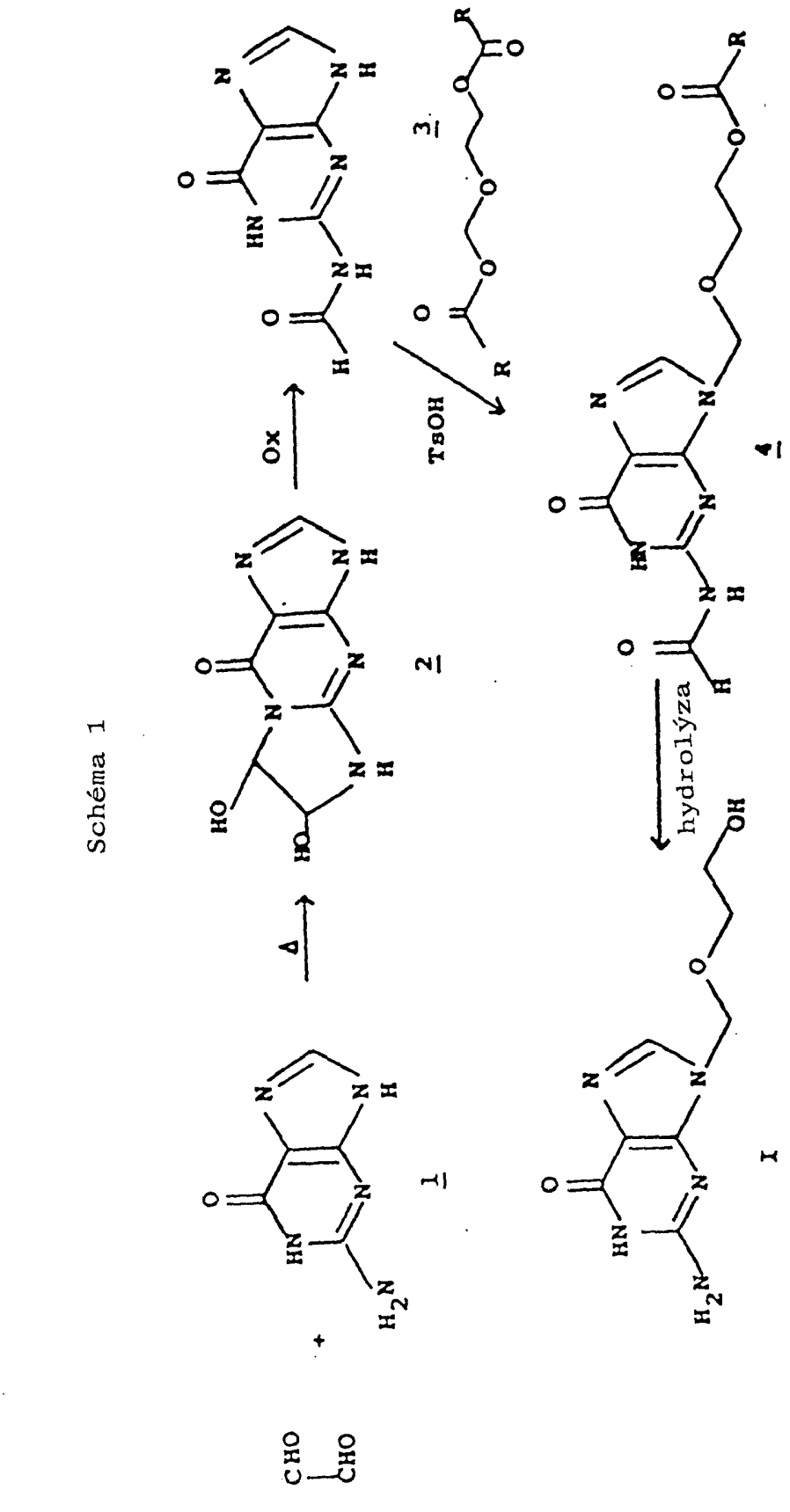
Podstata vynálezu

Teraz sa prekvapivo zistilo, že acyklovir sa môže získať vo vysokých výťažkoch, v podstate zabránením tvorbe nežiadúceho 7-izoméru uskutočnením alkylácie 9-polohy purínového kruhu s 2-oxy-1,4-diacetoxybutánom na N^2-formyl-guanine. Posledne menovaná látka je opísaná v literatúre (R. Shapiro, Biochemistry 8, 231-245 (1969)). Podľa tohto autora N^2-formylguanín sa môže získať opracovaním glyoxálguanínového aduktu s jodistanom sodným a/alebo kyselinou jodistou; skutočne, proces je reprodukovateľný s vysokými výťažkami, hoci N^2-formylguanín sa môže získať podľa spôsobu z vynálezu tiež pomocou iných ciest, ako sú napríklad:

- oxidácia glyoxálguanínového aduktu pomocou kyseliny peroxooctovej alebo peroxidom vodíka alebo tetraoctanom olova;
- priamou formyláciou guanínu s kyselinou mravčou v prítomnosti alebo bez prítomnosti rozpúšťadiel, ako sú napríklad dimetylformamid alebo dimetylsulfoxid, voliteľne v prítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu;
- priamou formyláciou guanínu s anhydridom kyselín mravčej a octovej voliteľne v rozpúšťadlách, ako sú napríklad dimetylformamid, dimetylsulfoxid, triamid kyseliny hexametylfosforečnej alebo kyselina mravčia.

Ak sa postupuje podľa ktoréhokoľvek pracovného postupu na prípravu N^2-formylguanínu, následná reakcia tejto látky s 2-oxy-1,4-diacetoxybutánom vedie, s výťažkami nad 90 % (a významnejšie s tvorbou len stôp 7-izoméru), k N^2-formyl-9-(2-acetoxy)-etoxymetyl-guanínu, ktorý sa nakoniec deacetyluje v jedinom kroku s vodnou alkáliou, alebo sa najprv deformyluje v kyslom prostredí a nakoniec deacetyluje alkalickou hydrolýzou. Nasledujúca schéma sumarizuje spôsob podľa tohto vynálezu.

Schéma 1



V tejto schéme R je vodík, C_1-C_4 alkyl alebo fenyl. Diolový produkt (2) sa môže získať vo vysokých výťažkoch suspendovaním guanínu (1) v H_2O, pridaním glyoxálového vodného roztoku a zahriatím zmesi na 80 °C počas 4 hodín (R. Shapiro, na citované vyššie, R. Shapiro a J. Hachmann, Biochemistry 5, 2799 (1966)). Diol (2) sa potom môže oxidovať na formylderivát (3) vo veľmi dobrých výťažkoch pomocou stechiometrického množstva $NaIO_4$ vo vode udržiavanej na pH 1,8 až 2,2.

N^2-formylguanín (3) (ktorý, ako je už uvedené, sa dá získať tiež priamou formyláciou guanínu) sa môže potom podrobiť alkylačnej reakcii na získanie N-9 alkylovanej látky (4) vo vysokých výťažkoch, bez tvorby významného množstva N-7 alkylovaného produktu; nakoniec sa môže acyklovir vo vynikajúcich výťažkoch získať z látky (4) hydrolýzou vodným NaOH.

Celkovo preto vyššie opísaná syntéza umožňuje získať požadovaný produkt (I) v dostatočne uspokojivých výťažkoch, vyšších ako sú výťažky doteraz získané syntézou cez acetylguanín, a naviac bez tvorby postrehnuteľných množstiev 7-alkylovaného produktu.

V ďalšom uskutočnení spôsob podľa tohto vynálezu poskytuje konečný krok čistenia na získanie acykloviru, ktorý je v podstate bez guanínu. Tento krok čistenia výhodne poskytuje acyklovir vo veľmi čistej forme.

Zistilo sa, že eluovaním vodného zásaditého roztoku acykloviru cez silne bázický vymieňač aniónov umožňuje získať požadovaný produkt, ktorý je v podstate bez guanínu.

Podľa tohto vynálezu krok čistenia zahrňuje:

a) rozpustenie acykloviru vo vodnom zásaditom roztoku a zriedenie získaného roztoku vodou;
b) nanesenie tohto zriedeného roztoku z bodu a) na kolónu so silným vymieňačom aniónov v hmotnostnom pomere vymieňač: :acyklovir v rozsahu od 2 do 1,5;
c) eluovanie tohto zriedeného roztoku s prietokom v rozsahu od 200 do 300 ml/hodinu;
d) eluovanie acykloviru s eluentom pozostávajúcim zo zmesi

tvorenej zásaditým vodný roztokom nižšieho alkoholu v objemovom pomere alkohol/vodný roztok v rozsahu od 0,8 do 1,2 a s pomerom eluent/acyklovir obj./hmotn. v rozsahu od 15:1 do 20:1 l/kg pri tom istom prietoku ako v bode c), aby sa poskytol eluát;

e) izolovaním acykloviru z tohto eluátu z bodu d).

Vymieňače aniónov sú živice zásaditého typu, ktoré pozostávajú z polymérov s určitým stupňom zosietenia a nesú kvartérne amóniové skupiny. Vymieňače použité podľa tohto vynálezu sú vymieňače silne bázického typu.

Príkladmi silne bázických vymieňačov sú dextrány, agaróza, celulóza, divinylbenzén, primerane s funkčnými kvartérnymi amóniovými skupinami.

Tieto vymieňače sú normálne komerčne dostupné s obchodnými značkami Amberlite(R), Dowex(R), Sephacel(R), Sephadex(R), atď.

Výhodné sú Amberlite(R) IRA-400, Relite(R) 3A, IMAC HP-441.

Chromatografia sa uskutočňuje na vymieňači v jeho bázickej forme.

Elúcia sa uskutočňuje pri laboratórnej teplote.

Vodný zásaditý roztok z bodu a) pozostáva z roztoku hydroxidu alkalického kovu, ako je hydroxid lítny, sodný, draselný. Koncentrácia zásady je v rozsahu od 5 do 15 % hmotnostných, výhodný je 10% roztok hydroxidu sodného.

Výhodne je hmotnostný pomer vymieňač:acykloviru 1,75.

Výhodný je prietok eluenta 250 ml/hodinu.

Nižšie alkoholy z bodu d) sú metylalkohol, etylalkohol, propylalkohol. Vodný zásaditý roztok z bodu d) pozostáva z hydroxidu alkalického kovu v koncentrácii v rozsahu od 0,8 do 1,2 mol/l. Výhodne je objemový pomer metylalkohol/ /1 mol/l hydroxid sodný 1:1.

Výhodne je pomer obj./hmotn. eluent/acykloviru 17,5 l/kg.

Oddelenie produktu z eluátu v bode e) sa uskutočňuje pomocou konvenčných techník. Výhodne sa acyklovir zráža okyslením eluátu s vhodnou kyselinou.

Takto získaný produkt má obsah guanínu nižší ako 0,1 % hmotnostného.

Podľa kroku čistenia podľa tohto vynálezu, takto získaný acyklovir je 3 až 4 krát čistejší než najlepšie komerčne dostupné produkty.

Vyššie uvedená čistá forma acykloviru je ďalším predmetom tohto vynálezu.

Čistiaci krok podľa tohto vynálezu je použiteľný na všetky iné známe spôsoby prípravy acykloviru. Napríklad vyššie zmienené procesy BE 833.066 a GB 1.567.671 vedú ku konečnému produktu, ktorý obsahuje 1 až 3 % hmotnostné guanínu, ktorý je v neprijateľnom množstve, pretože US Pharmacopoeia predpisuje maximálnu hornú hranicu 0,7 % hmotnostného.

Preto čistenie acykloviru, ako je opísané vyššie, tvorí ďalší predmet tohto vynálezu.

Nasledujúce príklady ďalej ilustrujú spôsob podľa tohto vynálezu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

a) "Glyoxálguanín" (2)

100 g (0,662 mol) guanínu, 800 ml H_2O a 150 ml vodného glyoxálového roztoku s koncentráciou 40 % hmotnostných (1,32 mol) sa zmiešali pri laboratórnej teplote v 2 l banke s okrúhlym dnom vybavenej chladičom, teplomerom a magnetickým miešadlom a zmes sa zahrievala na 80 °C počas 4 hodín, po ktorých sa obsah banky postupne ochladil na 5 °C, prefiltroval a premyl s vodou. Po sušení do konštantneej hmotnosti za vákua sa získalo 136 g produktu (98 % výťažok), ktorý vykazoval podľa HPLC analýzy >98 % čistotu.

b) N^2-formylguanidín (3)

Suspenzia 100 g (0,478 mol) glyoxálguanínu v 800 ml vo-

dy upravenej na pH 1,8 až 2,2 so 6 ml H_3PO_4 sa spojila so 107,4 g (0,502 mol) $NaIO_4$ za mechanického premiešavania a udržiavania teploty 30 °C pomocou vodného kúpeľa, kontinuálne sa kontrolovalo pH, ktoré sa nemá podstatne zmeniť z hodnoty 1,8 až 2,2. Reakcia vyvíja mierne konštantné teplo do ukončenia, ktoré sa dosiahne asi dve hodiny po pridaní oxidovadla. Po tomto čase sa reakčná zmes ochladí na 5 °C, prefiltruje, premyje s vodou a suší. Získalo sa 82 g formylguanínu (3) (96 % výťažok), ktorý vykazoval podľa HPLC analýzy >96 % čistotu.

c) N^2-formyl-9-(2-acetoxy)-etoxymetyl-guanín (4, s R = CH_3)

100 g (0,559 mol) formylguanínu (3), 300 g (1,705 mol) kyseliny p-toluénsulfónovej sa umiestnilo do 500 ml banky s okrúhlym dnom na olejovom kúpeli, vybavenej s teplomerom a destilačným zariadením. V systéme sa znížil tlak (4 až 5,3 kPa) a hmota sa zahriala tak, aby dosiahla vnútornú teplotu 118 až 122 °C za asi 1 hodinu. Teplota sa udržiavala na 118 až 122 °C celkovo počas 8 hodín, pričom sa destilovala vytvorená kyselina octová. Zmes sa ochladila na 50 až 60 °C a zriedila so 150 ml acetónu (alebo n-butanolu alebo etylacetátu), ochladila na 0 až 5 °C, filtrovala a sušila za vákua pri 60 až 70 °C, čím sa získalo 148,3 g (4) s R = CH_3 (90 % výťažok). Elementárna analýza a spektroskopické údaje potvrdili navrhovanú štruktúru.

d) Acyklovir (I)

65 g (0,220 mol) látky (4) (s R = CH_3) sa dispergovalo v 650 ml 5 % roztoku NaOH po úplné rozpustenie tuhej látky. Po 12 hodinách premiešavania sa zmes neutralizovala na pH 5 až 6 vodným roztokom HCl. Kaša sa ochladila na 20 až 25 °C, koláč sa odfiltroval a premyl s 400 ml deionizovanej vody. Po sušení za vákua pri 60 až 70 °C sa získalo 46,1 g acykloviru (I) s 93 % výťažkom.

Príklad 2

a) 9-(2-acetoxy)-etoxymetyl-guanín (6)

300 ml 95 % EtOH, 29,5 g (0,1 mol) medziproduktu (4) a 40,4 g (0,4 mol) Et_3N sa umiestnili do 500 ml banky s okrúhlym dnom vybavenej s teplomerom, miešadlom a guličkovým chladičom. Hmota sa refluxovala počas 5 hodín. pH sa nastavilo na hodnotu 5 až 6 pomocou vodného HCl, zmes sa ochladila na 15 až 20 °C, koláč sa odfiltroval a premyl s 200 ml deionizovanej vody. Po sušení za vákua pri 60 až 70 °C sa získalo 22,8 g látky (6) (85 % výťažok).

b) acyklovir (I)

26,7 g (0,1 mol) látky (6) sa opracovalo s 5 % NaOH, ako je opísané v Príklade 1 d). Acyklovir sa získal v podstate s kvantitatívnym výťažkom.

Príklad 3

Podľa postupu z Príkladu 1 sa za použitia namiesto 2-oxy-1,4-diacetoxybutánu zodpovedajúceho množstva 2-oxy-1,4-diformyloxybutánu alebo 2-oxy-1,4-dibenzoyloxybutánu na alkyláciu N^2-formylguanínu. Získali sa zodpovedajúce medziprodukty (4) s R = H a s R = fenyl, v podstate s rovnakými výťažkami, ako sú výťažky v Príklade 1c), z ktorých sa medziprodukty acykloviru ľahko získajú tak, ako je to opísané v Príklade 1d).

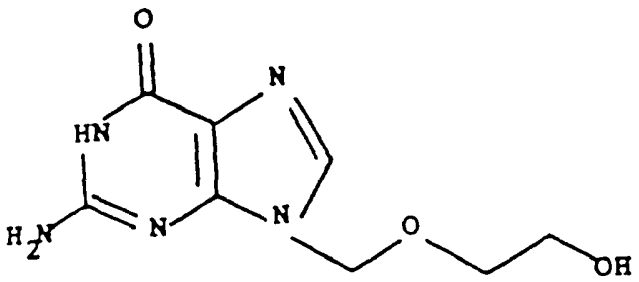
Príklad 4

87,5 g (125 ml, zdanlivé d = 0,7) silne bázického vymieňača (AMBERLITE IRA-400) sa suspendovalo v deionizovanej vode a naplnilo do chromatografickej kolóny (priemer 4 cm, h = 40 cm). Po obvyklom regeneračnom opracovaní (postupná elúcia s 2 mol/l NaOH, 2 mol/l HCl, 2 mol/l NaOH a deionizo-

vanou vodou do neutrálnej reakcie) sa nadávkoval roztok získaný rozpustením 50 g acykloviru v 100 ml 10 % roztoku NaOH, zriedený s 200 ml vody. Roztok sa potom eluoval s prietokom 250 ml/hodinu (4,2 ml/min). Po elúci vyššie uvedeného roztoku, sa kolóna eluovala tou istou prietokovou rýchlosťou s 900 ml zmesi 1:1 MeOH/1 mol/l NaOH (objemovo). Získaný eluát sa upravil na pH 5 až 6 vodným HCl. Vyzrážaná tuhá látka sa odfiltrovala, premyla vodou a sušila. Získalo sa 45 g acykloviru (90 % výťažok), ktorý bol bez guanínu.

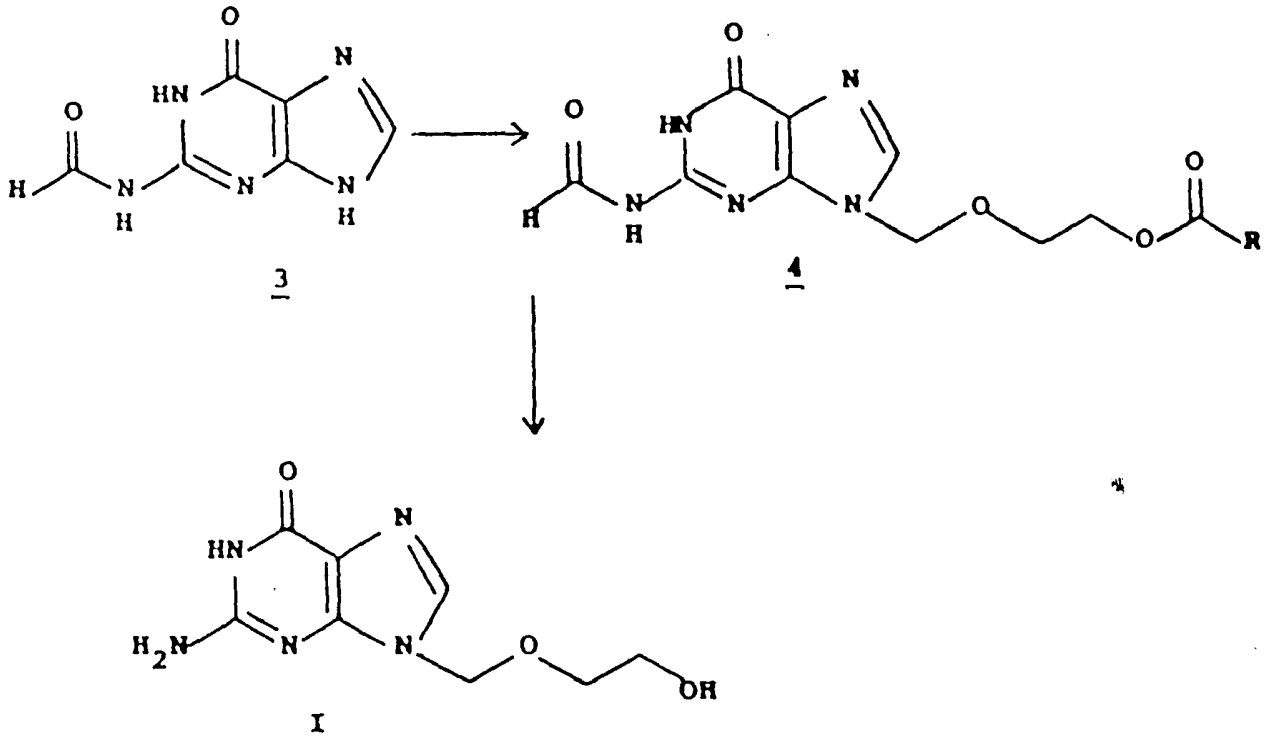
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob prípravy 9-(2-hydroxy)-etoxymetyl-guanínu (acykloviru) (I),



(I)

v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že N^2-formylguanín (3) sa podrobí alkylácii s 2-oxy-1,4-diacyloxybutánom a tým, že N^2-formyl-9-(2-acyloxy)-etoxymetyl-guanín (4) sa hydrolyzuje podľa schémy:



kde R je vodík, C_1-C_4 alkyl alebo fenyl.

2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že medziprodukt (4) sa naraz deformyluje a O-deacyluje opracovaním so zriedeným vodným NaOH.

3. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že medziprodukt (4) sa najprv deformyluje s trietylamínom v etanole a tým, že vzniknutý 9-(2-acyloxy)-etoxymetylguanínu sa hydrolyzuje na acyklovir so zriedeným vodným NaOH.

4. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že N^2-formylguanín (3) sa pripraví priamou formyláciou guanínu s kyselinou mravčou alebo anhydridom kyseliny mravčej a octovej.

5. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že acyklovir sa podrobí kroku čistenia, ktorý zahrňuje:

a) rozpustenie acykloviru vo vodnom zásaditom roztoku a zriedenie získaného roztoku vodou;
b) nanesenie tohto zriedeného roztoku z bodu a) na kolónu so silným vymieňačom aniónov v hmotnostnom pomere vymieňač: acykloviru v rozsahu od 2 do 1,5;
c) eluovanie tohto zriedeného roztoku s prietokom v rozsahu od 200 do 300 ml/hodinu;
d) eluovanie acykloviru s eluentom pozostávajúcim zo zmesi tvorenej zásaditým vodný roztokom nižšieho alkoholu v objemovom pomere alkohol/vodný roztok v rozsahu od 0,8 do 1,2 a s pomerom eluent/acyklovir obj./hmotn. v rozsahu od 15:1 do 20:1 l/kg pri tom istom prietoku ako v bode c), aby sa poskytol eluát;
e) izolovaním acykloviru z tohto eluátu z bodu d).

6. Spôsob podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že 9-(2-hydroxy)-etoxymetyl-guanín (acyklovir) je

v podstate bez guanínu.

7. Spôsob podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že 9-(2-hydroxy)-etoxymetyl-guanín (acyklovir) sa získa s obsahom guanínu menej ako 0,1 % hmotnostné.