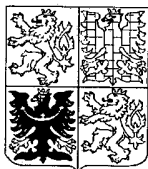


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01.10.1999**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **02.10.1998 17.06.1999**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/281663 1999/170681**
(33) Země priority: **JP JP**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.08.2001**
(Věstník č. 8/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/JP99/05415**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/20430**

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 1028

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 H 19/10

A 61 P 11/10

(71) Přihlašovatel:

YAMASA CORPORATION, Choshi-shi, JP;

(72) Původce:

Maeda Hideaki, Choshi-shi, JP;
Yamada Toshio, Choshi-shi, JP;
Sato Hiroshi, Choshi-shi, JP;
Noda Yutaka, Choshi-shi, JP;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Krystal diuridintetrafosfátu nebo krystal jeho soli a způsob jeho přípravy a výroby

(57) Anotace:

Krystal P^I, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu (U_2P_4) nebo jeho soli se připraví tak, že se výchozí surový U_2P_4 čistí pomocí anexové chromatografie a chromatografie na aktivním uhlí a za použití hydrofilního organického rozpouštědla se nechá vykrytalizovat. Způsob výroby U_2P_4 při němž se UMP jako výchozí látka smísí difenyl-chlorfosfátem s (DPC) a pyrofosfátem (Ppi) přičemž způsob zahrnuje alespoň jeden z následujících kroků: a) během reakce UMP-DPP s organickou zásaditou solí Ppi se v několika dávkách přidává difenylfosfát UMP, b) reakce UMP-DPP s organickou zásaditou solí Ppi se provádí v přítomnosti zásady a c) po syntéze U_2P_4 se reakční produkt dále čistí použitím zásady.

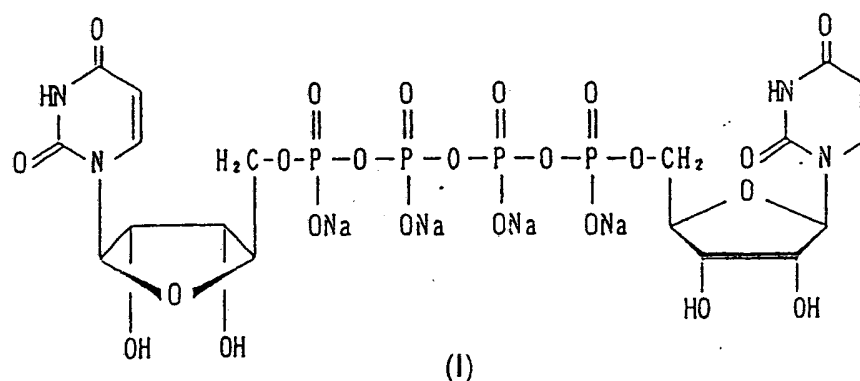
Krystal diuridintetrafosfátu nebo krystal jeho soli a způsob jeho přípravy a výroby

Oblast techniky

Tento vynález se týká stabilních krystalů P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu (U_2P_4) nebo krystalů jeho soli, které se používají jako aktivní složky látek usnadňujících vykašlávání (expektorantů) nebo terapeutického činidla pro pneumonii. Tento vynález se týká způsobu výroby krystalů a způsobu efektivní výroby U_2P_4 nebo jeho soli.

Dosavadní stav techniky

Tetrasodná sůl P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu ($U_2P_4 \cdot 4Na$) obecného vzorce I:



vykazuje účinek usnadňující vykašlávání a je považována za sloučeninu, která byla vyvinuta pro usnadnění vykašlávání nebo jako terapeutické činidlo pro pneumonii (například U.S. Patent Nos. 5,789,391, 5,763,447 a 5,635,160).

Do této doby nebyl U_2P_4 připraven v krystalické formě a byl připraven pouze ve formě lyofilizovaného výrobku (viz. Příklad 1 v WO 99/05155). Typický U_2P_4 vyrobený konvenčními metodami dosahuje čistoty pouze 90 % a obsahuje vedlejší produkty. Mezi příklady vedlejších produktů patří nukleosid-5'-(poly)fosfáty jako jsou uridin-5'-tetrafosfát (UP_4), uridin-5'-trifosfát (UTP), uridin-5'-difosfát (UDP) a uridin-5'-monofosfát (UMP), a dále dinukleosidpolyfosfáty jako je P^1, P^4 -di(uridin-5'-)trifosfát (U_2P_3) a P^1, P^4 -di(uridin-5'-)difosfát (U_2P_2).

Zvláště obtížné je z U_2P_4 oddělit nukleosid-5'-(poly)fosfáty jako je UTP a velmi čistý U_2P_4 lze s velkými obtížemi vyrobit pouze pomocí konvenčních čisticích metod, tj. ionexovou chromatografií (WO 99/05155, *Biochimica et Biophysica Acta*, 438, (1976) 304-309).

Nevýhodou výše uvedeného čištěného a lyofilizovaného výrobku je jeho vysoká hygroskopicitá. Díky tomu se musí příprava farmaceutického přípravku obsahujícího U_2P_4 provádět ve speciální aparatuře s dobře kontrolovatelnou vlhkostí a po ukončení této přípravy se výrobek musí dokonce neprodyšně zabalit. Poněvadž má navíc farmaceutický přípravek díky nízké stabilitě lyofilizační přípravy velmi krátkou životnost, je žádoucí získat velmi čisté a stabilní krystaly U_2P_4 .

U_2P_4 se syntetizuje z uridin-5'-monofosfátu (UMP) použitím aktivačního činidla jako je difenyl-chlorfosfát (DPC) a fosforylačního činidla jako je pyrofosfát (difosfát, PPi). Výtěžek syntézy při konvenčním způsobu je však nízký, tj. pouze 10 % hmotnostních (Příklad 4B ve WO 99/05155), a nemůže nikdy sloužit pro praktické účely. Vzhledem k tomu je žádoucí vyvinout způsob výroby U_2P_4 s vysokým výtěžkem a ve velkém měřítku.

Z hlediska předešlých skutečností je předmětem tohoto vynálezu poskytnout stabilní krystaly U_2P_4 nebo krystaly jeho soli. Dalším předmětem tohoto vynálezu je poskytnout způsob výroby těchto krystalů. Dalším předmětem tohoto vynálezu je poskytnout způsob efektivní výroby U_2P_4 ve velkém měřítku.

Podstata vynálezu

Nynější vynálezci prováděli nálehavé studie týkající se způsobu čištění U_2P_4 a způsobu syntézy U_2P_4 z UMP. Vynálezci zjistili, že U_2P_4 čištěný pomocí anexové chromatografie a chromatografie používající aktivní uhlí (chromatografie na aktivním uhlí) podléhá snadno krystalizaci a že použití specifických reakčních podmínek při jeho syntéze nebo při syntéze jeho soli z UMP, který slouží jako výchozí látka a který se mísí s DPC a PPi, vede ke značnému zvýšení jeho výtěžku. Tento vynález byl dosažen na základě těchto zjištění.

Vzhledem k tomu se tento vynález týká krystalů P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu nebo krystalů jeho soli.

Tento vynález se týká také krystalů tetrasodné soli P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu s krystalickou strukturou, která při rentgenové difrakci využívající paprsků Cu-K α vykazuje charakteristické píky v blízkosti difrakčních úhlů (2θ) 5,9, 11,5, 12,4, 15,4, 17,2, 18,0, 19,8 a 20,5 ($^\circ$).

Tento vynález se týká také krystalů tetrasodné soli P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu s krystalickou strukturou, která v absorpčním infračerveném (IČ) spektru vykazuje charakteristické píky při vlnových délkách v blízkosti 1690, 1277, 1233, 1146, 1116 a 890 (cm^{-1}).

Tento vynález se týká také způsobu výroby krystalů P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu nebo krystalů jeho soli. Tento proces sestává z čištění surového P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu nebo jeho soli pomocí anexové chromatografie a chromatografie na aktivním uhlí a pomocí přidání hydrofilního organického rozpouštědla do roztoku čištěného P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu nebo do roztoku jeho soli, což vede k vysrážení krystalů.

Tento vynález se týká také způsobu výroby krystalů P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu nebo krystalů jeho soli z uridin-5'-monofosfátu (UMP) jako výchozí látky reakcí s difenyl-chlorfosfátem (DCP) a pyrofosfátem (PPi). Tento způsob se vyznačuje tím, že jeho součástí je alespoň jeden z následujících kroků čištění:

- a) během reakce UMP-DPP s organickou zásaditou solí PPi se po částech přidává difenylfosfát UMP (UMP-DPP),
- b) reakce UMP-DPP s organickou zásaditou solí PPi se provádí v přítomnosti zásady
- c) syntetizovaný U_2P_4 se dále čistí použitím zásady.

Stručný popis obrázků

Na Obrázku 1 je rentgenové difrakční spektrum krystalického tetrahydrátu $U_2P_4 \cdot 4Na$, který byl vykrytalizován z roztoku ethanolu.

Na Obrázku 2 je rentgenové difrakční spektrum krystalického oktahydrátu $U_2P_4 \cdot 4Na$, který byl vykrystalizován z roztoku ethanolu.

Na Obrázku 3 je rentgenové difrakční spektrum U_2P_4 získaného lyofilizací.

Na Obrázku 4 je fotografie, na které je krystalická forma krystalického oktahydrátu $U_2P_4 \cdot 4Na$, který byl vykrystalizován z roztoku ethanolu. Fotografie byla udělána použitím polarizačního mikroskopu (zvětšení: 440), přičemž 1 cm na fotografii odpovídá 23 μm .

Na Obrázku 5 je IČ absorpční spektrum krystalického oktahydrátu $U_2P_4 \cdot 4Na$, který byl vykrystalizován z roztoku ethanolu.

Na Obrázku 6 je IČ absorpční spektrum U_2P_4 získaného lyofilizací.

Na Obrázku 7 je rentgenové difrakční spektrum krystalického oktahydrátu $U_2P_4 \cdot 4Na$, který byl vykrystalizován z roztoku methanolu.

Nejllepší způsob provedení tohoto vynálezu

Krystaly U_2P_4 nebo krystaly jeho soli se podle tohoto vynálezu získávají pomocí čištění surového U_2P_4 nebo jeho soli použitím specifických prostředků a přidávkem hydrofilního organického rozpouštědla k roztoku čištěného U_2P_4 nebo jeho soli, což vede k vysrážení krystalů z roztoku. Tento vynález bude dále vysvětlen kvůli 1) čištění U_2P_4 nebo jeho soli a 2) krystalizaci U_2P_4 nebo jeho soli.

1) Čištění U_2P_4 nebo jeho soli

U_2P_4 nebo jeho sůl se čistí pomocí anexové chromatografie a chromatografie na aktivním uhlí, což se provádí v kombinaci. Ačkoliv lze tyto chromatografické techniky provádět v libovolné sekvenci, z hlediska zlepšení čistoty U_2P_4 je výhodné zařadit anexovou chromatografii před chromatografií na aktivním uhlí.

Ve výše zmiňovaných chromatografických technikách lze jako anexovou pryskyřici použít styrenovou nebo akrylovou pryskyřici. Mezi příklady pryskyřic, které lze použít, patří silně zásadité anexové pryskyřice jako jsou AMBERLITE IRA 402 (Rohm & Haas Co.), DIAION SA-11A (Mitsubishi Chemical Co. Ltd.) a slabě zásadité

anexové pryskyřice jako jsou AMBERLITE IRA 67 (Rohm & Haas Co.) a DIAION WA-30 (Mitsubishi Chemical Co. Ltd.).

Aktivní uhlí je ve formě aktivního uhlí určeného přímo pro chromatografii, které je rozdrveno nebo vytvarováno do částic a patří mezi ně komerčně dostupné výrobky (např. produkty firmy Wako Pure Chemical Industries, Ltd. a firmy Futamura Kagaku Kogyo).

Chromatografie se provádí násadovým způsobem nebo ve sloupci (koloně). Pokud se to provádí sloupcovou chromatografií, lze jako eluent pro anexovou chromatografii použít vodný roztok kyseliny nebo její směsi se solí, která má zvýšenou iontovou sílu, jako je chlorid sodný. Jako eluent pro chromatografii na aktivním uhlí lze použít vodu nebo vodný roztok zásady jako je hydroxid sodný. Aby bylo možné náležitě stanovit koncentraci každého z eluentů v rozmezí 0,001 až 10 mol/l, lze provést předběžný test v malém měřítku.

2) Krystalizace U_2P_4 nebo jeho soli

Krystalizace U_2P_4 nebo jeho soli se provádí přidavkem hydrofilního organického rozpouštědla do roztoku, který tento čištěný U_2P_4 obsahuje.

Mezi příklady hydrofilních organických rozpouštědel, které se používají pro tyto účely, patří alkoholy s 1 až 6 atomy uhlíku, jako je methanol a ethanol, ketony jako je aceton, ethery jako je dioxan, nitrily jako je acetonitril a amidy jako je dimethylformamid. Z výše jmenovaných látek jsou výhodné zvláště alkoholy, především ethanol.

Roztok takto čištěného U_2P_4 nebo jeho soli, nebo kaše získaná zakoncentrováním tohoto roztoku, se případně upravuje tak, aby bylo dosaženo pH v intervalu 6 až 9, a při teplotě 60 °C nebo menší se k roztoku nebo kaši přidá hydrofilní organické rozpouštědlo, což vede k vysrážení stabilních krystalů U_2P_4 z roztoku.

Takto získané krystaly U_2P_4 podle tohoto vynálezu obsahují 1) U_2P_4 v množství minimálně 95 % a 2) ostatní homologové sloučeniny v množství maximálně 5 %.

Mezi ostatní homologové sloučeniny tohoto vynálezu patří nukleosid-5'-(poly)-fosfáty jako jsou UP_4 , UTP, UDP a UMP, a dinukleosidpolyfosfáty jako jsou U_2P_3 a U_2P_2 .

Krystaly U_2P_4 obsahují výhodněji 1) U_2P_4 v množství minimálně 97 % a 2) UDP v množství maximálně 1 % a 3) UTP v množství maximálně 1 %. Zvláště výhodně krystaly U_2P_4 obsahují 1) U_2P_4 v množství minimálně 98 % a 2) UDP v množství maximálně 0,5 % a 3) UTP v množství maximálně 0,5 %.

Tyto velmi čisté krystaly U_2P_4 jsou ve formě solí, hydrátů nebo hydratovaných solí. Mezi příklady solí patří farmaceuticky přijatelné soli jako jsou soli alkalických kovů jako jsou sodné a draselné soli, dále soli kovů alkalických zemin jako jsou soli vápníku a hořčíku, a dále amonné soli. Pro vytvoření soli lze U_2P_4 substituovat 1 až 4 atomy kovů.

Výše zmíněné hydráty případně obsahují 3 až 8 molekul vody, které jsou navázány nebo adherovány (ulpěny) na jedné molekule U_2P_4 . Výše zmíněné hydratované soli případně obsahují 3 až 8 molekul vody, které jsou navázány nebo adherovány na jedné molekule soli alkalického kovu U_2P_4 .

Mezi příklady výhodných krystalů U_2P_4 patří krystaly $U_2P_4 \cdot 4Na$ a krystaly jejich hydrátů. Krystaly $U_2P_4 \cdot 4Na$ vykazují při rentgenové difrakci využívající paprsků Cu-K α charakteristické píky v blízkosti difrakčních úhlů (2θ) 5,9, 11,5, 12,4, 15,4, 17,2, 18,0, 19,8 a 20,5 ($^\circ$) (s odchylkou $\pm 0,1^\circ$) a v absorpčním IČ spektru charakteristické píky při vlnových délkách v blízkosti 1690, 1277, 1233, 1146, 1116 a 890 (cm^{-1}) (s odchylkou $\pm 2\ cm^{-1}$). S krystaly $U_2P_4 \cdot 4Na$ je navíc snadné nakládat a ve srovnání s konvenčními lyofilizovanými výrobky jsou mnohem užitečnější, poněvadž jsou stabilní i za vysokých teplot, za podmínek vysoké vlhkosti a obsah vody je v nich stabilizován na hodnotě 5 až 15 % hmotnostních, čímž je potlačena další hygroskopicitá.

Jak je uvedeno výše, takto získané krystaly $U_2P_4 \cdot 4Na$ tohoto vynálezu obsahují 1) U_2P_4 v množství minimálně 95 % a 2) ostatní homologové sloučeniny v množství maximálně 5 %. Navíc, jak je popsáno výše, mezi příklady výhodných krystalů U_2P_4 patří krystaly, které obsahují 1) U_2P_4 v množství minimálně 97 % a 2) UDP v množství maximálně 1 % a 3) UTP v množství maximálně 1 %, dále zvláště krystaly U_2P_4 , které obsahují 1) U_2P_4 v množství minimálně 98 % a 2) UDP v množství maximálně 0,5 % a 3) UTP v množství maximálně 0,5 %.

Mezi krystaly U_2P_4 nebo krystaly jeho soli podle tohoto vynálezu patří navíc také krystaly jeho tautomerů.

Krystaly U_2P_4 nebo krystaly jeho soli podle tohoto vynálezu se suší pomocí konvenčních metod jako je sušení za sníženého tlaku, sušení v proudu vzduchu nebo sušení zahříváním, a následně se umístí do uskladňovací nádoby (např. láhev, sáček, plechovka, ampule). Uskladňování se provádí tak, že uskladňovací nádoba je otevřená, zavřená, vzduchotěsná nebo zatavená. Pro udržení stability krystalů při skladování je otevřená uskladňovací nádoba nevýhodná.

Dále bude popsán efektivní způsob syntézy U_2P_4 .

U_2P_4 nebo jeho sůl se konvenčně převážně syntetizovala z uridin-5'-monofosfátu (UMP) jako výchozí látky a použitím aktivačního činidla jako je difenyl-chlorfosfát (DPC) a fosforylačního činidla jako je pyrofosfát (PPi). K tributylaminové soli UMP se specificky přidá DPC a tributylamin, čímž vzniká difenylfosfát UMP (UMP-DPC), který slouží jako reakční meziprodukt. Ten dále reaguje s pyrofosfátem tributylaminu (TBA-PPi), čímž vzniká U_2P_4 nebo jeho sůl, přičemž výtěžek reakce je 9,6 % (Příklad 4B z WO 99/05155).

Způsob podle tohoto vynálezu je charakteristický tím, že se provede alespoň jeden z následujících kroků čištění: a) během konvenční reakce UMP-DPP s organickou zásaditou solí PPi se po částech přidává difenylfosfát UMP, b) reakce UMP-DPP s organickou zásaditou solí PPi se provádí v přítomnosti zásady a c) syntetizovaný U_2P_4 se dále čistí použitím zásady.

Krok „a) přidávání UMP-DPP po částech“ se týká přidávání UMP-DPP, kterého se musí dodat alespoň dvakrát více, než je molární množství organické zásadité soli PPi, a raději po několika částech než najednou. Například se nechá reagovat organická zásaditá sůl PPi s ekvimolárním množstvím UMP-DPP a krok se opakuje. Ačkoliv není počet dávek UMP-DPP nijak zvláště omezen, vzhledem ke zvýšení výtěžku jsou výhodné 2 až 3 dávky.

Mezi příklady organických zásaditých solí PPi patří sůl hexylaminu, sůl dibutylaminu, sůl triethylaminu a sůl tributylaminu. Organická zásaditá sůl PPi je při reakci s UMP-DPP případně rozpuštěna v rozpouštědle. Mezi příklady rozpouštědel patří amidy jako jsou DMF, DMAC a formamid, dále cyklické ethery jako jsou dioxan a tetrahydrofuran, dále ketony jako je aceton a dále dimethylimidazolidinon, hexamethylfosfortriamid (N,N,N',N',N'',N''-hexamethyltriamid kyseliny fosforečné),

dimethylsulfoxid, acetonitril nebo směs dvou či více z nich. Do tohoto roztoku se následně přidá UMP-DPP a směs se nechá reagovat za teploty místnosti po dobu 30 minut až 5 hodin.

Krok „b) reakce UMP-DPP s organickou zásaditou solí PPI se provádí v přítomnosti zásady“ se týká reakce, která se provádí v přítomnosti zásady. Mezi příklady zásad patří pyridinové zásady jako jsou pyridin, 2,6-dimethylpyridin, 2,4-dimethylpyridin, α -, β -, γ -methylpyridin, 2,4-dimethylaminopyridin a α -, β -, γ -trimethylpyridin, přičemž zvláště výhodný je pyridin. Mezi základní (zásadité) rozpouštědla pro tuto reakci patří také zásady používané v tomto vynálezu. Koncentrace zásady není nijak zvláště omezena. Výhodné je přidat zásadu v množství 6 a více molárních ekvivalentů vztaheno na UMP, výhodněji 18 a více ekvivalentů.

Krok „c) syntetizovaný U_2P_4 se dále čistí pomocí zásady“ se týká zakalení kapaliny obsahující syntetizovaný U_2P_4 vodou a dále čištění této směsi roztokem organické a anorganické zásady jako je hydroxid sodný, amoniak, hydroxid draselný, pyridin, triethylamin nebo uhličitán sodný. Konvečně se takováto ochlazená/zakalená kapalina přímo čistí. Nicméně oproti konvenčnímu způsobu umožňuje úprava pomocí zásady zlepšení výtěžku izolování U_2P_4 .

Během čištění pomocí zásady se kapalina obsahující syntetizovaný U_2P_4 ochladí/zakalí vodou a k této směsi se přidá takové množství zásady, aby pH směsi bylo v intervalu 8 až 13, výhodně 10 až 12. Směs se nechá reagovat za teploty místnosti po dobu 10 minut až 5 hodin.

UMP-DPP se případně syntetizuje z UMP pomocí konvenčních metod. Například se trialkylaminová sůl UMP, jako je tributylaminová sůl UMP připravená pomocí konvenční metody, rozpustí v rozpouštědle. Mezi příklady rozpouštědel patří amidy jako jsou DMF a dimethylacetamid (DMAC), dále cyklické ethery jako jsou dioxan a tetrahydrofuran, dále ketony jako je aceton, a dimethylimidazolidinon, hexamethylfosfortriamid nebo jejich směsi. K roztoku se následně přidá DPC a, je-li zapotřebí, trialkylamin a směs se nechá reagovat za teploty místnosti po dobu 30 minut až 5 hodin, za vzniku UMP-DPP sloužícího jako reakční meziprodukt.

Příklady provedení vynálezu

Tento vynález je dále detailněji popsán prostřednictvím příkladů.

Příklad 1. Syntéza U_2P_4 nebo jeho soli

1) Účinek zásady

K dehydratované tributylaminové soli uridin-5'-monofosfátu (UMP-TBA) (6,2 mmol) se přidá DMAC (8 ml) a k této směsi se po kapkách za stálého míchání přidává DPC (1,7 ml). Takto získaná směs se nechá reagovat za teploty místnosti po dobu 1 hodiny za vzniku UMP-DPP. Poté se k reakční směsi přidá TBA (7,6 ml) a míchá se po dobu dalších 10 minut. Mezitím se v pyridinu (1,7 ml) rozpustí dehydratovaný TEA-PPi (3,0 mmol) a takto připravený roztok se přidá k reakční směsi UMP-DPP. Následně se tato směs míchá za teploty místnosti po dobu 3 hodin a pro zastavení reakce se do směsi přidá voda. Získaná reakční směs byla analyzována pomocí HPLC (při 262 nm) a vykázala výtěžek cíleného U_2P_4 18,3 %.

Jak je zřejmé z výsledku, nechá-li se UMP-DPP reagovat s TEA-PPi v přítomnosti zásady (pyridinu), je výtěžek syntézy U_2P_4 dvakrát vyšší, než výtěžek dosažený při konvenční metodě.

2) Účinek kombinace použití zásady a čištění použitím zásady

K dehydratované tributylaminové soli uridin-5'-monofosfátu (UMP-TBA) (6,2 mmol) se přidá DMAC (8 ml) a k této směsi se po kapkách za stálého míchání přidává DPC (1,7 ml). Takto získaná směs se nechá reagovat za teploty místnosti po dobu 1 hodiny za vzniku UMP-DPP. Poté se k reakční směsi přidá TBA (7,6 ml) a míchá se po dobu dalších 10 minut. Mezitím se v pyridinu (1,7 ml) rozpustí dehydratovaný TEA-PPi (3,0 mmol) a takto připravený roztok se přidá k reakční směsi UMP-DPP. Následně se tato směs míchá za teploty místnosti po dobu 3 hodin a pro zastavení reakce se do směsi přidá voda. K takto získané reakční směsi se přidá takové množství 30% roztoku hydroxidu sodného, aby výsledné pH bylo 11,0 a směs

se mohla nechat stát přes noc. Získaná reakční směs se analyzovala pomocí HPLC (při 262 nm) a vykázala výtěžek cíleného U_2P_4 29,7 %.

Jak je zřejmé z výsledku, nechá-li se UMP-DPP reagovat s TEA-PPI v přítomnosti zásady (pyridinu) a směs se dále čistí použitím zásady, je výtěžek syntézy U_2P_4 třikrát vyšší, než výtěžek dosažený při konvenční metodě.

3) Účinek zásady a přidávání UMP-DPP po několika částech

K triethylaminové soli dehydratované kyseliny pyrofosfátové (TEA-PPI) (6 mmol) se přidá formamid (1,5 ml) a pyridin (1,5 ml) a směs se v nádobě zamíchá. Mezitím se v jiné nádobě k dehydratované tributylaminové soli uridin-5'-monofosfátu (UMP-TBA) (12 mmol) přidá DMAC (4,3 ml), dioxan (4,8 ml) a tributylamin (TBA) (5,8 ml) a směs se zamíchá. Následně se k této směsi po kapkách přidá DPC (2,5 ml) a takto získaná směs se dále míchá za teploty místnosti po dobu 1 hodiny za vzniku UMP-DPP. Polovina reakční směsi UMP-DPP se po kapkách přidá do nádoby obsahující TEA-PPI, a nechá se reagovat za teploty místnosti po dobu 1 hodiny. Následně se k této směsi přidá pyridin (1,5 ml) a do nádoby se po kapkách přidá zbývající reakční směs UMP-DPP. Takto získaná reakční směs se nechá dále reagovat za teploty místnosti po dobu 1 hodiny a pro zastavení reakce se ke směsi přidá voda. Získaná reakční směs se analyzovala pomocí HPLC (při 262 nm) a vykázala výtěžek cíleného U_2P_4 29,5 %.

Jak je zřejmé z výsledku, přidá-li se UMP-DPP ve dvou oddělených dávkách a nechá-li se UMP-DPP reagovat s TEA-PPI v přítomnosti zásady (pyridin), je výtěžek syntézy U_2P_4 třikrát vyšší, než výtěžek dosažený při konvenční metodě. Dále je také zřejmé, že přidá-li se UMP-DPP ve dvou oddělených dávkách, je výtěžek syntézy U_2P_4 29,5 %, což je 1,6 výtěžku dosaženého v bodě 1) (18,3 %).

4) Účinek čištění použitím zásady

K triethylaminové soli dehydratované kyseliny pyrofosfátové (TEA-PPI) (6 mmol) se přidá formamid (1,5 ml) a pyridin (1,5 ml) a směs se v nádobě zamíchá. Mezitím se v jiné nádobě k dehydratované tributylaminové soli uridin-5'-monofosfátu (UMP-TBA) (12 mmol) přidá DMAC (4,3 ml), dioxan (4,8 ml) a tributylamin (TBA) (5,8 ml) a směs se zamíchá. Následně se k této směsi po kapkách přidá DPC (2,5 ml) a takto získaná

směs se dále míchá za teploty místnosti po dobu 1 hodiny za vzniku UMP-DPP. Polovina reakční směsi UMP-DPP se po kapkách přidá do nádoby obsahující TEA-PPi, a nechá se reagovat za teploty místnosti po dobu 1 hodiny. Následně se k této směsi přidá pyridin (1,5 ml) a do nádoby se po kapkách přidá zbývajících reakční směs UMP-DPP. Takto získaná reakční směs se nechá dále reagovat za teploty místnosti po dobu 1 hodiny a pro zastavení reakce se ke směsi přidá voda. K takto získané reakční směsi se přidá takové množství 30% roztoku hydroxidu sodného, aby výsledné pH bylo 11,0 a směs se mohla nechat stát přes noc. Získaná reakční směs se analyzovala pomocí HPLC (při 262 nm) a vykazovala výtěžek cíleného U_2P_4 32,2 %.

Jak je zřejmé z výsledku, čistí-li se výše uvedená směs použitím zásady, zvýší se výtěžek syntézy U_2P_4 o 10 %, tj. z 29,5 % na 32,2 %.

Příklad 2. Výroba krystalů $U_2P_4 \cdot 4Na$

K triethylaminové soli dehydratované kyseliny pyrofosfátové (TEA-PPi) (40,5 mmol) se přidá formamid (10 ml) a pyridin (15 ml) a směs se v nádobě zamíchá. Mezitím se v jiné nádobě k dehydratované tributylaminové soli uridin-5'-monofosfátu (UMP-TBA) (80 mmol) přidá DMAC (50 ml), dioxan (34 ml) a tributylamin (TBA) (30 ml) a směs se zamíchá. Následně se k této směsi po kapkách přidá DPC (17,8 ml) a takto získaná směs se dále míchá za teploty místnosti po dobu 1 hodiny za vzniku UMP-DPP. Polovina reakční směsi UMP-DPP se po kapkách přidá do nádoby obsahující TEA-PPi, a nechá se reagovat za teploty místnosti po dobu 1 hodiny. Následně se k této směsi přidá 4-dimethylaminopyridin (DMAP) (50 mg) a pyridin (15 ml) a do nádoby se po kapkách přidá zbývajících reakční směs UMP-DPP. Takto získaná reakční směs se nechá dále reagovat za teploty místnosti po dobu 1 hodiny a pro zastavení reakce se ke směsi přidá voda. Reakční směs se naředí vodou na celkový objem 700 ml a přidá se takové množství 30% roztoku hydroxidu sodného, aby výsledné pH bylo 10,0. Roztok se zakoncentruje na 200 ml a za stálého míchání se přidá ethanol (250 ml). Roztok se nechá stát za teploty 4 °C přes noc a supernatant se poté odstraní dekantací. Takto získaný roztok se naředí vodou na celkový objem

250 ml. Roztok se analyzoval pomocí HPLC (při 262 nm), která vykazala výtěžek cíleného U_2P_4 30,0 %.

Takto získaný roztok (110 ml) se naředí vodou na celkový objem 2000 ml a prolíje se sloupcem (kolonou) obsahujícím slabý anex (AMBERLITE IRA-67) (CI typ) (200 ml). Sloupec (kolona) se následně promyje vodou a vedlejší produkty se eluují roztokem kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,18 mol/l (0,18 M). Cílený U_2P_4 se poté se eluuje roztokem kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,005 mol/l (0,005 M) obsahující NaCl v množství 0,35 mol/l (procento rekuperace: 82,7 %).

Do takto získaného eluátu se přidá takové množství roztoku hydroxidu sodného, aby výsledné pH bylo 2,5. Eluát se následně prolíje sloupcem (kolonou) obsahující aktivní uhlí (Taiko SGP) a sloupec (kolona) se promyje vodou a eluuje roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 0,05 mol/l (0,05 M) (procento rekuperace: 84,9 %).

Hodnota pH takto získaného eluátu se upraví na 7,6 a eluát se zakoncentruje na 38 ml. K zakoncentrovanému roztoku se přidá následně ethanol (57 ml), což vede ke vzniku 3,1 g krystalů $\text{U}_2\text{P}_4 \cdot 4\text{Na}$ (obsah vody: 7,8 %) (výtěžek separace: 18,4 %).

Fyzikální vlastnosti krystalů $\text{U}_2\text{P}_4 \cdot 4\text{Na}$

Krystaly $\text{U}_2\text{P}_4 \cdot 4\text{Na}$ připravené v Příkladu 2 se suší za teploty 60 °C po dobu 4 hodin v sušárně s nuceným oběhem vzduchu. Takto upravené krystaly byly podrobeny instrumentální analýze. Kromě toho se připraví $\text{U}_2\text{P}_4 \cdot 4\text{Na}$ v lyofilizované formě, a to stejnou metodou jako je popsána v Příkladě 1 ve WO 99/05155. Takto připravený výrobek se porovnal s krystaly z hlediska jejich fyzikálních vlastností.

(1) Instrumentální analýza

1) Analýza čistoty

Krystaly $\text{U}_2\text{P}_4 \cdot 4\text{Na}$ získané v Příkladu 2 a frakce obsahující U_2P_4 po přečištění pomocí obou chromatografií byly podrobeny analýzám čistoty použitím vysoce výkonné kapalinové chromatografie (HPLC). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1. Podmínky analýzy prováděné vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií jsou popsány níže.

Sloupec (Kolona): HITACHIGEL #3013-N (výrobek firmy Hitachi Keisokuki Service).

Eluent: 10% CH_3CN , NH_4Cl o koncentraci 0,18 mol/l (0,18 M), KH_2PO_4 o koncentraci 0,03 mol/l (0,03 M), K_2HPO_4 o koncentraci 0,03 mol/l (0,03 M).

Metoda detekce: UV detekce při 262 nm.

Tabulka 1

U_2P_4 a jeho analogy	Podíly látek (v % hmotnostních)			
	Reakční směs	Po průchodu sloupcem s anexem	Po průchodu sloupcem s aktivním uhlím	Po krystalizaci
UMP	7,5	0,5	0,3	(-)
U_2P_2	29,8	0,4	(-)	(-)
UDP	2,5	0,1	0,2	0,1
U_2P_3	17,6	0,2	(-)	(-)
UTP	13,0	0,8	0,4	0,1
U_2P_4	21,0	97,9	98,6	99,8
UP_4	7,3	(-)	(-)	(-)

(-): Pod mezí detekce.

2) Obsah vody

Krystaly $\text{U}_2\text{P}_4 \cdot 4\text{Na}$ byly podrobeny měření obsahu vody pomocí metody Karla Fischera. Ta ukázala, že krystaly obsahují 5 až 15 % hmotnostních vody, v závislosti na stupni sušení. Z výsledků je zřejmé, že na jedné molekule U_2P_4 je navázáno nebo adherováno 3 až 8 molekul vody.

3) Teplota tání

Krystaly $\text{U}_2\text{P}_4 \cdot 4\text{Na}$ byly podrobeny měření teploty tání pomocí konvenční metody. Ta ukázala, že rozkladná teplota krystalů je 223 °C. Rozkladná teplota lyofilizovaného výrobku byla 220 °C.

4) Rentgenová difrakce

Krystaly $\text{U}_2\text{P}_4\cdot 4\text{Na}$ byly podrobeny měření rentgenové difrakce pomocí rentgenového přístroje (Model: RINT2500V, výrobek firmy Rigaku Denki) za následujících podmínek. Takto získané rentgenové difrakční spektrum je zobrazeno na Obrázku 1 a 2, a data popisující píky jsou uvedena v Tabulce 2 a 3.

Tabulka 2

číslo píku	2θ (°)	Relativní intenzita (I/I_0)
1	5,96	100
5	11,58	38
6	12,42	79
10	15,42	48
13	17,18	45
15	18,04	55
16	19,86	84
17	20,56	73
18	21,18	51
19	21,40	51
25	25,22	42
29	27,52	45
30	27,98	47
35	30,60	40

(Podmínky měření)

Rentgenka: Cu-K α

Výkon (výstup) rentgenu: 50 kV - 300 mA

Rychlost skenování (snímání): 4,0° za minutu

Interval skenování (snímání): 0,02°

Rozmezí měřených úhlů: 2 až 40°

Štěrbina: DS - 0,5°, RS - 0,15 mm, SS - 0,5°

Předčištění: Rozmělnění v achátovém hmoždíři

Tabulka 3

číslo píku	2 θ (°)	Relativní intenzita (I/I ₀)
1	5,96	100
5	11,56	41
6	12,42	90
10	15,42	51
12	17,18	48
14	18,04	63
15	19,86	90
16	20,58	90
17	21,20	56
18	21,42	59
24	25,20	50
29	27,54	56
30	27,96	57
35	30,60	48

Na Obrázku 1 a v Tabulce 2 jsou data pro krystaly tetrahydrátu $U_2P_4 \cdot 4Na$ a na Obrázku 2 a v Tabulce 3 jsou data pro krystaly oktahydrátu $U_2P_4 \cdot 4Na$. Na Obrázku 3 je dále zobrazeno rentgenové difrakční spektrum lyofilizovaného výrobku.

5) Hygroskopicitá

Krystaly $U_2P_4 \cdot 4Na$ (oktahydrátu) obsahující 14 % vody se nechaly stát po dobu 9 dnů za následujících podmínek: a) 25 °C a relativní vlhkosti 57 %, b) 25 °C a relativní vlhkosti 75 % a c) 40 °C a relativní vlhkosti 75 %. V žádném ze tří výše uvedených

případů nebyl zaznamenán žádný rozklad ani změna hmotnosti. Bylo prokázáno, že krystaly jsou stabilní a nemají hygroskopicitu. Krystaly $\text{U}_2\text{P}_4 \cdot 4\text{Na}$ (tetrahydrátu) obsahující 8 % vody se nechaly stát po dobu 9 dnů za podmínek: 40 °C a relativní vlhkosti 75 %. V tomto případě se obsah vody zvýšil na 14 až 15 %. Obsah vody se dále nicméně již nezvýšil a krystaly tak byly stabilizovány.

Pokud se pro srovnání nechal stát lyofilizovaný výrobek (výchozí obsah vody: 1 %) po dobu 9 dnů za podmínek 40 °C a relativní vlhkosti 75 %, obsah vody se postupně zvyšoval a již po sedmi dnech stání připomínal výrobek díky delikvescenci (vlhnutí) bláto.

6) Stabilita

Krystaly $\text{U}_2\text{P}_4 \cdot 4\text{Na}$ (oktahydrátu) a lyofilizovaný výrobek se umístily do samostatných nádob, které se poté těsně uzavřely a nechaly se stát po dobu 13 dní za teploty 60 °C (akcelerační test). Zatímco u krystalů nebyl pozorován žádný rozklad, u lyofilizovaného výrobku byl částečný rozklad potvrzen snížením čistoty $\text{U}_2\text{P}_4 \cdot 4\text{Na}$ o 1,4 %.

7) Krystalická forma

Na Obrázku 4 je fotografie typické krystalické formy krystalů $\text{U}_2\text{P}_4 \cdot 4\text{Na}$ (oktahydrátu).

8) IČ absorpční spektra

Pro krystaly $\text{U}_2\text{P}_4 \cdot 4\text{Na}$ (oktahydrát) a pro lyofilizovaný výrobek byla obvyklým způsobem měřena IČ spektra pomocí JASCO 5000 Spektrofotometru. Výsledky jsou zobrazeny na Obrázcích 5 a 6. Lyofilizovaný výrobek $\text{U}_2\text{P}_4 \cdot 4\text{Na}$ vykazuje píky při 3416, 1702, 1266, 1116, 1079 a 906 cm^{-1} (viz. Obrázek 6), zatímco krystaly $\text{U}_2\text{P}_4 \cdot 4\text{Na}$ vykazují píky při 3386, 1690, 1277, 1233, 1146, 1116 a 890 cm^{-1} (viz. Obrázek 5).

Příklad 3. Výroba krystalů oktahydrátu $U_2P_4 \cdot 4Na$

Frakce obsahující U_2P_4 získaná úpravou pomocí sloupce (kolony) v Příkladě 2 se zakoncentruje na kaši a její pH se pak upraví na 7,0. Ke kaši se za stálého míchání přidá methanol a během dalšího míchání se kaše ochladí na 10 °C, což vede k vysrážení krystalů $U_2P_4 \cdot 4Na$.

Takto získané a sušené krystaly $U_2P_4 \cdot 4Na$ byly podrobeny analýze obsahu vody metodou Karla Fischera. Bylo zjištěno, že se jedná oktahydrát. Rentgenové difrakční spektrum těchto krystalů je zobrazeno na Obrázku 7, a odpovídající data píků jsou uvedena v Tabulce 4.

Tabulka 4

číslo píku	2θ (°)	Relativní intenzita (I/I_0)
1	5,96	100
5	11,58	30
6	12,42	77
8	15,40	50
10	17,20	38
11	18,04	38
12	19,84	82
13	20,62	66
14	21,42	48
19	25,38	36
23	27,58	39
24	27,98	37
30	30,64	33

Průmyslová využitelnost

Krystaly U_2P_4 nebo krystaly jeho soli získané způsobem podle tohoto vynálezu dosahují vysoké čistoty a stability a v porovnání s lyofilizovaným výrobkem vykazují nižší hygroskopicitu. Proto slouží jako užitečný surový materiál pro přípravu farmaceutických přípravků.

Způsob výroby U_2P_4 nebo jeho soli podle tohoto vynálezu dává vyšší výtěžek a umožňuje syntézy ve velkém měřítku.

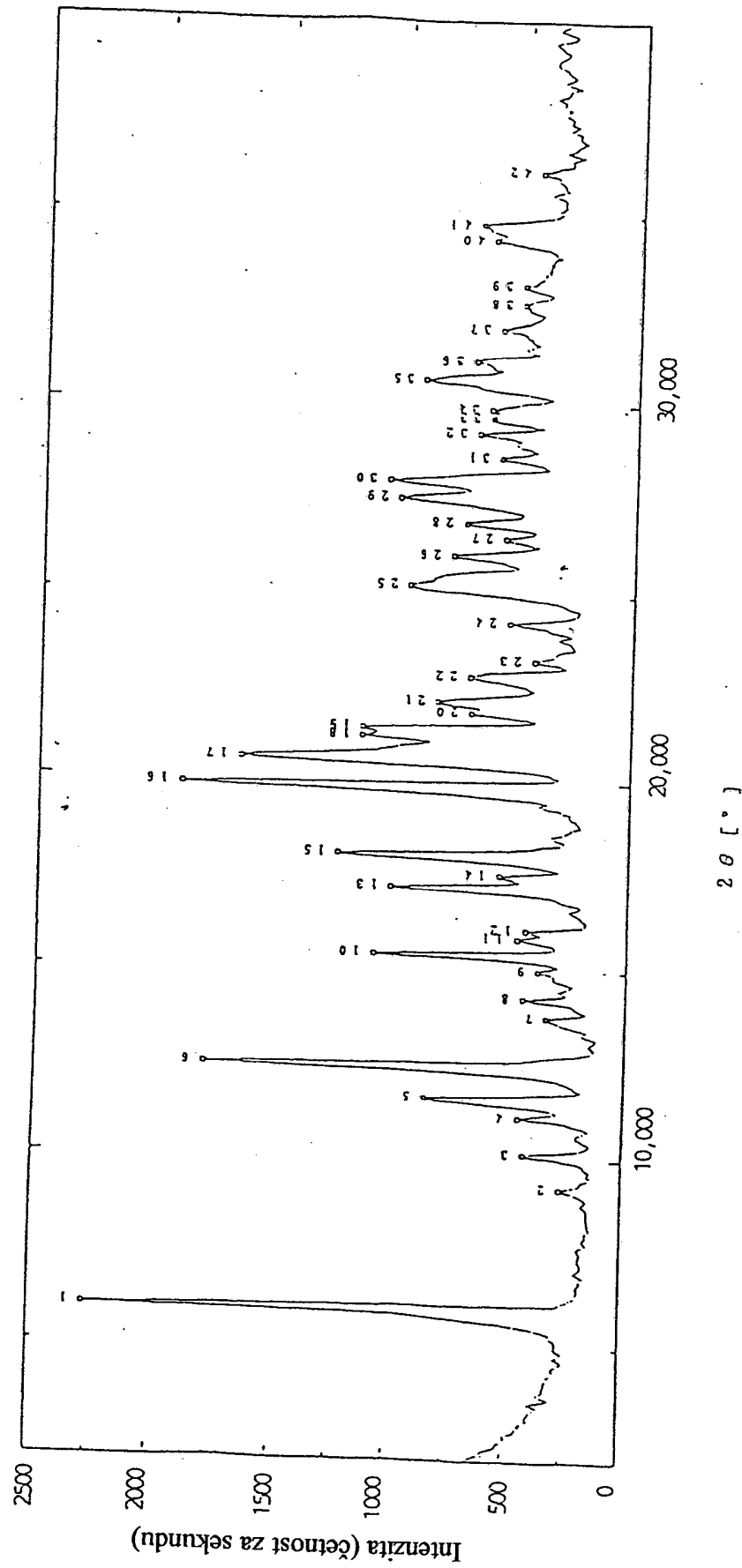
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Krystaly P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu nebo krystaly jeho soli.
2. Krystaly P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu nebo krystaly jeho soli, které dosahují čistoty alespoň 95 %.
3. Krystaly P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu nebo krystaly jeho soli, které dosahují čistoty alespoň 97 %, a které obsahují maximálně 1 % uridin-5'-trifosfátu a maximálně 1 % uridin-5'-difosfátu.
4. Způsob výroby krystalů P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu nebo krystalů jeho soli v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e se surový P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfát nebo jeho sůl čistí pomocí anexové chromatografie a chromatografie na aktivním uhlí, a že se dále k roztoku čištěného P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu nebo jeho soli přidá hydrofilní organické rozpouštědlo, což vede k vysrážení krystalů z roztoku.
5. Způsob výroby P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu nebo jeho soli podle nároku 6 v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e se čištění provádí anexovou chromatografií následovanou chromatografií na aktivním uhlí.
6. Způsob výroby P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu nebo jeho soli z uridin-5'-monofosfátu sloužícího jako výchozí látka reakcí s difenyl-chlorfosfátem a pyrofosfátem v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e se provede alespoň jeden z následujících kroků čištění:
 - a) během reakce UMP-DPP s organickou zásaditou solí PPi se po částech přidává difenylfosfát UMP,
 - b) reakce UMP-DPP s organickou zásaditou solí PPi se provádí v přítomnosti zásady a
 - c) syntetizovaný U_2P_4 se dále čistí použitím zásady.

7. Způsob výroby P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu nebo jeho soli podle nároku 8 vyznačující se tím, že se provedou následující kroky:
- a) během reakce UMP-DPP s organickou zásaditou solí PPi se po částech přidává difenylfosfát UMP,
 - b) reakce UMP-DPP s organickou zásaditou solí PPi se provádí v přítomnosti zásady a
 - c) syntetizovaný U_2P_4 se dále čistí použitím zásady.
8. Krystaly tetrasodné soli P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu.
9. Krystaly hydrátu tetrasodné soli P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu, které obsahují 3 až 8 molekul vody navázaných nebo adherovaných na jedné molekule tetrasodné soli P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu.
10. Krystaly hydrátu tetrasodné soli P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu, které obsahují 4 molekuly vody navázané nebo adherované na jedné molekule tetrasodné soli P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu.
11. Krystaly hydrátu tetrasodné soli P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu, které obsahují 8 molekul vody navázaných nebo adherovaných na jedné molekule tetrasodné soli P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu.
12. Krystaly tetrasodné soli P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu, které dosahují čistoty alespoň 95 %.
13. Krystaly tetrasodné soli P^1, P^4 -di(uridin-5'-)tetrafosfátu, které dosahují čistoty alespoň 97 %, a které obsahují maximálně 1 % uridin-5'-trifosfátu a maximálně 1 % uridin-5'-difosfátu.

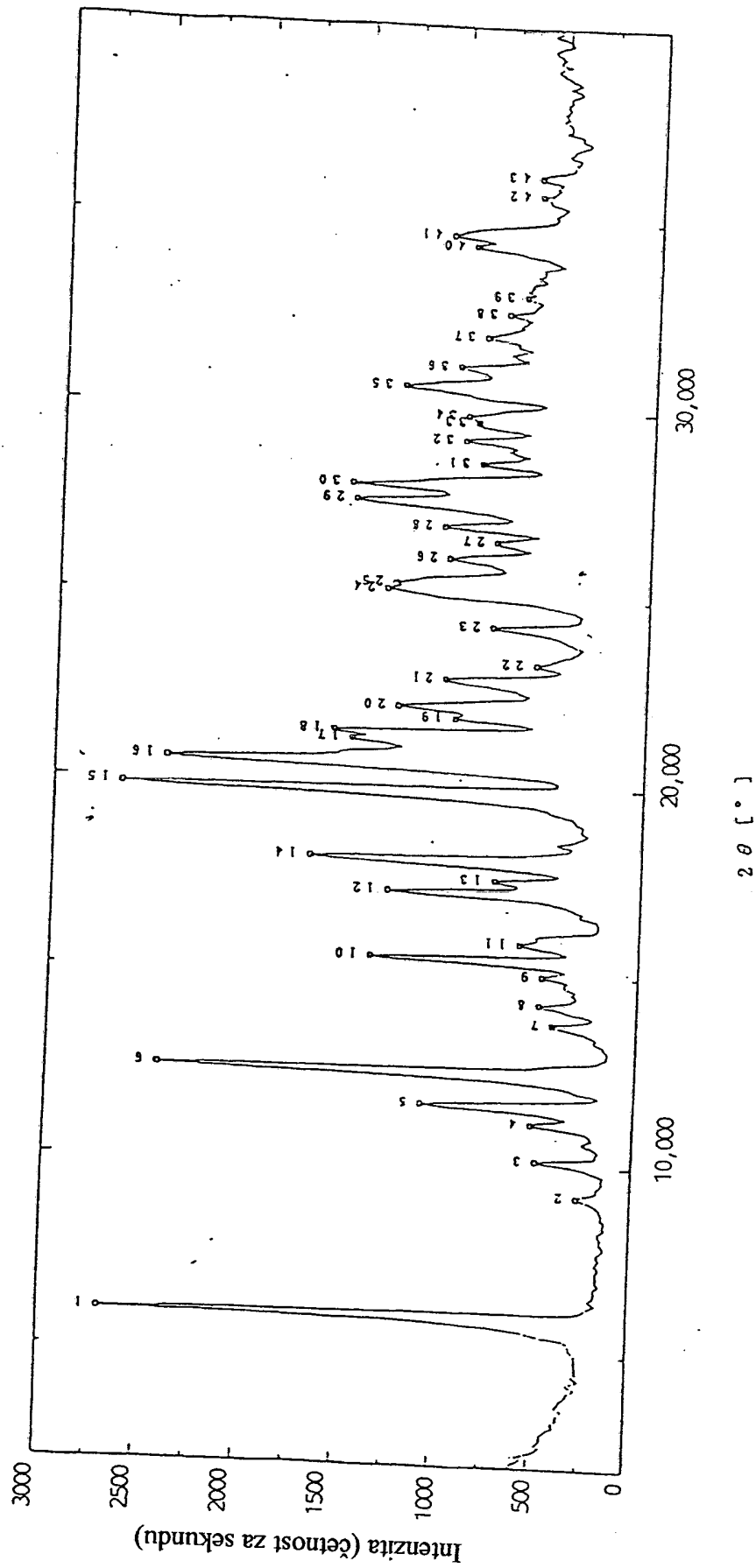
PV 2001 - 1028
21.05.01

Obr. 1



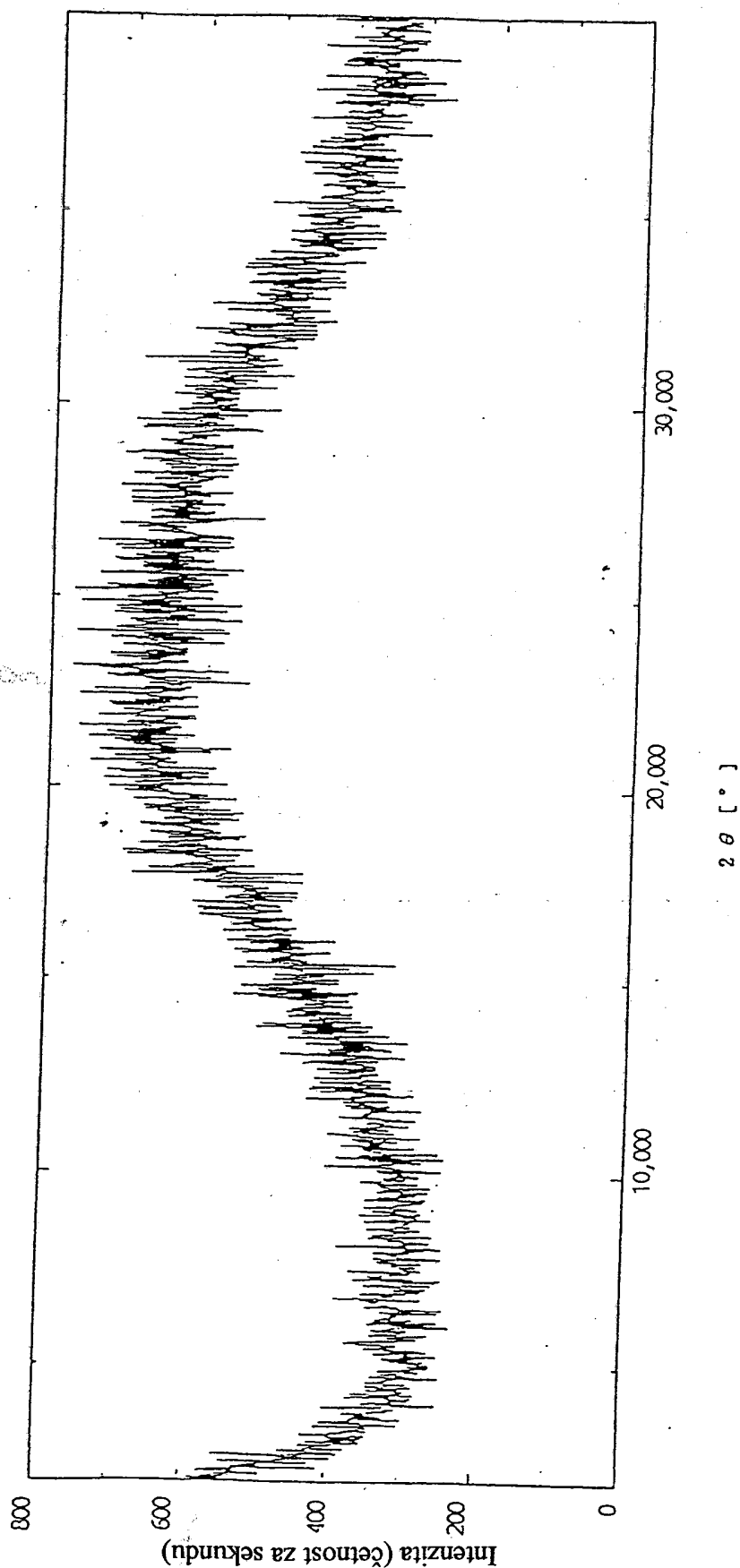
21.05.01

Obr. 2



21.05.01

Obr. 3



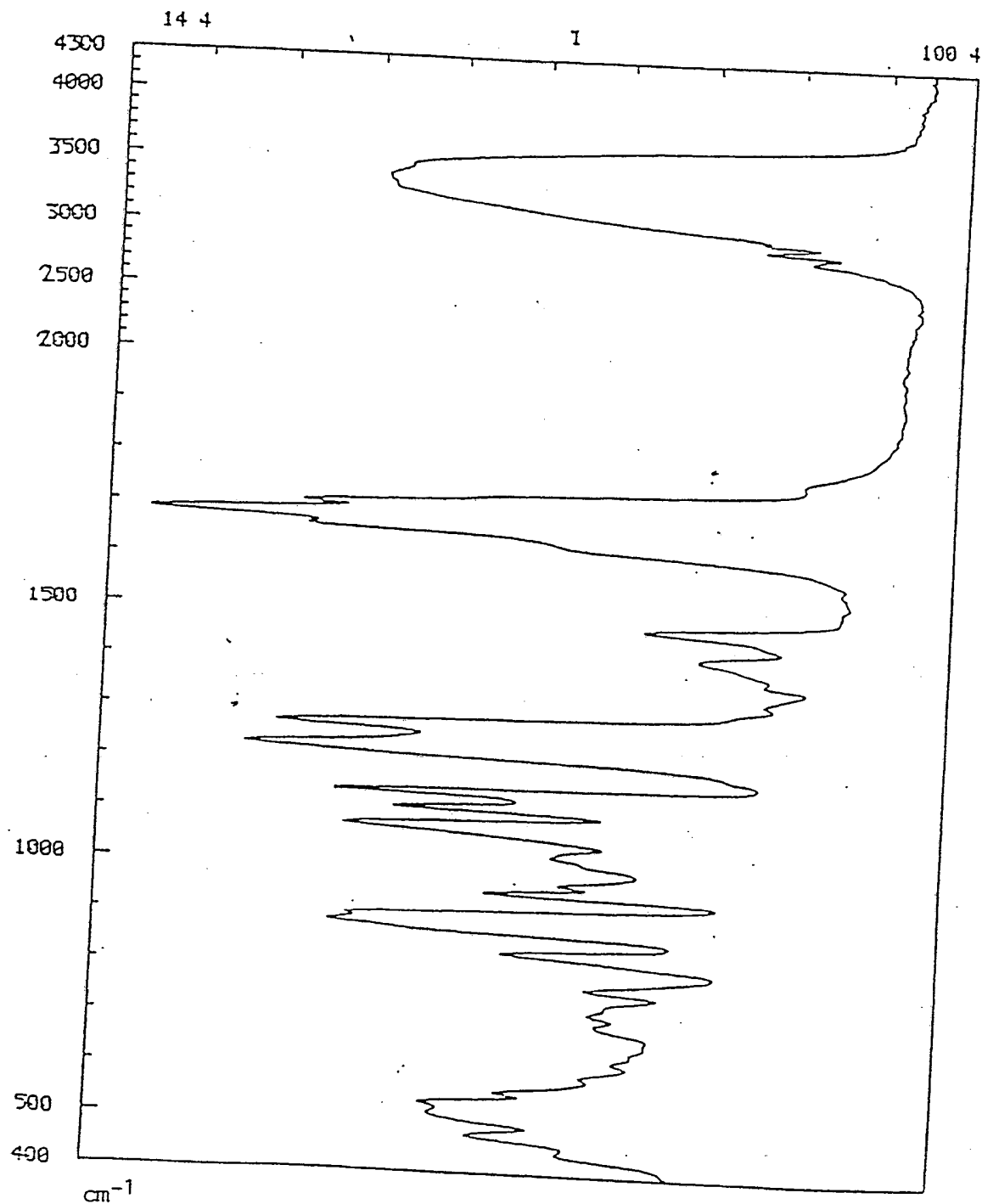
21.05.01

Obr. 4



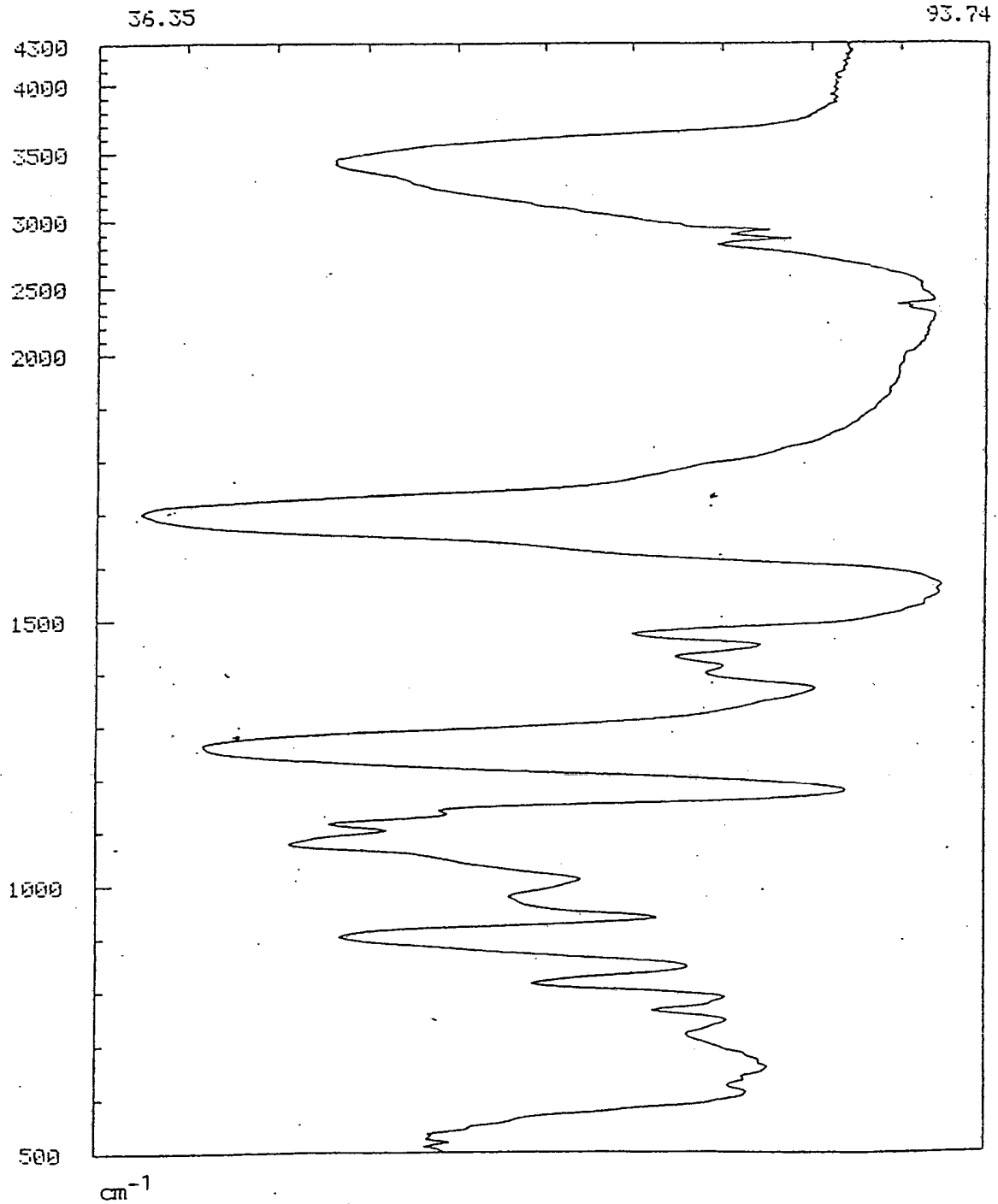
21.05.01

Obr. 5



21.05.01

Obr. 6



21.05.01

Obr. 7

