

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 4716

(13) Druh dokumentu: **A3**

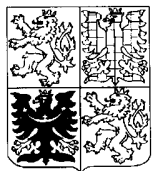
(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 P 41/00

C 12 P 13/00

C 07 D 209/52

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.08.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.08.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9717928**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.06.2000**
(Věstník č. 6/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/05291**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/10519**

(71) Přihlašovatel:

GLAXO GROUP LIMITED, Greenford,
GB;

(72) Původce:

Dawson Michael John, Stevenage, GB;
Mahmoudian Mahmoud, Stevenage, GB;
Wallis Christopher John, Stevenage, GB;

(74) Zástupce:

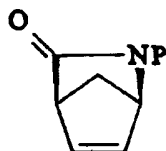
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1,
110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob výroby laktamů s vysokou
enantiomerní čistotou**

(57) Anotace:

Způsob výroby laktamů s vysokou enantiomerní čistotou vzorce (IV), kde P je aktivační a ochranná skupina, které jsou meziprodukty při výrobě abacaviru, z racemických směsí působením acylázového enzymu, výhodně odvozeného z *Bacillus* sp., na tyto směsi.



(IV)

CZ 1999 - 4716 A3

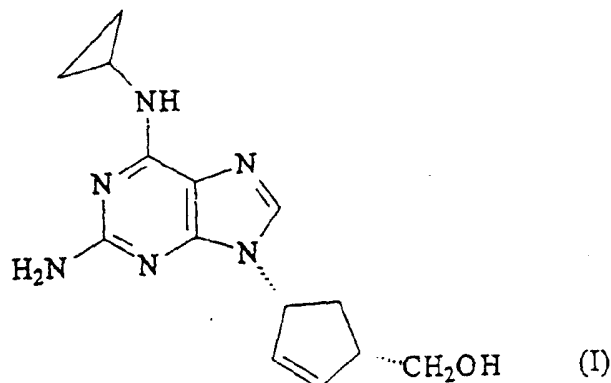
Způsob výroby laktamů s vysokou enantiomerní čistotou

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu výroby enantiomerně obohacených N-derivatizovaných (1R,4S)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onů.

Dosavadní stav techniky

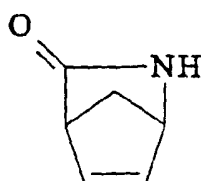
Abacavir, 2-aminopurinový nukleosidový analog následující struktury vzorce (I)



známý z EP 0434 450 má vysokou účinnost proti viru lidské imunodeficiency (HIV) a viru hepatitidy B (HBV).

Existuje potřeba syntetizovat velká množství abacaviru pro klinické pokusy. V budoucnosti, jakmile by byl abacavir schválen národními úřady pro kontrolu léčiv, budou také zapotřebí velká množství abacaviru pro farmaceutické prostředky pro léčení infekcí HIV.

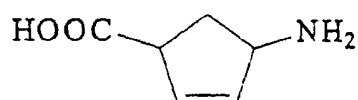
Důležitý krok při výrobě abacaviru je výroba enantiomerně čistého substituovaného cyklopentenového kruhu. Dosavadní známé metody vycházejí z laktamu vzorce (II)



(II)

5

EP-A-0424064 popisuje způsob, kdy může racemický laktam (II) vyrobený reakcí cyklopentadienu s tosylkyanidem reagovat s laktamázami, které poskytnou jediný *cis* enantiomer nebo směs *cis* enantiomerů, která je obohacená vzhledem k jednomu z enantiomerů,
10 nebo sloučeninu s otevřeným kruhem (III)



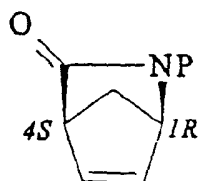
(III)

15

spolu s nezreagovaným laktamem, který je enantiomerně obohacený vzhledem k jednomu nebo druhému enantiomeru.

Autoři vynálezu nyní vyvinuli způsob výroby v podstatě enantiomerně čistých meziproduktů vzorce (IV)

20



(IV)

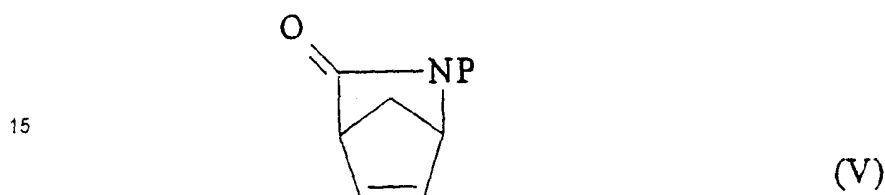
25

kde P je aktivační a ochranná skupina, z jejich racemátů, přičemž tento způsob poskytuje vysoké výtěžky při nízkých nákladech.

Podstata vynálezu

Autoři vynálezu zjistili, že derivace laktamového dusíkového atomu ve sloučenině vzorce (II) skupinou P (jako ve vzorci (V) níže) aktivuje laktamovou vazbu pro hydrolýzu. Autoři překvapivě zjistili, že pro výrobu sloučenin vzorce (IV) mohou být použity enzymy, které jsou dostupnější než enzymy popisované v EP-A-0424064, a u kterých se zdá, že za normálních podmínek nevykazují žádnou aktivitu vůči laktamu vzorce (II) popsanému v EP-A-0424064.

Podle jednoho provedení předkládaného vynálezu se proto poskytuje způsob enantiomerního dělení racemické směsi N-chráněného ($\pm$) 2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu (V)



kde P je aktivační a ochranná skupina,

pro získání v podstatě enantiomerně čistého N-chráněného (1R,4S)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu (IV) působením enzymu ze skupiny acyláz na směs.

Podle dalšího provedení předkládaného vynálezu se poskytuje způsob výroby v podstatě enantiomerně čistého N-chráněného (1R,4S)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu (IV) výše, kde P je aktivační a ochranná skupina, při kterém se na racemickou směs N-chráněného ($\pm$)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu (V) výše, kde P je aktivační nebo ochranná skupina, působí enzymem ze skupiny acyláz,

a nezreagovaný enantiomer vzorce (IV) se z reakční směsi izoluje běžnými způsoby.

Výhodné je, jestliže aktivační/ochranná skupina je acylová nebo substituovaná oxykarbonylová skupina. Mezi výhodné acylové skupiny patří formylová nebo nižší alkanoylová (který má například v alkylové části 1 až 4 atomy uhlíku), zvláště acetylová skupina. Výhodnými substituovanými oxykarbonylovými skupinami budou skupiny vzorce ROC(O)-, kde R může být alkylová nebo aralkylová skupina. Výhodná alkylová skupina je *terc*-butyl. Možnou aralkylovou skupinou je benzyl.

Protože autoři často zjišťovali, že ve vodném prostředí může docházet v podstatné míře k odštěpování ochranných skupin z těchto acylovou skupinou chráněných sloučenin, je výhodné, jestliže se reakce provádí ve směsi organického rozpouštědla a vody. Výhodné je používat organická rozpouštědla mísitelná s vodou, jako jsou cyklické ethery, například tetrahydrofuran nebo 1,4-dioxan. Pro minimalizaci odštěpování ochranné skupiny je výhodné používat méně než 70 % objemových vody, výhodněji přibližně 50 % objemových nebo méně. Jako nejvhodnější se ukázala směs tetrahydrofuranu a vody v poměru přibližně 50 : 50 objemových.

Při použití výše popsaným způsobem může reakce obecně probíhat v jedné fázi. Není však žádný důvod, proč by nemělo být také úspěšné použití organického rozpouštědla, jako například aromatických uhlovodíků, pro vytvoření dvojfázového systému.

Po ukončení reakce může být nezreagovaný a v podstatě enantiomerně čistý N-chráněný (1R,4S)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-on vzorce (IV) izolován z reakční směsi běžnými způsoby, jako je například extrakce rozpouštědly.

Byl nalezen velký počet acylázových enzymů, které enantioselektivně hydrolyzují laktamovou vazbu takovým způsobem, že zůstane požadovaný izomer. Autoři vynálezu našli enzymy odvozené od *Bacillus* sp. zvláště proto, aby ukázali správný profil

účinnosti. Například *Subtilisin carlsberg* (ALTUS) poskytuje N-
chráněný (1R,4S)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-on [(IV), P = *terc*
butyloxykarbonyl] z racemické směsi (V) v enantiomerním přebytku
73 %. Mezi další enzymy patří proteáza *Bacillus* sp., Neutrased,
5 Novozyme 243, Alcalase a Savinase, které jsou dostupné od firmy
ALTUS a NOVO. Mohou být také použity enzymy z jiných zdrojů, které
způsobují enantioselektivní hydrolyzu, jako je esteráza prasečích
ledvin (ALTUS), vepřová pankreatická lipáza (Biocatalysts), Flavorpro-
192 (peptidáza, Biocatalysts), Flavorpro-373 (glutamináza,
10 Biocatalysts), Promod-TP (endopeptidáza, Biocatalysts), lipáza-CE
(*Humicola lanuginosa*, Amano), proteáza-M (*Aspergillus* sp., Amano),
prozyme-6 (*Aspergillus* sp., Amano), lipáza PEG (telecí slinná žláza,
Amano) a acyláza *Aspergillus* sp. (Sigma).

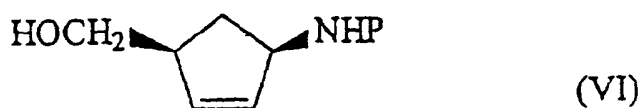
S výhodou se použije komerčně dostupný acylázový enzym
15 Savinase (NOVO), protože bylo zjištěno, že právě tento enzym má
rychlosti biologické přeměny N-chráněného (1S,4R)-2-
azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu vhodné pro použití v průmyslovém
měřítku. Savinase je proteolytický enzym připravovaný submerzní
fermentací alkalofilního druhu *Bacillus*. Jde o endoproteázu
20 serinového typu. V testech prováděných autory vynálezu tento enzym
při normálním použití neměl schopnost hydrolyzovat racemickou směs
neacylovaného laktamu vzorce (II).

Biologická přeměna N-chráněného (1S,4R)-2-
azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu se bude vhodně provádět v rozmezí
25 pH 6 až 11, s výhodou 7 až 9. Bude se s výhodou používat teploty
v rozmezí 20 až 50 °C. Nejvýhodnější je provádět tento způsob při pH
přibližně 8 a teplotě přibližně 30 °C. Hmotnostní poměr přípravku
Savinase:substrát v rozmezí od 1:1 do 10:1, například od 2:1 do 5:1
poskytuje čistou, rychlou reakci. Optimální poměr pro daný enzym je
30 možno snadno určit jednoduchým experimentem.

Výchozí sloučeniny vzorce (V), ve kterých P je *terc* butoxykarbonyl, mohou být připraveny z odpovídajícího racemického laktamu vzorce (II) způsoby analogickými se způsoby popsány v Taylor a další, Tet. Asymmetry, 4, str. 1117 (1993). Sloučeniny
5 vzorce (V), ve kterých P znamená formyl nebo nižší alkanoyl, mohou být připraveny z odpovídajícího nechráněného racemického laktamu vzorce (II) způsoby popsány v T. W. Greene, „Protective Groups in Organic Synthesis“, Wiley, New York, 1981, str. 218 - 287 a J. F. W. McOmie, „Protective Groups in Organic Chemistry“, Plenum Press,
10 New York, 1973, str. 43 - 49, nebo analogickými způsoby.

Sloučenina vzorce (IV) může být snadno převedena na odpovídající N-chráněnou aminokyselinu hydrolýzou. N-chráněná aminokyselina může být snadno převedena na odpovídající aminoalkohol vzorce (VI)

15



činnidly schopnými převádět karboxylové kyseliny na alkoholy,
20 například lithiualuminiumhydridem nebo boranem. Alternativně je možno sloučeninu vzorce (IV) přímo převést na odpovídající aminoalkohol s otevřeným kruhem (VI) použitím borohydridu sodného způsoby popsány v Tet. Asymm., 4, str. 1117 (1993).

Následující příklady jsou zamýšleny jako ilustrační a nemají
25 nijak omezovat rozsah vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Na schopnost enantioselektivně hydrolyzovat laktamovou vazbu
(±) *tert* butyl-3-oxo-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-2-karboxylátu [(V), P
5 = *tert* butyloxykarbonyl] bylo systematicky testováno několik
hydrolytických enzymů. Reakce byly prováděny při pokojové teplotě
v magneticky míchaných skleněných nádobách (pracovní objem 4 ml)
s obsahem racemické sloučeniny s koncentrací 1 mg/ml v 50 %
tetrahydrofuranu:50 % fosfátovém pufru (objemový poměr) (50 mM
10 pH 7) při pokojové teplotě. Všechny enzymy byly přidávány pro
dosažení konečné koncentrace 25 mg/ml. To představuje hmotnostní
poměr enzymu ku substrátu 25:1, který by měl pro účely průzkumu
detekovat jakoukoliv případnou hydrolytickou aktivitu. Baňky bez
přidaného enzymu sloužily jako kontroly. Vzorky byly periodicky
15 odstraňovány a ředěny vodou v poměru 1:2 před analýzou HPLC.

Podmínky HPLC

Kolona: Spherisorb C6 (15 x 0,46 cm)
Izokratický systém při pokojové teplotě s průtokem 1 ml/min
20 Mobilní fáze: 30 % (objem/objem) acetonitrilu s obsahem 0,1 %
(objem/objem) kyseliny mravenčí.
Vlnová délka detekce 200 nm.

Bylo ukázáno, že chemická hydrolýza (±) *tert* butyl-3-oxo-2-
25 azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-2-karboxylátu byla za těchto reakčních
podmínek zanedbatelná. Zdálo se, že několik enzymů hydrolyzuje
racemickou sloučeninu enantioselektivně za získání (-) (1R,4S) *tert*
butyl-3-oxo-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-2-karboxylátu, jak bylo
prokázáno negativním znaménkem otáčení chirálního analyzátoru
30 (HPLC detektor optické otáčivosti). Pro další výzkumy byl použit

enzym Savinase. Reakční směs s obsahem přibližně 50 % výchozího materiálu byla analyzována chirální HPLC a zbylý laktam měl podle měření enantiomerní přebytek 96,3 %.

Navíc měl zbylý substrát správnou absolutní konfiguraci pro syntézu abacaviru.

Chirální HPLC

Kolona: Chiracel OD-H (25 x 0,46 cm)

Izokratický systém při 5 °C a průtoku 0,5 ml/min

Mobilní fáze: směs 2 % (objem/objem) izopropylalkohol/heptan

Vlnová délka detekce: 205 nm

Srovnávací příklad 1

Roztok s obsahem racemického laktamu ($\pm$) 2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu (II) s koncentrací 1 mg/ml (pracovní objem 4 ml) byl vystaven působení enzymu Savinase (firmy NOVO) (25 mg/ml) ve směsi 50 % tetrahydrofuran:50 % fosfátový pufr (50 mM, pH 7). Baňka bez přidaného enzymu sloužila jako kontrola. Periodicky byly odebírány vzorky a ředěny v poměru 1:2 vodou před analýzou HPLC.

HPLC

Kolona: Spherisorb C6 (15 x 0,46 cm)

Izokratický systém při pokojové teplotě s průtokem 1 ml/min

Mobilní fáze: 4 % (objem/objem) acetonitrilu s obsahem 0,1 % (objem/objem) kyseliny mravenčí.

Vlnová délka detekce 200 nm.

Po čtyřech dnech inkubace při pokojové teplotě nenastala žádná reakce.

Příklad 2

5 Enzym Savinase (30 g, NOVO) byl přidán k roztoku (500 ml) obsahujícímu 10 g racemického ($\pm$) *terc* butyl-3-oxo-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-2-karboxylátu [(V), P = *terc* butyloxykarbonyl] v poměru 50:50 (objem/objem) tetrahydrofuran/50 mM fosfát při pH 8,0 a teplotě 30 °C. Reakce byla
10 monitorována chirální HPLC až 2 dny.

Po ukončení reakce (přibližně 51 % konverze, enantiomerní přebytek (-) (1R,4S) *terc* butyl-3-oxo-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-2-karboxylátu > 99,8 %) byl enzym odfiltrován a pH vyčereného roztoku bylo zvýšeno roztokem hydrogenuhličitanu sodného na 9. Roztok byl
15 extrahován třikrát 200 ml cyklohexanu. Spojená organická fáze byla zpětně extrahována 100 ml roztoku hydrogenuhličitanu sodného a potom promyta 100 ml roztoku soli. Odpaření a sušení poskytlo volně sypkou bílou látku (4,2 g, 84 % teoretického izolovaného výtěžku). Tato látka byla identifikována pomocí NMR jako (-) (1R,4S)
20 *terc* butyl-3-oxo-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-2-karboxylát; enantiomerní přebytek byl zjištěn chirální HPLC > 99,8 %.

Chirální HPLC

Kolona: Chiracel OD-H (25 x 0,46 cm)
25 Izokratický systém, 0,5 ml/min
Mobilní fáze: 2 % (objem/objem) izopropylalkohol/heptan
Vlnová délka detekce 205 nm
Teplota 5 °C

Příklad 3

Roztok výše uvedeného (-) (1R,4S) *terc* butyl-3-oxo-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-2-karboxylátu (3,5 g) v tetrahydrofuranu (10 ml) byl přidán k suspenzi borohydridu sodného (1,27 g) v methanolu (10 ml) a směs byla míchána při přibližně 20 °C po dobu
5 přibližně 18 hod. Bylo přidáno další množství tetrahydrofuranu (10 ml) a borohydridu sodného (1,27 g) a míchání pokračovalo ještě přibližně další 2 hodiny. Opatrně byla přidána 2 M kyselina chlorovodíková (30 ml) a potom toluen (20 ml). Tyto dvě vrstvy byly odděleny a vodná
10 vrstva byla dále extrahována toluenem (2 x 25 ml). Spojené organické extrakty byly promyty roztokem soli (20 ml), sušeny nad síranem sodným a odpařeny za získání *terc* butylesteru kyseliny (1R,4S) (4-hydroxymethyl)-cyklopent-2-en-1-yl karbamové (3,23 g) s enantiomerním přebytkem zjištěným chirální HPLC 99,2 % jako
15 bleděžluté gummy, která byla spektroskopicky a chromatograficky identická s autentickým vzorkem sloučeniny.

Chirální HPLC

Kolona: Chiracel OD-H (25 x 0,46 cm)
20 Průtok: 1,0 ml/min
Mobilní fáze: 3 % (objem/objem) izopropylalkohol/heptan
Vlnová délka detekce 205 nm
Teplota 35 °C

Příklad 4

Savinase byla testována na schopnost enantioselektivně hydrolyzovat laktamovou vazbu racemického cis-2-acetyl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu. Reakce byla prováděna v magneticky míchané skleněné nádobce (pracovní objem 4 ml)
30 obsahující 1 mg/ml substrátu ve směsi 50 % tetrahydrofuran:50 %

fosfátový pufr (objem/objem) (50 mM, pH 7) při pokojové teplotě. Reakce byla nastartována přidáním enzymu Savinase až do dosažení konečné koncentrace 25 mg/ml. Nádobka bez přidaného enzymu byla použita jako kontrola. Periodicky byly odebírány vzorky a před
5 analýzou HPLC ředěny vodou v poměru 1:2.

HPLC

Kolona: Spherisorb C6 (15 x 0,46 cm)
Izokratický systém při teplotě 20 °C s průtokem 1 ml/min
10 Mobilní fáze: 5 % (objem/objem) acetonitrilu s obsahem 0,1 %
(objem/objem) kyseliny mravenčí.
Vlnová délka detekce 210 nm.

Chirální HPLC

15 Kolona: Chiralpak AD (25 x 0,46 cm)
Izokratický systém při 20 °C s průtokem 1 ml/min
Mobilní fáze: směs ethanol/heptan 2 % objem/objem
Vlnová délka detekce 215 nm

20 Bylo ukázáno, že bez přítomnosti enzymu byla chemická
hydrolýza substrátu za podmínek reakce zanedbatelná. Docházelo
však k významné neenzymové hydrolýze substrátu, pokud byl
z reakční směsi vynechán tetrahydrofuran. Enzym Savinase
hydrolyzoval racemický cis-2-acetyl-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-on
25 enantioselektivně za získání (-) (1R,4S) 2-acetyl-2-
azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu, jak bylo prokázáno negativním
znaménkem otáčivosti zjištěným chirálním analyzátozem a chirální
analýzou HPLC. Reakční směs obsahující přibližně 50 % výchozí látky
byla analyzována po dvou dnech chirální HPLC a ukázalo se, že
30 zbytkový laktam má ve srovnání s autentickým vzorkem enantiomerní

15.03.00

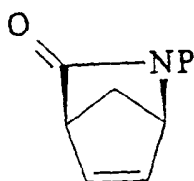
- 12 -

přebytek více než 99,8 % se správnou absolutní konfigurací pro syntézu abacaviru.

Zastupuje:

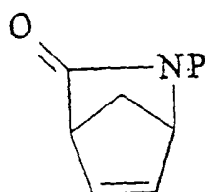
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby v podstatě enantiomerně čistého N-chráněného
(1R,4S) 2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu vzorce (IV)



(IV)

kde P je aktivační a ochranná skupina, v y z n a č u j í c í
s e t í m , ž e se na racemickou směs N-chráněného ($\pm$) 2-
azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu vzorce (V)

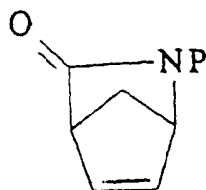


(V)

kde P je aktivační a ochranná skupina

působí acylázovým enzymem a nezreagovaný enantiomer
vzorce (IV) se izoluje z reakční směsi běžnými způsoby.

2. Způsob enantiomerního dělení racemické směsi N-chráněného
($\pm$) 2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu vzorce (V)



(V)

kde P je aktivační a ochranná skupina,

za získání v podstatě enantiomerně čistého N-chráněného (1R,4S)-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu vzorce (IV) působením acylázového enzymu na směs.

5

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že skupina P je acylová nebo oxykarbonylová skupina.

10

4. Způsob podle některého z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že skupina P je formylová nebo alkanoylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku.

15

5. Způsob podle některého z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že skupina P je alkyloxykarbonylová nebo aralkyloxykarbonylová skupina.

20

6. Způsob podle nároku 5, vyznačující se tím, že skupina P je *terc* butyloxykarbonylová nebo benzyloxykarbonylová skupina.

25

7. Způsob podle některého z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že acylázový enzym je odvozený z *Bacillus* sp.

8. Způsob podle nároku 7, vyznačující se tím, že acylázovým enzymem je enzym Savinase.

9. Způsob podle některého z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že reakce se provádí ve směsi organického rozpouštědla a vody.
- 5 10. Způsob podle nároku 9, vyznačující se tím, že organickým rozpouštědlem je organické rozpouštědlo mísitelné s vodou a použije se méně než 70 % objemových vody.
- 10 11. Způsob podle nároku 10, vyznačující se tím, že jako rozpouštědlo mísitelné s vodou se použije tetrahydrofuran nebo 1,4-dioxan.
- 15 12. Způsob podle některého z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že reakce se provádí v rozmezí pH 6 až 11 a při teplotě 20 až 50 °C.
- 20 13. Způsob podle nároku 12, vyznačující se tím, že reakce se provádí při pH přibližně 8 a teplotě přibližně 30 °C.
- 25 14. Způsob podle některého z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že nezreagovaný N-chráněný (1R,4S) 2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-on vzorce (IV) se izoluje extrakcí rozpouštědlem.

Zastupuje: