



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **312899**

(13) B1

(51) Int Cl<sup>7</sup> C 07 D 473/18, 473/00, A 61 K 31/52

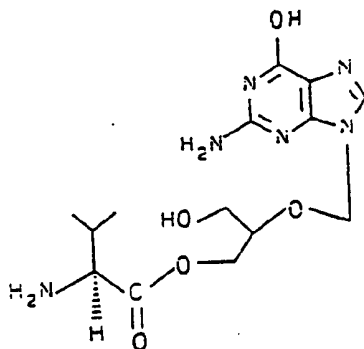
## Patentstyret

(21) Søknadsnr	19952977	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	1995.07.27	(85) Videreføringdag	
(24) Løpedag	1995.07.27	(30) Prioritet	1994.07.28. US. 281893
(41) Alm. tilgj.	1996.01.29		
(45) Meddelt dato	2002.07.15		
(71) Patenthaver	F Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, CH		
(72) Oppfinner	John J Nestor, Cupertino, CA 95014, US Scott W Womble, Fremont, CA 94536, US Hans Maag, Menlo Park, CA 94025, US		
(74) Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, 0306 Oslo		

(54) **Benevnelse** Aminodihydro-oksopurinyll-metoksypropandiolderivater

(56) **Anførte publikasjoner** Ingen

(57) **Sammendrag** L-Monovalinesteren avledet fra 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1,3-propandiol og dens farmasøytisk akseptable salter beskrives, hvilke er verdifulle som antivirale midler med forbedret absorpsjon.



Foreliggende oppfinnelse vedrører et nytt antiviralt legemiddel, spesielt en aminosyreester av et purinderivat, og helt spesielt en ester avledet fra ganciclovir og L-valin, og farmasøytisk akseptable salter derav som angitt i krav 1. Oppfinnelsen vedrører også mellomprodukter som angitt i krav 7, fremgangsmåter for å fremstille det antivirale legemiddel som angitt i krav 8, farmasøytiske sammensetninger derav som angitt i krav 6, og deres anvendelse som angitt i krav 9 i antiviral og beslektet sykdomsbehandling.

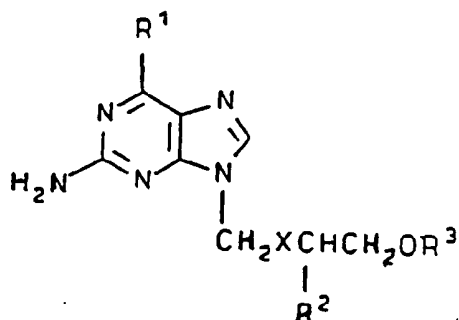
Mer spesielt vedrører oppfinnelsen L-monovalinesteren avledet fra 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1,3-propandiol og dens farmasøytisk akseptable salter.

Det britiske patent 1523865 beskriver antivirale purinderivater med en acyklisk kjede i 9-stillingen. Blant disse derivater er 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-okso-1,6-dihydro-purin-9-yl)metoksyetanol med INN-navnet acyclovir, blitt funnet å oppvise en god virkning mot herpesvirus, så som herpes simplex. Mens acyclovir er blitt funnet å være meget virksom ved topisk eller parenteral administrasjon, opptas den kun med måte etter oral administrasjon.

US-Patent 4.355.032 beskriver forbindelsen 9-[(2-hydroksy-1-hydroksymetyletoksy)metyl]guanin eller 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1,3-propandiol med INN-navnet ganciclovir. Ganciclovir er meget virksom mot virus av herpesfamilien, f.eks. mot herpes simplex og cytomegalovirus. Den har et nokså lavt opptaksforhold ved oral administrasjon og må derfor anvendes i høye doseringer når den administreres på denne måte. Ganciclovir administreres vanligvis ved intravenøs infusjon. Denne administrasjonsmåte har ulempen at den er meget ubekvem for pasienten, og krever ofte tjenestene av en lege, sykepleier eller en annen medisinsk medarbeider. Det finnes også en viss risiko for smitte, hvilket er spesielt problematisk for immun-kompromitterte pasienter som blir behandlet med ganciclovir og kan ha en lav motstand mot infeksjon. Derfor er det

meget ønskelig å frembringe ganciclovir med en forbedret oral absorpsjonsprofil.

Den britiske patentsøknad GB 2 122 618 beskriver derivater av 9-(2-hydroksyetoksymetyl)guanin med en generell formel



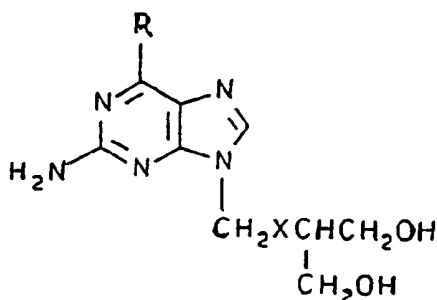
10 hvor X betyr et oksygen- eller svovelatom,  $\text{R}^1$  betyr en hydroksy- eller en aminogruppe,  $\text{R}^2$  betyr et hydrogenatom eller en gruppe med formel  $-\text{CH}_2\text{OR}^3_a$ , og  $\text{R}^3$  og  $\text{R}^3_a$  kan være like eller forskjellige, hvor hver betyr et aminosyreacylradikal og fysiologisk akseptable salter derav. Disse forbindelser er nyttige ved behandling av virale infeksjoner og oppviser en høy vannløselighet som gjør dem verdifulle ved formulering av vandige farmasøytiske preparater. Mens den generelle formel i den britiske patentsøknad omfatter forbindelser hvor  $\text{R}^2$  betyr gruppen  $-\text{CH}_2\text{OR}^3_a$ , beskrives det ingen enkelte forbindelser fra denne gruppe. Patentsøknaden

15

20 beskriver også at formuleringer som anvendes med disse forbindelser med forbedret vannløselighet, omfatter orale, rektale, nasale, topiske, vaginale og parenterale formuleringer.

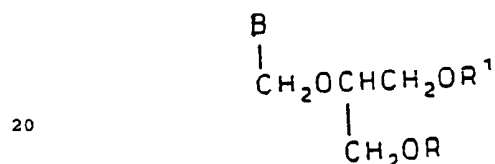
Den britiske patentsøknad GB 2 104 070 beskriver antivirale forbindelser med formel

25



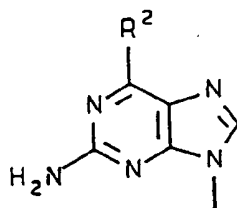
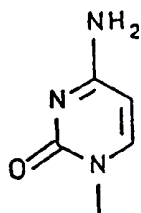
hvor R betyr en hydroksy- eller aminogruppe og X betyr et  
 oksygen- eller svovelatom, og fysiologisk akseptable salter  
 og estere. Den generelle formel omfatter ganciclovir og  
 fysiologisk akseptable salter og estere. Esterne omfatter  
 5 slike som inneholder en formyloksygruppe, C<sub>1-16</sub>- (f.eks.  
 C<sub>1-6</sub>-) alkanoyloksy (f.eks. acetoksy eller propionoyloksy),  
 valgfritt substituert aralkanoyloksy (f.eks. fenyl-C<sub>1-4</sub>-  
 alkanoyloksy, så som fenylacetoksy) eller valgfritt substi-  
 tuerte aroyloksy- (f.eks. benzoyloksy- eller naftoyloksy-)  
 10 estergrupperinger i én eller begge endestillinger av 9-  
 sidekjeden av forbindelsene med den generelle formel.  
 Ovennevnte aralkanoyloksy- eller aroyloksyestergrupper kan  
 være substituert, f.eks. med ett eller flere halogener  
 (f.eks. klor- eller bromatomer) eller én eller flere  
 15 amino-, nitril- eller sulfamidogrupper, hvorved aryl delen  
 av gruppen med fordel inneholder fra 6 til 10 karbonatomer.

Europa-patentsøknaden med publikasjonsnummer 375 329 be-  
 skriver prodrogeforbindelser med den følgende formel



hvor R og R<sup>1</sup> uavhengig velges fra et hydrogenatom og et  
 aminoacylresiduum, forutsatt at minst én av R og R<sup>1</sup> betyr  
 et aminosyreacylresiduum, og B betyr en gruppe med formel

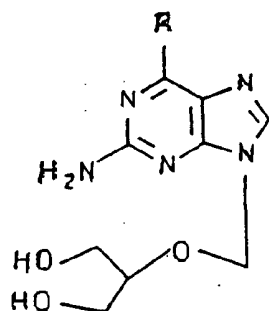
25



hvor  $R^2$  betyr en  $C_{1-6}$ -rett kjede,  $C_{3-6}$ -forgrenet kjede eller  $C_{3-6}$ -cyklisk alkoksygruppe, eller en hydroksy- eller amino- gruppe eller et hydrogenatom, og de fysiologisk akseptable salter derav. Disse prodrogeforbindelser sies å ha fordel-  
 5 aktig biologisk tilgjengelighet når de administreres oralt, hvilket resulterer i høye nivåer av moderforbindelsen i kroppen.

Eksempel 3b) i Europa-patentsøknaden med publikasjonsnummer 375 329 beskriver fremstillingen av bis(L-isoleucinat)-  
 10 esteren av ganciclovir som et hvitt skum. Eksempel 4b) beskriver fremstillingen av bis(glycinat)esteren av ganciclovir som et hvitt fast stoff. Eksempel 5b) beskriver fremstillingen av bis(L-valinat)esteren av ganciclovir som et fast stoff. Eksempel 6b) beskriver fremstillingen av  
 15 bis(L-alaninat)esteren av ganciclovir som en syrup inneholdende 90% av bis-esteren og 10% av monoesteren. De beskrevne bis-estere er ikkekrystallinske stoffer som er vanskelige å behandle for fremstilling av orale farmasøytiske doseringsformer.

20 Den britiske patentsøknad nr. 8829671 beskriver aminosyre-estere av forbindelsene med formel

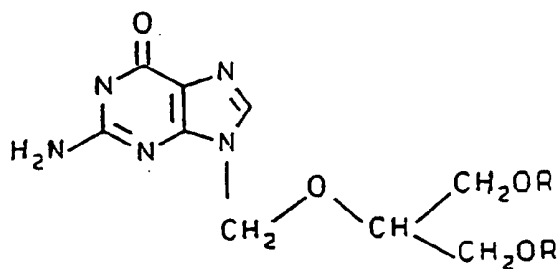


(hvor R betyr en hydroksy- eller aminogruppe eller et hydrogenatom) og de fysiologisk akseptable salter derav. Eksempler på foretrukne aminosyrer omfatter alifatiske syrer, f.eks. inneholdende opptil 6 karbonatomer, så som  
 30 glycin, alanin, valin og isoleucin. Aminosyreesterne omfatter både mono- og diesterne. Imidlertid beskriver hverken

denne patentsøknad eller Europa-patentsøknaden med publia-  
sjonsnummer 375 329 eller US-patent nr. 5.043.339, frem-  
stillingen av monoesterne. Enda mindre bringes det inn data  
som antyder at disse kan være nyttige.

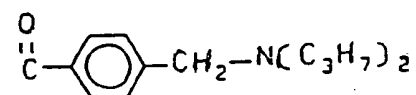
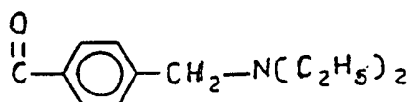
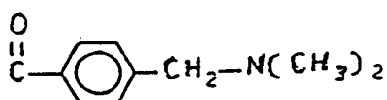
- 5 Jensen et al., *Acta Pharm. Nord.* 3(4) 243-247 (1991) be-  
skriver syntesen, den enzymatiske hydrolyse og de fysiko-  
kjemiske egenskaper av N-substituert 4-(aminometyl)benzoat-  
diesterprodroger av ganciclovir med formel

10

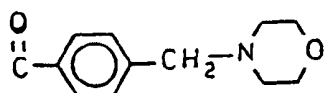


hvor R kan bety

15



20



Disse estere ble syntetisert og bedømt med det mål å forbedre opptaksegenskapene av ganciclovir. Esterne ble hydrolysert enzymatisk med humanplasma til moderlegemidlet, hvorved hydrolysen foregikk ved dannelsen av den tilsvarende monoester. Forfatterne bedømte disse estere ifølge deres hastighet av enzymatisk hydrolyse, lipofilisiteten, og kom frem til at disse esterens egenskaper gjør diesterne til en lovende prodrogetype for ganciclovir å forbedre sitt opptaksforhold ved f.eks. parenteral administrasjon.

- 10 Martin et al., *J. Pharm. Sci.* 76(2), 180-184 (1987) beskriver mono- og diacylestere av ganciclovir som ble testet for å bedømme deres biologiske tilgjengelighet etter oral administrasjon. Forfatterne antyder at dipropionatesteren er ca. 42% mer biologisk tilgjengelig enn ganciclovir i seg selv.

Europa-patentsøknaden med publikasjonsnummer 158 847 beskriver blant annet at 6-deoksyacyclovir og 6-dioksyganciclovir lett kan omdannes in vivo ved virkningen av enzymer til acyclovir hhv. ganciclovir. Fra eksperimenter med rotte fant oppfinnerne at en oral administrasjon av disse 6-deoksyprodroger fører til virksomt opptak fra mave-tarmtrakten og høye plasmanivåer av moderlegemidlene.

Maudgal et al., *Arch. Ophthalmol.* 102, 140-142 (1984) beskriver glycinesteren av acyclovir som virksom ved topisk behandling av epitelial og stromal herpes simplex keratitt og forbundet iritt når den administreres som en 1% øyedråpeformulering til kanin. Forfatterne beskriver glycin-, alanin-,  $\beta$ -alanin- og sukkinylestere av acyclovir og antyder at løseligheten av glycinesteren er ca. 30 ganger høyere enn løseligheten av acyclovir i seg selv, hvilket tillater anvendelsen av glycinesteren i øyedråper med konsentrasjoner på opptil 6%, mens acyclovir i seg selv anvendes som et hudvann, hvilket er lite virksomt ved stromal sykdom eller iritt.

Colla et al., *J. Med. Chem.* 98, 602-604 (1983) beskriver flere vannløselige esterderivater av acyclovir og deres salter som prodroger av acyclovir. Forfatterne antyder at acyclovir ikke kan gis som øyedråper eller intramuskulære injeksjoner pga. sin begrensede løselighet i vann, og har derfor syntetisert derivater av acyclovir som er mer vannløselige enn moderforbindelsen. Forfatterne beskriver hydrokloridsaltet av glycylolesteren, hydrokloridsaltet av alanylolesteren, hydrokloridsaltet av  $\beta$ -alanylolesteren, natriumsaltet av sukkinylesteren og azidoacetatesteren. Når testet i primære kaninnyrecellekulturer mot diverse herpes simplex virus type 1 og type 2-strenger, viste seg ifølge forfatterne de fire estere nesten like virksomme som acyclovir i seg selv. Forfatterne antyder at disse acyclovirestere er mer praktiske ved klinisk anvendelse enn moderforbindelsen ved topisk behandling som øyedråper og ved systemisk behandling av herpesvirusinfeksjoner som reagerer vel på intravenøs acyclovirbehandling. I forhold til acyclovir kan disse estere administreres i meget mindre mengder, og derfor via intramuskulære injeksjoner.

Beauchamp et al., *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 3, 157-164 (1992) beskriver atten aminosyreestere av antiherpesdrogen acyclovir og deres virksomheter som prodroger av acyclovir, bedømt i rotte ved å måle den urinære gjenvinnelse av acyclovir. Ti prodroger gav større mengder av moderdrogen i urinet enn acyclovir selv: glycylolesteren, D,L-alanylolesteren, L-alanylolesteren, L-2-aminobutyratesteren, D,L-valylolesteren, L-valylolesteren, DL-isoleucylolesteren, L-isoleucylolesteren, L-metionylolesteren og L-prolylolesteren. L-Aminosyreesterne var bedre prodroger enn de tilsvarende D- eller D,L-isomerer, hvilket antyder at det er en stereoselektiv transporter medblandet. Fra tabell 1 i publikasjonen, som gir kjemisk data og den biologiske tilgjengelighet av de atten aminosyreestere, følger det at D-aminosyreesterne har en lavere oral biologisk tilgjengelighet enn acyclovir i seg selv. Dermed, siden D-aminosyreesterne ikke har noen fordeler overfor acyclovir, er de ikke nyttige som prodroger av acyclovir. Den achirale gly-

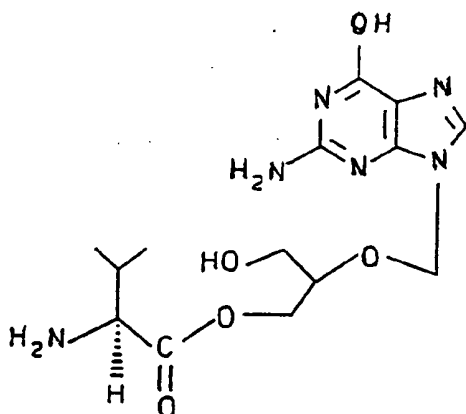
cylester av acyclovir har imidlertid en høyere oral biologisk tilgjengelighet enn acyclovir (i den urinære gjenvinnelsestest ble 30% av acycloviren dosert som glycy-lester gjenvunnet, mens gjenvinnelsen ved dosering av acyclovir var 19%). Ifølge forfatterne var L-valylesteren av acyclovir den beste prodroge av de undersøkte estere.

Europa-patentsøknaden med publikasjonsnummer 308 065 beskriver at valin- og isoleucinesterne av acyclovir, fortrinnsvis i L-formen, oppviser en stor økning i absorpsjonen fra tarmen etter oral administrasjon, sammenlignet med andre estere og acyclovir.

Det førende legemiddel ved behandling av cytomegalovirusinfeksjon er for tiden ganciclovir. Imidlertid gjør dens begrensede orale biologiske tilgjengelighet og behovet for langsom daglig intravenøs infusjon av drogen (eller behovet for intravitreale injeksjoner eller implantater) det nødvendig å finne en oral doseringsform med øket biologisk tilgjengelighet.

Foreliggende oppfinnelse beskriver en stabil prodrogeformulering av ganciclovir med forbedret oral absorpsjon og lav toksisitet. Slike kjennetegn er spesielt verdifulle ved behandling av herpesinfeksjoner i immunkompromitterte pasienter, hvor den orale administrasjon er det foretrukne valg. I tillegg oppviser den aktive ingrediens farmakopoeiale egenskaper som tillater en forbedret karakterisering og farmasøytisk behandling. Det ble overraskende funnet at L-monovalinesteren av ganciclovir og dens farmasøytisk akseptable salter oppviser disse ønskede kjennetegn.

I et første aspekt beskriver oppfinnelsen forbindelsen med formel:



(I)

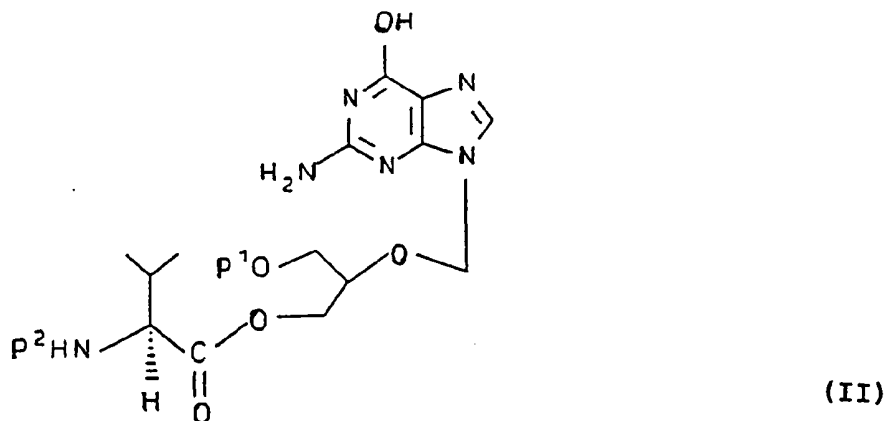
og farmasøytisk akseptable salter derav. Forbindelsen nevnes i det følgende 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksey-1-propanyl-L-valinat eller mono-L-valinganciclovir.

I et andre aspekt beskriver foreliggende oppfinnelse en farmasøytisk sammensetning inneholdende mono-L-valinesteren av ganciclovir eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller en diastereomer derav, fortrinnsvis i blanding med ett eller flere tilsetningsstoffer eller bærerstoffer, for anvendelse ved behandling av antivirale og beslektede sykdommer.

Behandling eller forebyggelse av virale infeksjoner med forbindelser med formel (I) kan gjøres å administrere mono-L-valinesteren av ganciclovir eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, eller en sammensetning inneholdende dette, til et dyr som er i behov for slik behandling eller forebyggelse.

I et tredje aspekt beskriver oppfinnelsen forbindelser som er nyttige mellomprodukter ved fremstilling av mono-L-valinganciclovir og dens farmasøytisk akseptable salter, med formel:

10



hvor P<sup>1</sup> betyr hydrogen eller en hydroksybeskyttelsesgruppe og P<sup>2</sup> betyr en aminobeskyttelsesgruppe.

Et fjerde aspekt av foreliggende oppfinnelse er en fremgangsmåte ved fremstilling av prodrogeforbindelsen ifølge oppfinnelsen og dens farmasøytisk akseptable salter. Denne fremgangsmåte omfatter esterifiseringen av ganciclovir og dens derivater, fjerningen av beskyttelsesgrupper fra ganciclovir som er esterifisert med L-valin, en delvis hydrolyse av ganciclovir-bis-L-valinester til mono-L-valin-esteren med formel I, kondensasjonen av guanin med en substituert glyserol, den optiske spaltning av en forbindelse med formel I, og dannelsen av salter av prodrogen med formel I. Detaljer av fremgangsmåten beskrives nedenfor.

10

15

Hvis intet annet er angitt, har de følgende begreper som anvendes i beskrivelsen og kravene, de nedenfor angitte betydninger:

20

"Alkyl" betyr et rettkjedet eller forgrenet, mettet hydrokarbonradikal med fra ett til det nevnte antall karbonatomer. C<sub>1-7</sub>-alkyl betyr f.eks. alkyl med minst ett, men ikke fler enn syv karbonatomer, f.eks. metyl, etyl, i-propyl, n-propyl, n-butyl, n-pentyl, n-heptyl og lignende.

25

"Lavere alkyl" betyr et alkyl med fra ett til seks karbonatomer.

"Aryl" betyr et organisk radikal avledet fra et aromatisk hydrokarbon ved fjerning av et hydrogenatom. Foretrukne arylradikaler har fra seks til tolv karbonatomer som ring-karbonatomer i det aromatiske hydrokarbon.

5 "Aralkyl" betyr et organisk radikal avledet fra et aralkan, hvor et alkylhydrogenatom er substituert med en ovenfor definert arylgruppe.

"Acyl" betyr et organisk radikal avledet fra en organisk syre ved fjerning av hydroksylgruppen; f.eks. er  $\text{CH}_3\text{CO}$ -  
10 acylradikalet av  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , eller acetyl. Andre eksempler på slike acylgrupper er propionyl eller benzoyl osv. Begrepet "acyl" omfatter også begrepet "alkanoyl", som er det organiske radikal  $\text{RCO}$ -, hvor R er en alkylgruppe som definert ovenfor.

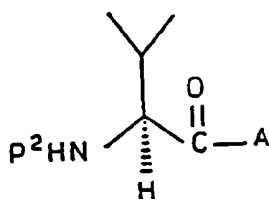
15 "Lavere alkoksy", "(lavere alkyl)amino", "di(lavere alkyl)amino", "(lavere alkanoyl)amino" og lignende begreper betyr alkoksy, alkylamino, dialkylamino, alkanoylamino osv., hvor alkylradikalet eller hvert alkylradikal er "lavere alkyl" som beskrevet ovenfor.

20 "Halogen" betyr fluor, klor, brom eller jod.

Ifølge Hackh's *Chemical Dictionary*, McGraw-Hill Book Company 1969, betyr et "derivat" av en forbindelse en forbindelse som kan erholdes fra den opprinnelige forbindelse ved en enkel kjemisk prosess.

25 "Aktivert derivat" av en forbindelse betyr en reaktiv form av den opprinnelige forbindelse, som gjør forbindelsen aktiv i en ønsket kjemisk omsetning, hvor den opprinnelige forbindelse kun har lav aktivitet eller ikke er reaktiv. Aktiveringen oppnås ved dannelse av et derivat eller en  
30 kjemisk gruppering innen molekylet med et høyere innhold av fri energi enn den opprinnelige forbindelse, hvilket gjør at den aktiverte form er mer mottakelig for reaksjon med

andre reagensmidler. I foreliggende oppfinnelse har aktive-  
 ringen av karboksygruppen en spesiell betydning, og tilsva-  
 rende aktiveringsmidler eller -grupper, som aktiverer kar-  
 boksygruppen, beskrives i større detalj nedenfor. Et eksem-  
 pel på et aktivert derivat av L-valin er forbindelsen med  
 5 formel:



(III)

10 hvor P<sup>2</sup> betyr en aminobeskyttelsesgruppe og A betyr en  
 karboksyaktiverende gruppe, f.eks. halogen eller en lavere  
 acyloksygruppe. Et ytterligere eksempel er et aminosyre-  
 anhydrid, hvilket er en aktivert form av en aminosyre som  
 gjør aminosyren (spesielt L-valin) mottakelig for esteri-  
 15 fisering. Et ytterligere eksempel er UNCA'er, som beskrives  
 i større detalj nedenfor.

"Beskyttelsesgruppe" betyr en kjemisk gruppe som (a) hin-  
 drer en reaktiv gruppe fra å delta i en uønsket kjemisk  
 reaksjon og (b) lett kan fjernes når det ikke lenger kreves  
 20 noen beskyttelse av den reaktive gruppe. En benzylgruppe er  
 f.eks. en beskyttelsesgruppe for en primær hydroksyl-  
 funksjon.

"Aminobeskyttelsesgruppe" betyr en beskyttelsesgruppe som  
 bevarer en reaktiv aminogruppe som ellers ville modifiseres  
 25 i enkelte kjemiske reaksjoner. Definisjonen omfatter for-  
 mylgrupper eller lavere alkanoylgrupper med fra 2 til 4  
 karbonatomer, spesielt acetyl- eller propionylgrupper;  
 trityl- eller substituerte tritylgrupper, så som monome-  
 toksytritylgruppen; dimetoksytritylgrupper, så som 4,4'-  
 30 dimetoksytrityl- eller 4,4'-dimetoksytrifenylmetylgruppen,  
 trifluoracetyl- og N-(9-fluorenylmetoksykarbonyl)- eller  
 "Fmoc"-gruppen; allyloksykarbonylgrupper eller andre be-

skyttelsesgrupper avledet fra halogenkarbonater, så som (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)aryl-lavere alkylkarbonater (så som N-benzyloksykarbonylgruppen avledet fra benzylklorkarbonat), eller avledet fra bifenylalkylhalogenkarbonater, eller tertiære alkylhalogenkarbonater, så som tertiære butylhalogenkarbonater, spesielt tertiært butylklorkarbonat, eller di(lavere)alkyldikarbonater, spesielt di(t-butyl)dikarbonat og ftalylgruppen.

"Hydroksybeskyttelsesgruppe" betyr en beskyttelsesgruppe som bevarer en hydroksygruppe som ellers ville modifiseres i enkelte kjemiske reaksjoner. Egnede hydroksybeskyttelsesgrupper omfatter eterdannende grupper som lett kan fjernes etter at de andre reaksjonstrinn er utført, så som benzyl- eller tritylgrupper som valgfritt kan være substituert i sin fenyling. Andre egnede hydroksybeskyttelsesgrupper omfatter alkyletergrupper, tetrahydropyranyl, silyl, trialkylsilyletergrupper og allylgrupper.

"Avgående gruppe" betyr en labil gruppe som i en kjemisk reaksjon erstattes av en annen gruppe. Eksempler på avgående grupper er halogen, den valgfritt substituerte benzyl- oksygruppe, isopropyl- oksygruppen, mesyl- oksygruppen, tosyl- oksygruppen eller acyl- oksygruppen.

Alle aktiverende og beskyttende midler som anvendes ved fremstilling av forbindelser med formel I, må møte de følgende krav: (1) deres innføring bør foregå kvantitativt og uten racemisering av L-valinkomponenten; (2) beskyttelsesgruppen, som er tilstede under den ønskede reaksjon, bør være stabil i de anvendte reaksjonsbetingelser; og (3) gruppen må lett kunne fjernes ved betingelser, under hvilke esterbindingen er stabil og under hvilke det ikke forekommer noen racemisering av L-valindelen av esteren.

Begrepet "chiralitet" betyr dreiningsegenskapen hos et molekyl, hvilken beskriver symmetrielementene i molekylet (eller fraværet av symmetrielementer). Molekyler som ikke

oppviser symmetrielementer er "chirale". Et chiralt molekyl som mangler alle symmetrielementer, også en enkelt akse, nevnes "asymmetrisk".

Begrepet "achiral" betyr nærvær av minst ett symmetrielement i et molekyl, så som en enkelt akse.

"Isomeri" vedrører forbindelser med lik atomar masse og likt atomnummer, men med én eller flere forskjellige fysiske eller kjemiske egenskaper. De diverse isomertyper omfatter de følgende:

10 "Stereoisomer" vedrører en kjemisk forbindelse med lik molekylvekt, kjemisk sammensetning og struktur som en annen forbindelse, men med ulik atomgruppering. Dette vil si at enkelte identiske kjemiske deler har forskjellige orienteringer i rommet, og har i ren tilstand derfor evnen til å  
15 rotere planet av polarisert lys. Imidlertid kan enkelte rene stereoisomerer ha en optisk rotasjon som er så svak at den ikke kan påvises med moderne instrumenter.

"Optisk isomer" beskriver en type stereoisomeri som fremtrer ved rotasjonen som isomeren, enten ren eller i oppløsning, gir til planet av polarisert lys. I flere tilfeller forårsakes dette av bindingen av fire forskjellige kjemiske atomer eller grupper til minst ett av karbonatomene i et molekyl, eller med andre ord av molekylets ovenfor beskrevne chiralitet.

25 Stereoisomerer eller optiske isomerer som er speilbilder av hverandre, kalles "enantiomerer" og kan sies å være enantiomere. Chirale grupper som er speilbilder av hverandre nevnes enantiomere grupper.

Enantiomerer, hvis absolutte konfigurasjoner ikke er kjent, kan differentieres som høyredreie (prefiks +) eller  
30 venstredreie (prefiks -), avhengig av retningen i hvil-

ken de under spesielle eksperimentbetingelser dreier planet av polarisert lys.

Når like mengder av enantiomere molekyler er til stede sammen, nevnes produktet racemisk, uavhengig av om det er krystallinsk, flytende eller gassformet. En homogen fast fase sammensatt av ekvimolare mengder enantiomere molekyler, kalles en racemisk forbindelse. En blanding av ekvimolare mengder av enantiomere molekyler som forekommer som separate faste faser, kalles en racemisk blanding. Enhver homogen fase som inneholder ekvimolare mengder av enantiomere molekyler, kalles en racemat.

Forbindelser med to asymmetriske karbonatomer (chirale sentre) har fire stereoisomerer, som danner to par enantiomerer. Mens entantiomerene av et par er speilbilder av hverandre, er enantiomerene av de to separate par ikke speilbilder av hverandre, og kalles "diastereomerer". Diastereomerer har lignende, men ikke identiske, egenskaper og oppviser ulike fysiske egenskaper, f.eks. smeltepunkt, løselighet osv.

De optisk aktive forbindelser heri kan benevnes ifølge et antall konvensjoner; f.eks. R- og S-sekvensreglene til Cahn og Prelog; erythro- og threoisomerer; D- og L-isomerer; d- og l-isomerer; og (+)- og (-)-isomerer; hvilket angir retningen i hvilken et plan av polarisert lys roteres av den kjemiske struktur, enten i ren form eller i oppløsning. Disse konvensjoner er velkjent innen faget og beskrives i detalj av E.L. Eliel i Stereochemistry of Carbon Compounds, utgitt av McGraw-Hill Book Company, Inc. i New York i 1962, og referanser nevnt deri. Dermed kan disse isomerer beskrives som d-, l- eller et d,l-par; eller D-, L- eller et D,L-par; eller R-, S- eller et R,S-par; avhengig av hvilket nomenklatursystem som anvendes. Generelt vil det i foreliggende beskrivelse anvendes (D)-, (L)- og (D,L)-benevnelsen for aminosyren (valin) og (R)-, (S)- og (R,S)-benevnelsen

for det asymmetriske karbonatom i ganciclovirdelen, for å skille mellom disse to.

Forbindelsen med formel I og forbindelser med formel II har to asymmetriske sentre (2 karbonatomer), ett i valindelen og det andre i den alifatiske sidekjede av ganciclovirdelen. Sistnevnte er karbonatom 2 av propanylradikalet. Dermed forekommer forbindelsen med formel I og forbindelser med formel II som diastereomerer og som blandinger av diastereomerer. Vedrørende forbindelser ifølge oppfinnelsen, kan enhver diastereomer eller blanding av diastereomerer anvendes, og kravene skal dekke både de enkelte diastereomerer og blandinger derav, hvis intet annet er angitt. Formel I omfatter de to diastereomerer med formel I samt blandinger derav.

"Valgfri" eller "valgfritt" betyr at en beskrevet hendelse eller betingelse kan skje eller ikke, og at beskrivelsen omfatter tilfeller hvor hendelsen eller betingelsen finner sted, og tilfeller hvor de ikke gjør det. F.eks. betyr "valgfritt substituert fenyl" at fenylet kan være substituert eller ikke substituert, og at beskrivelsen omfatter både usubstituert fenyl og fenyl med substitusjon; "valgfritt etterfulgt av å omdanne den frie base til syreaddisjonssaltet" betyr at denne omdannelse kan utføres eller kan utelates innen rammen for oppfinnelsen, og oppfinnelsen omfatter både slike prosedyrer hvor den frie base omdannes til syreaddisjonssaltet og prosedyrer hvor den ikke omdannes.

"Farmasøytisk akseptabel" betyr noe som er nyttig ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning, som generelt er sikkert og ikke-toksisk, og omfatter slikt som er akseptabelt for anvendelse innen veterinærmedisinen samt for farmasøytisk anvendelse på mennesker.

"Farmasøytisk akseptable salter" betyr salter som oppviser den ønskede farmakologiske aktivitet og som hverken er bio-

logisk eller på annen måte uønskelig. Slike salter omfatter syreaddisjonssalter dannet med uorganiske syrer, så som saltsyre, hydrobromsyre, svovelsyre, salpetersyre, fosforsyre og lignende; eller med organiske syrer, så som eddiksyrer, propionsyre, heksansyre, heptansyre, cyklopentanpropionsyre, glykolsyre, pyrodruesyre, melkesyre, malonsyre, ravsyre, eplesyre, maleinsyre, fumarsyre, vinsyre, sitronsyre, benzosyre, o-(4-hydroksybenzoyl)benzosyre, kanelisyre, mandelsyre, metansulfonsyre, etansulfonsyre, 1,2-etandisulfonsyre, 2-hydroksyetansulfonsyre, benzensulfonsyre, p-klorbenzensulfonsyre, 2-naftalensulfonsyre, p-toluensulfonsyre, kamforsulfonsyre, 4-metylbicyklo[2,2,2]okt-2-en-1-karboksylysyre, glukohexonsyre, 4,4'-metylenbis-(3-hydroksy-2-naftol)syre, 3-fenylpropionsyre, trimetylleddiksyre, tertiær butyleddiksyre, laurylsvovelsyre, glukonsyre, glutamsyre, hydroksynaftolsyre, salicylsyre, stearinsyre, mukonsyre og lignende. Foretrukne farmasøytisk akseptable salter er slike salter som dannes med saltsyre, svovelsyre, fosforsyre, eddiksyre eller metansulfonsyre, etansulfonsyre, 1,2-etandisulfonsyre, 2-hydroksyetansulfonsyre, benzensulfonsyre, p-klorbenzensulfonsyre og 2-naftalensulfonsyre, p-toluensulfonsyre, kamforsulfonsyre.

"Dyr" omfatter mennesker, ikke-humane pattedyr (så som hund, katt, kanin, kveg, hest, sau, get, svin og hjort) og ikke-pattedyr, så som fugl, fisk og lignende.

"Sykdom" omfatter uttrykkelig enhver usunn tilstand i et dyr eller en del derav. Dermed omfatter "sykdom" heri enhver viral eller beslektet sykdom som kan behandles med mono-L-valinganciclovir eller med farmasøytisk akseptable salter derav.

"Behandling" betyr enhver behandling av en sykdom i et dyr og omfatter:

(1) forebyggelse av sykdommens opptreden i et dyr som er mottakelig for sykdommen men som ikke enda opplever eller

oppviser symptomer av sykdommen; f.eks. forebygging av de kliniske symptomers utbrudd;

(2) hemming av sykdommen; f.eks. stansing av dens utvikling; eller

5 (3) lindring av sykdommen; f.eks. tilveiebringelse av en tilbakegang av sykdommens symptomer.

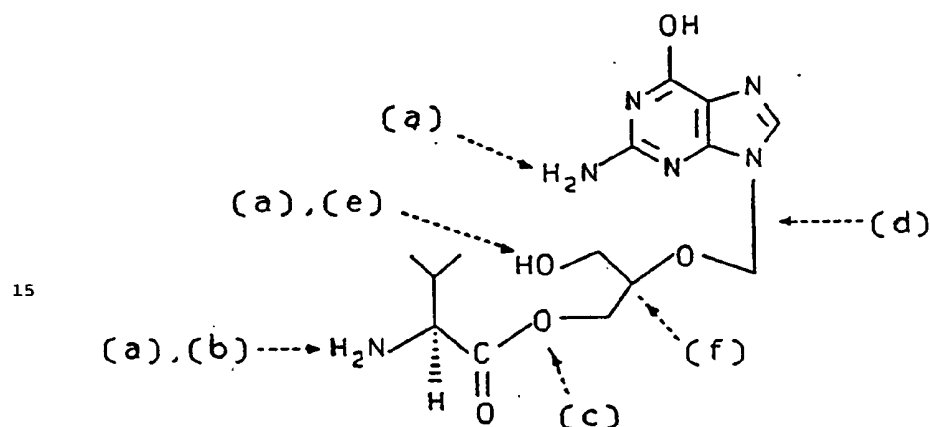
"Virksom mengde" for behandling av en sykdom betyr den mengde som når den administreres til et dyr som er i behov for det, er tilstrekkelig for å bevirke en behandling, som  
10 definert ovenfor, av sykdommen.

Hvis intet annet er angitt, finner de heri beskrevne omsetninger sted ved atmosfæretrykk innen et temperaturområde på fra 5°C til 170°C (fortrinnsvis ved fra 10°C til 50°C; mest foretrukket ved "værelses-" eller "omgivelses"temperatur,  
15 f.eks. 20-30°C). Imidlertid finnes det naturlige enkelte kjemiske omsetninger, hvor det anvendte temperaturområde ligger over eller under disse temperaturområder. Videre er de angitte reaksjonstidsrom og -betingelser ment som tilnærmelser hvis intet annet er nevnt; f.eks. finner det sted  
20 ved tilnærmelsesvis atmosfæretrykk innen et temperaturområde på fra ca. 5°C til ca. 100°C (fortrinnsvis fra ca. 10°C til ca. 50°C; mest foretrukket ved ca. 20°C) i løpet av ca. 1 til ca. 100 timer (fortrinnsvis ca. 5 til 60 timer). Parametre som angis i eksemplene er ment spesifikt, ikke  
25 tilnærmelsesvis.

Isolering og rensing av de heri beskrevne forbindelser og mellomprodukter, kan hvis ønsket utføres ved enhver egnet isolasjons- eller rensingsprosedyre, så som f.eks. filtrering, ekstrahering, krystallisering, kolonnekromatografi,  
30 tynnsjikt-kromatografi eller tykksjikt-kromatografi, eller en kombinasjon av disse fremgangsmåter. Spesielle illustrasjoner på egnede separasjons- og isoleringsprosedyrer kan finnes ved henvendelse til eksemplene nedenfor. Imidlertid

kan det selvfølgelig også anvendes andre separasjons- eller isoleringsprosedyrer.

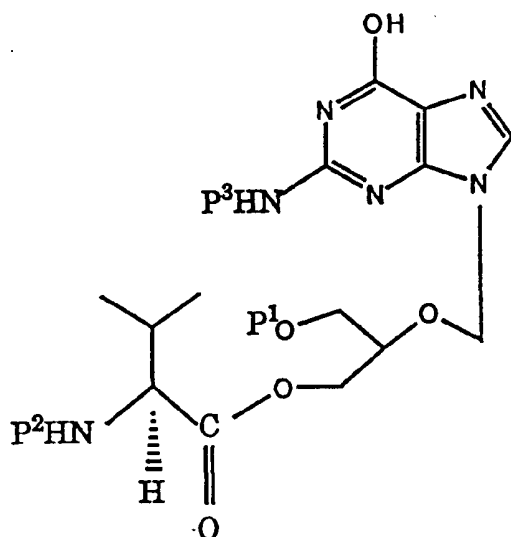
Forbindelsen med formel I eller dens farmasøytisk akseptable salter kan fremstilles på flere måter. De syntetiske metoder er åpenbare fra de merkede stiplede linjer [(a) til (f)] i formel I nedenfor. De stiplede linjer viser skjematisk de aktuelle reaksjonsstillinger, og tabellen nedenfor gir en kort beskrivelse av de diverse fremgangsmåter som vil beskrives i større detalj nedenfor. Bokstavsymbolene i parentesene vedrører det aktuelle trinn i beskrivelsen av fremgangsmåten hhv. kravene:



<u>Metode</u>	<u>Fremgangsmåte</u>
(a)	Avbeskyttelse
(b)	Saltdannelse
(c)	Forestring
(d)	Kondensasjon
(e)	Delvis hydrolyse
(f)	Optisk spaltning/diastereomerseparasjon

25 Følgelig omfatter fremgangsmåten ved fremstilling av forbindelsen med formel I eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, ett eller flere av de følgende trinn:

(a) fjerning av en amino- og/eller hydroksybeskyttelses-  
gruppe fra en forbindelse med formel:



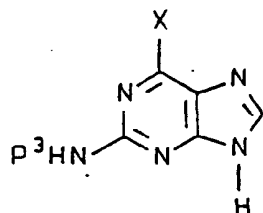
(IV)

10 hvor P<sup>1</sup> betyr en hydroksybeskyttelsesgruppe eller hydrogen,  
P<sup>2</sup> betyr en aminobeskyttelsesgruppe og P<sup>3</sup> betyr hydrogen  
eller P<sup>2</sup>, for å gi forbindelsen med formel I; eller

(b) omdannelse av forbindelsen med formel I til et farma-  
søytisk akseptabelt salt derav; eller

15 (c) forestring av 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-  
yl)metoksy-1,3-propandiol (ganciclovir) eller et salt derav  
med et aktivert derivat av L-valin; eller

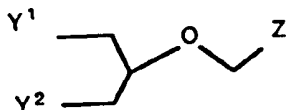
(d) kondensasjon av et valgfritt substituert guanin med  
formel:



(V)

valgfritt i persilylert form,

hvor P<sup>3</sup> betyr hydrogen eller en aminobeskyttelsesgruppe, med et 2-substituert glyserol med formel:



(VI)

5

hvor Y<sup>1</sup> og Y<sup>2</sup> valgfritt betyr halogen, lavere acyloksy, lavere alkyloksy eller aralkyloksygrupper, og Z betyr en avgående gruppe utvalgt fra lavere acyloksy, metoksy, isopropyloksy, benzyloksy, halogen, mesyloksy eller tosyl-  
 10 oksy og lignende;  
 valgfritt i nærvær av en Lewissyrekatalysator, for å gi forbindelsen med formel I; eller

(e) delvis hydrolyse av bis-esteren 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1,3-propandiyl-bis-(L-valinat) eller et salt derav for å gi monoesteren med formel I;  
 15 eller

(f) optisk spaltning eller diastereomerseparasjon av en forbindelse med formel (I).

Forbindelsen med formel I og dens farmasøytisk akseptable  
 20 salter oppviser farmasøytisk aktivitet, og spesielt anti-viral aktivitet. Dermed er forbindelsen og dens farmasøytisk akseptable salter nyttige ved behandling av et bredt spektrum av lidelser i dyr, spesielt mennesker.

Eksempler på lidelser som kan behandles under anvendelse av  
 25 forbindelsen og saltene ifølge oppfinnelsen, omfatter herpesinfeksjoner, så som herpestyper 1, 2 og 6, varicella Zoster, Eppstein-Barr-virus, og spesielt cytomegalovirus, og hepatitt B eller beslektede virus, i mennesker eller ikke-humane pattedyr, spesielt i mennesker. Eksempler på  
 30 kliniske tilstander som forårsakes av disse virus er her-

petisk keratitt, herpetisk encefalitt, forkjølelsessår, genitale infeksjoner (forårsaket av herpes simplex), vannkopper, helvetesild (forårsaket av varicella Zoster), CMV-lungebetennelse og -retinitt, spesielt i immunkompromiterte pasienter inkl. transplantatmottakere (f.eks. 5 hjerte-, nyre- og benmargtransplantater) og pasienter med acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) eller Eppstein-Barr-virus-forårsaket smittsom mononukleose. Forbindelsen ifølge oppfinnelsen er også nyttig ved behandling av enkelte 10 karsinom eller lymfom forårsaket av, eller forbundet med, virale infeksjoner, så som nasofaryngeal kreft, immunoblastisk lymfomadenopati, Burkitts tumor og hårlignende leukoplaki.

Forbindelsene med formel I kan anvendes ved behandling av 15 et dyr (fortrinnsvis et menneske) som oppviser en tilstand hvor en ovenfor beskrevet viral infeksjon spiller en rolle, eller forebyggende behandling av et dyr hvor den behandlende lege eller dyrlege forventer en slik viral infeksjon. Behandlingen omfatter å administrere en terapeutisk virksom 20 mengde mono-L-valinganciclovir eller dens farmasøytisk akseptable salter til et slikt dyr. En terapeutisk virksom mengde av forbindelsen eller dens farmasøytisk akseptable salter er en mengde som er virksom ved behandling av tilstanden, dvs. sykdommen. Den eksakte doserte mengde kan 25 variere i et vidt område, avhengig av voldsomhetsgraden av den spesielle tilstand som skal behandles, alderen og vekten av pasienten, hans relative helse og andre faktorer (så som formuleringstype). For oral formulering kan en terapeutisk virksom mengde variere fra ca. 1 til 250 mg per kilo 30 kroppsvekt per dag, fortrinnsvis ca. 7 til 100 mg/kg kroppsvekt per dag. Mest foretrukket ligger den terapeutisk virksomme mengde mellom ca. 10 og 50 mg/kg/dag, spesielt ved behandling av CMV-retinitt og -lungebetennelse. Dermed ligger for et menneske med en kroppsvekt på 70 kg, en terapeutisk 35 virksom mengde mellom ca. 70 mg/dag og ca. 7 g/dag, fortrinnsvis mellom ca. 500 mg/dag og ca. 5 g/dag, og mest foretrukket mellom ca. 700 mg/dag og 3,5 g/dag. For et in-

travitrealt implantat vil prodrogedoseringen imidlertid variere fra 0,5 mg til 25 mg, fortrinnsvis fra 5 til 10 mg per implantat. Det vil være underforstått for en fagmann at forskjellige doseringsformer av prodroger ifølge oppfinnel-  
5 sen vil kreve forskjellige doseringsbredder.

Ganciclovir er et bekreftet antiviralt legemiddel. Nyttig-  
heten av ganciclovirprodrogen ifølge foreliggende oppfin-  
nelse er blitt demonstrert ved å bestemme blodkonsentra-  
sjonsnivåer av ganciclovir i prøvedyr (rotte og ape) etter  
10 oral administrasjon av prodrogen. Blodplasmakonsentrasjon-  
ene ble bestemt ifølge fremgangsmåtene beskrevet i eksem-  
pler 9 og 10, og er fremgangsmåter som er modifisert fra  
fremgangsmåtene beskrevet av Sommadossi et al. i *REVIEWS OF*  
*INFECTIOUS DISEASES* 10(3), S507 (1988) og i *Journal of*  
15 *Chromatography, Biomedical Applications* 414, 429-433  
(1987).

Forbindelsen eller dens farmasøytisk akseptable salter  
ifølge oppfinnelsen kan administreres på enhver vanlig og  
akseptabel måte som er kjent innen faget, enten for seg  
20 eller i kombinasjon med et annet terapeutisk middel. Gene-  
relt vil forbindelsen og saltene ifølge foreliggende opp-  
finnelse administreres som en farmasøytisk sammensetning  
med et farmasøytisk akseptabelt bærerstoff og administreres  
oralt, systemisk (f.eks. transdermalt eller ved supposi-  
25 torium) eller parenteralt (f.eks. intramuskulært [im],  
intravenøst [iv], subkutant [sc]) eller intravitrealt med  
et implantat. Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan dermed  
administreres i en sammensetning som er et halvfast stoff,  
et pulver, en aerosol, en løsning, en suspensjon eller en  
30 annen egnet sammensetning, som beskrevet nedenfor. Orale  
farmasøytiske sammensetninger foretrekkes.

En farmasøytisk sammensetning omfatter forbindelsen med  
formel I eller dens farmasøytisk akseptable salter, for-  
trinnsvis i blanding med et farmasøytisk akseptabelt bærer-  
35 stoff. Et slikt bærerstoff er et ikke-toksisk bærerstoff.

Et slikt bærerstoff kan være ethvert fast, flytende, halvfast eller gassformet (i tilfellet av en aerosol) bærerstoff som er lett tilgjengelig for en fagmann og som ikke behindrer den aktive ingrediens' virksomhet.

5 Generelt vil en farmasøytisk sammensetning ifølge foreliggende oppfinnelse inneholde en terapeutisk virksom mengde av forbindelsen eller dens farmasøytisk akseptable salter i kombinasjon med minst ett bærerstoff. Avhengig av formuleringstypen, enhetsdosestørrelsen, bærerstoffets art og  
10 andre faktorer som er kjent for fagmannen i farmasøytisk vitenskap, kan mengden av forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse i sammensetningen varieres innen et bredt område. Generelt vil den sluttlige sammensetning omfatte ca. 1 vekt% til ca. 99,5 vekt% av en forbindelse ifølge oppfinnelsen, hvorved resten av vekten utgjøres av bærerstoffet  
15 eller bærerstoffene. Fortrinnsvis ligger nivået av aktiv forbindelse mellom ca. 10,0 vekt% til ca. 99 vekt%, og mest foretrukket mellom ca. 50 vekt% og ca. 99 vekt%, hvorved resten av vekten utgjøres av et egnet bærerstoff eller  
20 egnede bærerstoffer. Nyttige farmasøytiske bærerstoffer ved fremstilling av de farmasøytiske sammensetninger kan være faste stoffer, halvfaste stoffer, væsker eller gasser. Dermed kan sammensetningene anta formen av tabletter, piller, kapsler, pulvere, suppositorier, transdermale  
25 plasteryer, vedvarende frisettingsformuleringer, intravitreale implantater, løsninger, spesielt intravenøse løsninger, suspensjoner, eliksirer, aerosoler og lignende. Faste farmasøytiske bærerstoffer omfatter stivelser, så som kornstivelse, cellulose, talkum, glukose, laktose, sakkarose, gelatin, malt, ris, mel, kritt, kiselgel, magnesiumstearat, natriumstearat, stearinsyre, glyserolmonostearat, natriumklorid, tørket skummet melk og lignende. Flytende og halv-  
30 faste bærerstoffer kan velges fra vann, etanol, glyserol, propylenglykol, diverse oljer inkl. oljene av petroleum, animalsk, vegetabilsk eller syntetisk opprinnelse, f.eks. jordnøttolje, soyaolje, mineralolje, sesamolje og lignende. Vann, saltvann, vandig dekstrose og glykoler er de fore-

trukne flytende bærerstoffer, spesielt for injiserbare løsninger. Andre egnede farmasøytiske tilsetningsstoffer og bærerstoffer og deres formulering beskrives i "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) av E.W. Martin.

Den farmasøytiske sammensetning administreres fortrinnsvis i en enhetsdoseform, mer foretrukket i en oral doseringsform, for vedvarende behandling, eller i en enhetsdoseform ad libitum når lindring av symptomene er spesielt påkrevet.

Mens den bredeste definisjon av oppfinnelsen er beskrevet ovenfor som forbindelsen med formel I og dens farmasøytisk akseptable salter, foretrekkes (R,S)-blandingen og enkelte salter.

De følgende syrer foretrekkes ved dannelsen av farmasøytisk akseptable salter med forbindelsen med formel I: saltsyre, svovelsyre, fosforsyre, eddiksyre, metansulfonsyre, etansulfonsyre, 1,2-etandisulfonsyre, 2-hydroksyetansulfonsyre, benzensulfonsyre, p-klorbensensulfonsyre, 2-naftalensulfonsyre, p-toluensulfonsyre og kamforsulfonsyre. Mest foretrukket er sterke uorganiske syrer, så som saltsyre, svovelsyre eller fosforsyre.

De mest foretrukne forbindelser er 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinat-hydroklorid og -acetat. Disse forbindelser kan fremstilles som krystallinske stoffer og kan derfor lett innlemmes i stabile orale formuleringer. Orale og intravenøse formuleringer foretrekkes. De orale formuleringer har fordelene av en høy biologisk tilgjengelighet; de intravenøse formuleringer har fordelene at prodrogen ifølge oppfinnelsen i motsetning til intravenøse ganciclovirformuleringer kan fremstilles under anvendelse av en fysiologisk mer akseptabel pH-verdi (4 til 6). Den intravenøse formulering av ganciclovir krever en pH-verdi på 11, hvilket fører til irritasjon.

Det er underforstått at disse forbindelser er spesielt nyttige i de farmasøytiske sammensetninger og fremgangsmåter ved behandling ifølge foreliggende oppfinnelse.

I hvert siste trinn av fremgangsmåtene beskrevet heri, 5 vedrører henvisninger til formel I, II, III, IV, V eller VI slike formler hvor  $P^1$ ,  $P^2$  og  $P^3$ , A,  $Y^1$ ,  $Y^2$  og Z har sine bredeste definisjoner som beskrevet ovenfor, hvorved fremgangsmåtene spesielt vedrører de for tiden foretrukne utførelsesformer.

10 De foretrukne farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen inneholder et farmasøytisk akseptabelt salt av prodrogen med formel I. Dermed foretrekkes anvendelsen av farmasøytiske bærerstoffet som i naturlig tilstand er ikke-basiske, dvs. enten sure eller nøytrale, hvis fremstillingen av farmasøytiske formuleringer omfatter intim blanding 15 av det farmasøytiske bærerstoff og den aktive ingrediens i sin saltform.

Den for tiden foretrukne fremgangsmåte ved fremstilling av forbindelsen med formel I omfatter trinn (a), fortrinnsvis 20 utført i tilknytning med dannelsen av et salt av en forbindelse med formel I, eller trinn (c), eller en kombinasjon av trinn (a) og (c) (jfr. beskrivelsen av trinn III og IV nedenfor). Fremstillingen av monoesteren ifølge trinn (a) krever selektiv beskyttelse av én av de to primære hydroksylfunksjoner av ganciclovir eller dens derivat. Denne kan 25 generelt innebære beskyttelsen av aminogruppen i 2-stillingen av guaninbasen (jfr. den detaljerte beskrivelse nedenfor av trinn I til III i det tilfelle at prosedyren utføres med en beskyttet aminogruppe). I tillegg må aminogruppen av 30 aminosyrereagensmidlet beskyttes før forestringen (trinn III) utføres, for å unngå at den forstyrrer (amiddannelse) forestringsreaksjonen. Beskyttelsen av aminogruppen beskrives nedenfor.

Når man utøver en fremgangsmåte ifølge foreliggende oppfinnelse, må de amino-, hydroksy- eller karboksylgrupper som ikke skal delta i syntesen, beskyttes inntil (1) enten avbeskyttelse gir det sluttlige produkt; eller (2) en enkelt beskyttet gruppe skal delta i det følgende syntesetrinn; eller (3) nærværet av den ubeskyttede gruppe i de påfølgende reaksjonstrinn som fører til det sluttlige produkt, ikke vil forandre den ønskede reaksjonssekvens. Et eksempel for å møte krav (1) er benzylgruppen ved fremstilling av mono-esterne ifølge oppfinnelsen, som beskytter en primær hydroksylfunksjon av ganciclovir inntil den fjernes i avbeskyttelsestrinnet. Et eksempel for å møte krav (2) er den andre benzylgruppe som beskytter den primære hydroksylfunksjon i ganciclovir, hvilken fjernes direkte før esterifiseringstrinnet. Et eksempel for å møte krav (3) er acetylgruppen, eller trityl- eller monometoksytritylgruppen som beskytter aminogruppen i guaninringsystemet av ganciclovir, siden den ubeskyttede aminogruppe ikke forstyrrer forestringen (trinn III).

Generelt omfatter kvalifikasjonen av potensielle blokkeringsmidler, som gjør dem egnet for anvendelse ved fremstilling av forbindelsen med formel I:

(1) Deres innføring bør fremskride kvantitativt og jevnt, uten L-valin-racemisering.

(2) Det blokkerte mellomprodukt må være stabilt under de betingelser som anvendes inntil beskyttelsesgruppen skal fjernes.

(3) Den blokkerende gruppe må være lett å fjerne under betingelser som ikke forandrer de kjemiske egenskaper av resten av molekylet eller som resulterer i racemisering av L-valinkomponenten.

Alle utgangsprodukter (ganciclovir og L-valin) og de anvendte beskyttelses- og karboksylgruppeaktiverende reagens-

midler for fremstilling av forbindelsen med formel I er kjent. Også kjent er diverse aminobeskyttede L-valin-derivater, så som N-benzyloksykarbonyl-L-valin, BOC-L-valin og Fmoc-L-valin, N-formyl-L-valin og N-benzyloksykarbonyl-N-karboksy-L-valinanhydrid, hvilke alle er kommersielt tilgjengelige mellomprodukter eller beskrives i litteraturen, så som N-allyloksykarbonyl-L-valin.

Et foretrukket beskyttet ganciclovirutgangsmateriale ved fremstilling av den foretrukne forbindelse ifølge oppfinnelsen, er N<sup>2</sup>-acetyl-bis-O-benzyl-ganciclovir (N<sup>2</sup>-acetyl-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1,3-bis-(benzyloksy)propan), hvilken beskrives i US-patent nr. 4.355.032. Andre foretrukne beskyttede ganciclovirutgangsstoffer er N<sup>2</sup>-trityl-9-[(3-hydroksy-2-propoksy-1-trityloksy)metyl]guanin [N<sup>2</sup>-trityl-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1-trityloksypropan-3-ol] og N<sup>2</sup>-monometoksytrityl-9-[(3-hydroksy-2-propoksy-1-monometoksytrityloksy)metyl]guanin, hvis fremstilling beskrives i *J. Pharm. Sci.* 76(2), 180-184 (1987). 2-(2-Amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1,3-propandiyl-bis(L-valinat), som er utgangsproduktet ved det delvise hydrolysetrinn, beskrives i Europa-patentsøknaden med publikasjonsnummer 375 329.

Før utførelsen av trinn III (forestringstrinnet), må amino-gruppen av L-valin beskyttes for å unngå at den forstyrrer forestringen ved uønsket dannelselse av amid. De følgende aminobeskyttelsesgrupper er nyttige: halogenkarbonater, så som (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)aryl-lavere alkyl-karbonater (så som karbo-benzyloksygruppen avledet fra benzyklorkarbonat), eller bifenylalkylhalogenkarbonater, eller tertiære alkylhalogenkarbonater, så som tertiære butylhalogenkarbonater, spesielt tertiært butylklorkarbonat, eller di(lavere)alkyldikarbonater, spesielt di(t-butyl)-dikarbonat, trifenylmetylhalogenider, så som trifenylmetylklorid, og trifluoreddikanhydrid. Beskyttelsestrinnet utføres ved å oppløse eller suspendere L-valin i en alkalisk vandig løsning som kan omfatte en lavere alkanol.

Reaksjonsblandingen avkjøles mens det beskyttende reagensmiddel, så som halogenkarbonatet, fortrinnsvis i en vandig eller lavere alkanolløsning, tilsettes samtidig i små porsjoner. Under denne tilsetning holdes reaksjonsblandingen ved 0 til 30°C, fortrinnsvis 0 til 5°C, i flere timer før den får anta værelsestemperatur. Reaksjonsblandingen inndampes til tørrhet, og residuet fordeles mellom en organisk fase og vann. Det vandige sjikt surgjøres og ekstraheres med et organisk løsningsmiddel for den beskyttede aminosyre. Den organiske fase vaskes med vann og deretter med saltvann og tørkes over magnesiumsulfat før inndamping til tørrhet, og den N-beskyttede aminosyre isoleres og renses med vanlige isolerings- og renseteknikker.

#### 15 Fremstilling av mono-L-valinganciclovir

Trinn I: Ganciclovir, med en valgfritt beskyttet 2-aminogruppe og med begge primære hydroksylfunksjoner beskyttet, avbeskyttes delvis f.eks. ved hydrogenering, til ganciclovir med 2-aminogruppen fortsatt beskyttet og én beskyttet primær hydroksylfunksjon. Egnede aminobeskyttelsesgrupper er lavere alkanoylgrupper med fra 2 til 4 karbonatomer, spesielt en acetyl- eller propionylgruppe. Andre egnede aminobeskyttelsesgrupper er trityl- eller substituerte tritylgrupper, så som monometoksytritylgruppen og 4,4'-dimetoksytritylgruppen.

Egnede hydroksybeskyttelsesgrupper er eterdannende grupper som lett kan fjernes etter at de øvrige reaksjonstrinn er utført. Disse hydroksybeskyttende etergrupper omfatter benzyl- eller tritylgrupper. Disse grupper kan være substituert i fenylringen. Andre egnede hydroksybeskyttelsesgrupper omfatter allyleter, tetrahydropyranyl, silyl, trialkylsilyleter som kan fjernes med hydrogenfluorid på en måte som er velkjent for fagmannen.

Hydrogeneringen for å fjerne en hydroksybeskyttelsesgruppe utføres fortrinnsvis ved å oppløse den beskyttede ganciclovir i et løsningsmiddelsystem som frigir hydrogen i nærvær av en katalysator, så som en palladiumforbindelse, spesielt palladiumhydroksyd, ved overføringshydrogenering eller andre konvensjonelle hydrogeneringsprosedyrer. Andre egnede hydrogeneringskatalysatorer omfatter generelt hydrogeneringskatalysatorene, så som Pd, Pd på kull og homogene hydrogeneringskatalysatorer. Løsningsmiddelsystemet omfatter en lavere alkanol, så som metanol eller etanol og cykloheksen. Generelt vil omsetningen utføres ved en temperatur mellom værelsestemperaturen og tilbakeløpstemperaturen for løsningsmiddelsystemet, f.eks. i tilbakeløpende etanol og cykloheksen under en inert atmosfære og under utelukking av surstoff eller luft, fortrinnsvis under en nitrogenatmosfære. Katalysatoren gjenvinnes ved filtrering. Filtratet kan reduseres i volum ved inndamping av overflødig løsningsmiddel. Den erholdte ubehandlede reaksjonsblanding omfatter vanligvis uforandret utgangsmateriale og 2-aminobeskyttet ganciclovir med én beskyttet alifatisk hydroksygruppe som de hovedsaklige produkter. Separasjonen av disse to produkter utføres vanligvis ved isoleringsprosedyrer som er kjent innen faget; ofte ved kromatografi, fortrinnsvis over kiselgel, etterfulgt av eluering med egnede elueringsmidler, så som blandinger av en lavere alkanol med et halogenert lavere alkan (fortrinnsvis etanol og diklormetan) for å gi 2-aminobeskyttet ganciclovir hvor én alifatisk hydroksygruppe er beskyttet.

Trinn II: Ganciclovir med en beskyttet 2-aminogruppe og én beskyttet alifatisk hydroksygruppe utsettes for avbeskyttelse av aminogruppen. I dette trinn anvendes det basiske betingelser (pH-verdi mellom 9 og 14) for å fjerne beskyttelsesgruppen, hvis aminobeskyttelsesgruppen er en lavere alkanoylgruppe. F.eks. behandles N<sub>2</sub>-acetyl-mono-O-benzyl-ganciclovir med et alkalisk reagensmiddel, så som ammoniumhydroksyd, natrium- eller kaliumkarbonat eller natrium- eller kaliumhydroksyd, inntil fjerningen av acetylgruppen

er fullført. Generelt utføres denne omsetning i nærvær av et egnet løsningsmiddel, så som en lavere alkanol. Fortrinnsvis oppløses utgangsmaterialet i metanol, og det tilsettes et støkiometrisk overflod av ammoniumhydroksyd. Reaksjonstemperaturen holdes mellom 0 og 50°C, fortrinnsvis ved værelsestemperatur. Etter at omsetningen er fullført (hvilket kan bestemmes ved TLC), kan et ytterligere løsningsmiddel tilsettes for å underlette isoleringen av det avbeskyttede produkt, så som etyleter som fører til felning av det deacylerte produkt, hvilket så kan avfiltreres og isoleres under anvendelse av vanlige separasjonsteknikker.

Trinn III: I dette trinn forestres et aktivert derivat av aminobeskyttet L-valin med formel III med det beskyttede ganciclovirderivat som ble erholdt i trinn II. Egnede aminobeskyttelsesgrupper for L-valin er N-benzyloksykarbonylgruppen, ftalylgruppen, den tertiære butyloksykarbonylgruppe og N-(9-fluorenylmetoksykarbonyl)- eller "Fmoc"-gruppen.

Minst 1 ekvivalent av den beskyttede aminosyre og 1 ekvivalent av et egnet koblingsmiddel eller dehydreringsmiddel, f.eks. 1,3-dicykloheksylkarbodiimid eller salter av slike diimider med basiske grupper, bør anvendes fra begynnelsen av. Andre karbodiimider, så som N,N'-karbonyldiimidazol, kan også anvendes. Andre nyttige dehydreringsmidler er trifluoreddikanhydrid, blandede anhydrider, syreklorider, 1-benzotriazolyloksi-tris(dimetylamino)fosfoniumheksafluorfosfat, PYBOP, 1-hydroksybenzotriazol, 1-hydroksy-4-azabenzotriazol, 1-hydroksy-7-azabenzotriazol, N-etyl-N'-(3-(dimetylamino)propyl)karbodiimidhydroklorid, 3-hydroksy-3,4-dihydro-4-okso-1,2,3-benzotriazin, O-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroniumheksafluorfosfat, O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroniumtetrafluorborat, O-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-bis(tetrametylen)uroniumheksafluorfosfat eller O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-bis(tetrametylen)uroniumheksa-

fluorfosfat. En beskrivelse av disse koblingsmidler finnes i *J. Am. Chem. Soc.* 115, 4397-4398 (1993). Også nyttige i denne hensikt er uretanbeskyttede aminosyre-N-karboksy-anhydrider (UNCA'er), som er blitt beskrevet av Fuller et al., *J. Am. Chem. Soc.* 112, 7414-7416 (1990). Sammenfattet kan ethvert annet reagensmiddel, som gir et anhydrid eller et annet aktivert derivat av den beskyttede aminosyre under milde betingelser, anvendes som koblingsmiddel.

Den aminobeskyttede aminosyre oppløses i et inert løsningsmiddel, så som et halogenert lavere alkan, fortrinnsvis diklormetan, under en inert atmosfære, f.eks. nitrogen, og koblingsmidlet tilsettes (fortrinnsvis 1,3-dicykloheksylkarbodiimid). Reaksjonsblandingen omrøres ved temperaturer mellom 0 og 50°C, fortrinnsvis ved ca. værelsestemperatur.

Reaksjonsblandingen filtreres, og reaksjonsproduktet (anhydridet av den beskyttede aminosyre) isoleres. Det erholdte produkt oppløses i et tørt inert løsningsmiddel, så som tørt dimetylformamid (DMF), og plasseres under nitrogen. En løsning av en ekvimolar mengde av produktet fra trinn II i et inert løsningsmiddel tilsettes til ovennevnte løsning av anhydridet. Omsetningen utføres ved mellom 0 og 50°C, fortrinnsvis ved værelsestemperatur, i løpet av 5 til 90 timer. Reaksjonsproduktet kan isoleres og renses under anvendelse av kjente fremgangsmåter, så som kromatografi. Produktet vil vanligvis inneholde ureagert N-beskyttet aminosyre, som kan fjernes ved behandling av en ikke med vann blandbar løsning (organisk fase) av produktet med vandig alkali, så som natriumbikarbonat, natriumkarbonat, saltvann og blandinger derav. Fra den organiske fase kan ganciclovir-L-valinesteren med den beskyttede alifatiske hydroksygruppe og den N-beskyttede aminosyre isoleres og renses under anvendelse av konvensjonelle isolerings- og rensingsteknikker.

Trinn IV (Slutlig avbeskyttelse for å gi produktet med

formel I): De to beskyttelsesgrupper i produktet fra trinn III fjernes ved avbeskyttelsesreaksjoner, fortrinnsvis i et

surt medium eller løsningsmiddel, mest foretrukket ved hydrogenering. Avbeskyttelse under sure betingelser foretrekkes, siden dette vil sikre at aminogruppen som frigis i avbeskyttelsesreaksjonen protoneres, dvs. basen med formel I som dannes i avbeskyttelsesreaksjonen vil fanges av en minst støkiometrisk mengde tilstedeværende syre. Å isolere forbindelsen med formel I som et syreaddisjonssalt vil beskytte den ønskede stereokonfigurasjon av forbindelsen med formel I. Derfor viser de eksempler nedenfor som viser avbeskyttelsestrinnet (a), også det tilknyttede salt-

5  
10

Avbeskyttelsesomsetningen utføres ved å oppløse produktet av forestringstrinnet i et inert løsningsmiddel, fortrinnsvis i et surt løsningsmiddel, under anvendelse av en hydrogeneringskatalysator, så som palladium på kull eller platina, under anvendelse av et hevet hydrogentrykk mellom 1 og 2000 psi, fortrinnsvis 20 til 200 psi. Fullføringen av omsetningen kan overvåkes under anvendelse av konvensjonell tynnsjikt-kromatografisk (TLC) analyse. Hydrogeneringen fortsettes inntil omdannelsen er fullstendig, hvis nødvendig under tilsetning av ytterligere hydrogeneringskatalysator. Katalysatoren fjernes og vaskes. De sammenslåtte filtrater fra filtreringen og vaskingen inndampes og lyofiliseres for å isolere ganciclovir-L-valinesteren. Rensing av produktet og isoleringen av en krystallinsk ester utføres ved omkrystallisasjon eller en annen renseteknikk, så som væsekromatografiske teknikker.

15  
20  
25

Hvis den tertiære butyloksykarbonylgruppe anvendes som aminobeskyttelsesgruppe, utføres dens fjerning med syre, så som HCl og isopropanol som løsningsmiddel, eller med ren trifluoreddiksyre.

30

Alternativt, hvis forestringstrinnet ble utført med et trityl- eller substituert tritylbeskyttet ganciclovir-derivat, kan slike beskyttelsesgrupper fjernes ved behandling med vandig alkansyre eller trifluoreddiksyre eller

35

saltsyre, ved temperaturer mellom  $-20^{\circ}\text{C}$  og  $100^{\circ}\text{C}$ , f.eks. vandig eddiksyre.

Allylgrupper fjernes ved isomerisering til vinyleterne med rhodium- eller palladiumkatalysatorer, etterfulgt av sur vandig hydrolyse.

Andre fremgangsmåter ved fremstilling [Trinn (b), (d) og (e)]: En fagmann vil merke at forbindelsen med formel I også kan fremstilles som et syreaddisjonssalt eller som den tilsvarende frie base. Hvis den fremstilles som et syreaddisjonssalt, kan forbindelsen omdannes til den frie base ved behandling med en egnet base, så som ammoniumhydroksyd-løsning, natriumhydroksyd, kaliumhydroksyd eller lignende. Det er imidlertid viktig å påpeke at den frie base med formel I er vanskeligere å karakterisere enn dens syreaddisjonssalter. Når man omdanner den frie base til et syreaddisjonssalt, omsettes forbindelsen med en egnet organisk eller uorganisk syre (beskrevet tidligere). Disse omsetninger utføres ved behandling med en minst støkiometrisk mengde av en egnet syre (i tilfellet av fremstillingen av et syreaddisjonssalt) eller base (i tilfellet av frigivning av den frie forbindelse med formel I). I det saltdannende trinn ifølge oppfinnelsen, oppløses den frie base vanligvis i et polart løsningsmiddel, så som vann eller en lavere alkanol (fortrinnsvis isopropanol) og blandinger derav, og syren tilsettes i den nødvendige mengde i vann eller i en lavere alkanol. Reaksjonstemperaturen holdes vanligvis ved ca.  $0$  til  $50^{\circ}\text{C}$ , fortrinnsvis ved værelsestemperatur. Det tilsvarende salt felles spontant eller kan bringes ut av løsningen ved tilsetning av et mindre polart løsningsmiddel, fjerning av løsningsmidlet ved inndamping eller under vakuum, eller ved avkjøling av løsningen.

Reaksjonsbetingelsene av kondensasjonstrinnet (d) beskrives i Europa-patentsøknaden med publikasjonsnummer 187 297. Dette kondensasjonstrinn er en av de foretrukne fremgangsmåter ved fremstilling av diastereomerene av monoesteren. I

dette kondensasjonstrinn omsettes guanin, fortrinnsvis med en beskyttet 2-aminogruppe, med et glyserolderivat. Glyserolderivatet, så som 1-halogen-3-benzyløksy-2-acyløksymetoksyglyserol, omsettes med guanin eller et

5 substituert guaninderivat i et aprotisk hydrokarbonløsningsmiddel (så som benzen eller toluen eller ksylenere) eller DMF med et heksa-lavere alkylsilazan, f.eks. heksametylsilazan, heksaetylsilazan eller lignende, og en katalysator ved temperaturer mellom 30°C og

10 tilbakeløpstemperaturen. Katalysatoren er et Lewissyresalt, så som trialkylsilylsalt, så som sulfatet, eller et trifluoralkylsulfonat, et klorsilan eller ammoniumsulfat og pyridin. For en nærmere beskrivelse av reaksjonsbetingelsene for kondensasjonstrinnet (d), jfr. beskrivelsen i Europa-patentsøknaden med publikasjonsnummer

15 187 297. Generelt må Y<sup>1</sup> og Y<sup>2</sup> velges slik at de gjør det mulig å oppnå mono-L-valinesteren med formel I. Y<sup>1</sup> kan være en aminobeskyttet L-valinylgruppe eller en gruppe som kan omdannes til L-valinylgruppen.

20 Forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse kan også fremstilles fra 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)-metoksy-1,3-propandiyl-bis(L-valinat), som beskrives i Europa-patentsøknaden med publikasjonsnummer 375 329. Omdannelsen til 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)-

25 metoksy-3-hydroksey-1-propanyl-L-valinat utføres ved delvis hydrolyse [trinn (e)] av en L-valinestergruppe under kontrollerte betingelser som fører til preferansespaltningen av kun ett aminosyreacylresiduum. Et salt av 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-okso-9H-purin-9-yl)metoksy-1,3-propandiyl-

30 bis-L-valinat, fortrinnsvis som bis-acetatsaltet, oppløses i deionisert vann og nøytraliseres delvis med en svak base, så som en fortynnet ammoniumhydroksyd løsning. Blandingen holdes ved værelsestemperatur i fra 1 til flere dager, fortrinnsvis i 48 til 72 timer.

35 Alternativt kan det anvendes enzymatisk hydrolyse med en esterase, så som porcine esterase, eller en peptidase, så

som en karboksypeptidase, anvendes for å gjennomføre en delvis hydrolyse.

Monoesteren kan separeres fra bis-esteren ved preparativ kromatografi under svakt sure betingelser (pH 3 til 5, fortrinnsvis pH 4). Løsningsmidlet som anvendes for den kromatografiske separasjon fjernes, og 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-okso-9H-purin-9-yl)metoksy-3-hydroksey-1-propanyl-L-valinatsaltet isoleres som en blanding av to diastereomerer.

#### 10 Isolering av stereoisomerene

Fra formel (I) er det åpenbart at forbindelsen ifølge oppfinnelsen har et asymmetrisk karbonatom (chiralt senter) i propanylkjeden, i tillegg til det asymmetriske karbonatom i L-valin. Derfor finnes det to diastereomere former, (R)- og (S)-formen som bestemt ved reglene til Cahn et al.

Et antall fremgangsmåter som er egnet for separasjonen av diastereomerer kan anvendes, men de foretrukne fremgangsmåter anvender teknikker som utnytter de forskjellige fysiske egenskaper av de to diastereomerer. Generelt separeres diastereomerene ved kromatografi, men det foretrekkes separasjons-/spaltningssteknikker som er avhengig av løselighetsforskjeller, så som fraksjonell krystallisasjon.

Detaljer av separasjonsteknikkene som kan anvendes ved fremstillingen av diastereomerer med formel I, beskrives av Jean Jacques, André Collet, Samuel H. Wilen, *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, John Wiley & Sons, Inc. (1981).

Alternativt kan forbindelsen ifølge oppfinnelsen fremstilles ved anvendelse av optisk aktive reagensmidler. Når det fremstilles rene diastereomerer av mono-L-valinganciclovir, er kondensasjonstrinnet (d) den foretrukne syntesemetode. Hvis det imidlertid anvendes optisk aktive reagensmidler, er det viktig å unngå pH-verdier på over 6, siden omdannel-

sen av den frie forbindelse med formel I finner sted ved en høyere pH-verdi. F.eks. har de diastereomere blandinger med formel I ved pH 7 og 40°C en halveringstid på mindre enn 1 time.

5 Stereokonfigurasjonen i det andre chirale senter av forbindelsen med formel I kan bestemmes ved sirkulær dikroisme, fortrinnsvis ved enkeltkrystallrøntgenanalyse av et tungt atomderivat, eller korrelasjon med materiale som fremstilles ved total syntese fra et enkelt glyserolenantiomer med  
10 kjent konfigurasjon.

Fremstilling av krystallinsk 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-okso-purin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinat

Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan fremstilles og er blitt fremstilt i krystallinsk form. Dette er en stor  
15 fordel over forbindelsene som er kjent i teknikkens stand, hvilke er blitt beskrevet som ikkekrystallinske stoffer. Fordelen ligger i at det er lettere å fremstille farmasøytiske formuleringer med et krystallinsk stoff. Et krystallinsk stoff kan behandles virksomt og er mer gjenfremstilt  
20 bart kjennetegnet enn et ikkekrystallinsk stoff, og kvaliteten av det krystallinske stoff ifølge oppfinnelsen er lettere å bestemme enn kvaliteten av et ikkekrystallinsk stoff.

For å fremstille et krystallinsk stoff, foretrekkes det å  
25 anvende et salt av 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinat. Foretrukne krystallinske salter er acetatet og hydrokloridsaltet. Det foretrekkes å starte krystallisering av saltet ved å oppløse hydroklorid- eller acetatsaltet i vann og tilsette et  
30 organisk løsningsmiddel som er blandbart med vann, så som metanol, etanol, isopropanol, tetrahydrofuran eller acetonitril. Alternativt kan hydrokloridsaltet krystalliseres fra en vannfri lavere alkanolløsning, så som metanol, etan-

ol, ved tilsetning av andre organiske løsningsmidler, så som etylacetat, isopropanol, tetrahydrofuran eller toluen.

De følgende fremstillinger og eksempler gis for å gjøre det mulig for fagmannen å klarere forstå og utøve foreliggende oppfinnelse. De skal ikke forstås å begrense rammen for oppfinnelsen, men kun å illustrere og representere den.

#### EKSEMPEL 1

#### Fremstilling av (S)-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-benzyloksypropan-1-ol

10 A. (R)-(1-Klor-2-acetoksymetoksy-3-benzyloksy)propan

HCl-gass (tørket ved å passeres gjennom konsentrert H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ble boblet gjennom en omrørt blanding av (S)-(+)-benzyloksymetyloksyran (500 mg; 3,06 mmol) og paraformaldehyd (201 mg; 6,71 mmol) i diklormetan (8 ml) ved 0°C inntil alt det faste stoff var oppløst (ca. 45 minutter). Den erholdte løsning ble lagret ved 0°C i 16 timer. Etter tørking med magnesiumsulfat ble løsningsmidlet inndampet for å gi (R)-(1-klor-2-klormetoksy-3-benzyloksy)propan. Dette klormetyl-etermellomprodukt ble oppløst i aceton (3 ml) og tilsatt dråpevis til en blanding av kaliumacetat (2,1 g; 21,4 mmol) i aceton (7 ml). Blandingen ble omrørt ved omgivelsestemperatur i 16 timer. Det faste stoff ble avfiltrert, og filtratet ble konsentrert. Residuet ble tatt opp i 20 ml toluen, og løsningen ble vasket med mettet natriumbikarbonatløsning (10 ml) og vann (2x20 ml). Det organiske sjikt ble tørket over natriumsulfat. Etter filtrering ble filtratet konsentrert, og residuet ble rensert ved "flash"-kromatografi over kiselgel (heksan/etylacetat = 7/1) for å gi (R)-(1-klor-2-acetoksymetoksy-3-benzyloksy)propan (810 mg; 2,97 mmol) som en farveløs olje i 97% utbytte (isomerforholdet var 12:1).

B. (R)-2-(2-Amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1-klor-3-benzyloksypropan

En løsning av persilylert guanin (1,09 g; 2,95 mmol) i DMF (3,2 ml) ble tilsatt til 810 mg (R)-(1-klor-2-acetoksy-  
5 metoksy-3-benzyloksy)propan. Løsningen ble omrørt ved 130°C i 1 time før tilsetning av trimetylsilyltrifluormetansulfonat. Omrøringen ble fortsatt ved samme temperatur i 4 timer. Blandingen ble avkjølt til værelsestemperatur og fordelt mellom vann og etylacetat. Det vandige sjikt ble ekstrahert grundig med etylacetat. Det sammenslåtte organiske sjikt ble tørket over magnesiumsulfat, filtrert og inndampet. Residuet ble rensert ved kromatografi over kiselgel for å gi (R)-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1-klor-3-benzyloksypropan samt dennes N-7-isomer. Forholdet  
10 av N-9- til N-7-isomeren var ca. 2,3:1.

C. (R)-2-(2-Amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1-acetoksy-3-benzyloksypropan

En blanding av produktet fra det foregående trinn, kaliumacetat (stort overflod) og DMF ble oppvarmet under tilbake-  
20 løp i 5 timer. Den beholdte brune blanding ble avkjølt til værelsestemperatur og filtrert gjennom en plugg av Celite. Filteret ble rensert med metanol. Filtratet ble inndampet, og gjenblivende DMF ble fjernet under vakuum. Det ubehandlede produkt ble rensert ved "flash"-kromatografi over  
25 kiselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:metanol = 10:1) for å gi (R)-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1-acetoksy-3-benzyloksypropan som et svakt gult fast stoff.

D. (S)-2-(2-Amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-benzyloksypropan-1-ol

30 En blanding av (R)-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1-acetoksy-3-benzyloksypropan i 30% ammoniakk/metanol (1:2) ble omrørt ved omgivelsestemperatur i 18 timer. Løsningsmidlet ble inndampet, og residuet ble tritu-

rert med en liten mengde metanol. Det svakt gule faste stoff ble samlet for å gi (S)-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-benzyloksypropan-1-ol. Modervæsken ble konsentrert, og residuet ble omkrystallisert fra varm metanol for å gi et andre utbytte av produktet.

#### EKSEMPEL 2

#### Fremstilling av 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)-metoksy-3-benzyloksypropan-1-ol

- A. N2-Acetyl-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)-metoksy-1,3-bis(benzyloksy)propan (54,2 g; 114 mmol) ble oppløst i tilbaketilbakependende etanol (815 ml), og sykloheksen (610 ml) ble tilsatt under en nitrogenatmosfære. En oppslemming av palladiumhydroksyd (16 g) i etanol (50 ml) ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og blandingen ble oppvarmet under tilbaketilbakependende og under nitrogen i 1,5 time. Den varme blanding ble filtrert gjennom Celite, og filtratet ble inndampet i en rotasjonsfordamper. Den erholdte ubehandlede reaksjonsblanding ble kromatografert over kiselgel. Eluering med 8% metanol/92% diklormetan etterfulgt av 10% metanol/90% diklormetan gav N2-acetyl-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1,3-bis(benzyloksy)propan (utgangsstoff) (18,6 g; 16%) og N2-acetyl-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-benzyloksypropan-1-ol (17,6 g; 40%).
- B. N2-Acetyl-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)-metoksy-3-benzyloksypropan-1-ol (21,9 g; 56,5 mmol) ble oppløst i metanol (200 ml), og det ble tilsatt ammoniumhydroksyd (101 ml). Blandingens ble omrørt over natten ved værelsestemperatur. Etyleter (400 ml) ble tilsatt til den hvite oppslemming, og blandingen ble filtrert. Felningen ble vasket med etter hverandre etyleter (100 ml), vann (100 ml) og etyleter (100 ml) og tørket under høyvakuu over natten, hvilket gav 15,9 g (46,13 mmol; 82%) 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-benzyloksypropan-1-

ol. Inndamping av filtratet og suspensjon av den erholdte felning i etyleter (200 ml) etterfulgt av filtrering og tørking under høyvakuum gav ytterligere 2,3 g (6,7 mmol; 12%) av produktet.

5 Analyse:

Beregnet for  $C_{16}H_{19}N_5O_4$  (345,36): C 55,65; H 5,55; N 20,28

Funnet: C 55,25; H 5,60; N 20,12.

EKSEMPEL 3

10 Fremstilling av 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)-metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinat

A. 2-((2-Amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy)-3-benzyloksy-1-propanyl-N-(benzyloksykarbonyl)-L-valinat

N-Benzyloksykarbonyl-L-valin (43,66 g; 0,174 mol; 3 ekvivalenter) ble suspendert i diklormetan (72 ml), og det ble  
15 tilsatt 1,3-dicykloheksylkarbodiimid (14,34 g; 69,5 mmol; 1,2 ekvivalenter). Blandingen ble omrørt under nitrogen i 48 timer. Blandingen ble filtrert gjennom en glassfritte, og det hvite faste residuum ble vasket med diklormetan (75 ml). Det sammenslåtte filtrat ble omrørt under nitrogen, og  
20 det ble tilsatt en suspensjon av 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-benzyloksypropan-1-ol (20 g; 57,91 mmol; 1 ekvivalent) i dimetylformamid (90 ml), etterfulgt av 4-dimetylaminopyridin (1,77 g; 14,4 mmol; 0,25 ekvivalenter). Blandingen ble omrørt under nitrogen i 18 timer,  
25 helt i vann (1200 ml) og ekstrahert med en blanding av etylacetat (350 ml) og toluen (350 ml). Det vandige sjikt ble separert, og det organiske sjikt ble vasket med halvmettet natriumbikarbonat (600 ml), etterfulgt av vann (200 ml). Det organiske sjikt ble tørket over magnesiumsulfat og  
30 inndampet under redusert trykk. Residuet ble felt fra en blanding av etylacetat og cykloheksan for å gi 2-((2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy)-3-benzyloksy-1-pro-

panyl-N-(benzyloksykarbonyl)-L-valinat som et amorft fast stoff.

B. 2-(2-Amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinathydroklorid

5 2-((2-Amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy)-3-benzyl-  
oksy-1-propanyl-N-(benzyloksykarbonyl)-L-valinat (224,8 g;  
0,39 mol) ble oppløst i metanol (1,2 l), og det ble tilsatt  
dråpevis konsentrert saltsyre (32,4 ml; 0,39 mol). Blandin-  
gen ble plassert under nitrogen, og det ble tilsatt palla-  
10 dium på kull (67,4 g). Blandingen ble hydrogenert i en  
Parr-bombe under hydrogen (40-100 psi, gjennomsnittlig 80  
psi trykk) i 48 timer. Det ble tilsatt ytterligere 5 g  
palladium på kull, og blandingen ble hydrogenert ved 100  
psi i 24 timer. Blandingen ble filtrert gjennom en Celite-  
15 pute, og residuet ble vasket med metanol (1 l). Filtratet  
ble inndampet til tørrhet under redusert trykk. Residuet  
ble oppløst i vann (150 ml) og oppvarmet til 60°C. Isopro-  
panol (830 ml) ble langsomt tilsatt dråpevis under omrøring  
idet man holdt temperaturen stabil (60-70°C). Løsningen ble  
20 langsomt avkjølt til omgivelsestemperatur i løpet av 16  
timer. Den erholdte krystallinske løsning ble oppvarmet til  
30°C, og det ble tilsatt ytterligere isopropanol (220 ml).  
Blandingen fikk langsomt avkjøles til en slutlig temperatur  
på -11°C i løpet av 4 timer. Krystallene ble isolert ved  
25 filtrering og vasket med 200 ml kald 2% vann/isopropanol  
for å gi 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-  
hydroksy-1-propanyl-L-valinathydroklorid (120,5 g; 79% ut-  
bytte). Forbindelsen gjennomgår en faseforandring ved 142°C  
og spaltes ved 175°C.

30 EKSEMPEL 4

Fremstilling av krystallinsk 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-  
oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinatsalt

2-(2-Amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinathydroklorid (150 g) ble oppløst i vann (150 ml) og oppvarmet til 50-60°C. Det ble langsomt tilsatt dråpevis under omrøring isopropanol (830 ml) idet man øket  
5 temperaturen noe til 60-70°C. Løsningen ble langsomt avkjølt til 25°C i løpet av 20 timer. Den erholdte krystallinske løsning ble oppvarmet til 30°C, og det ble tilsatt ytterligere isopropanol (220 ml). Blandingen fikk langsomt avkjøles til en slutlig temperatur på -11°C i løpet av 6  
10 timer. Krystallene ble isolert ved filtrering og vasket med 200 ml kald 2% vann/isopropanol for å gi 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinathydrokloridkrystaller (135 g; 90% utbytte). Forbindelsen gjennomgår en faseforandring ved 142°C og spaltes  
15 ved over 175°C.

På lignende måte kan 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinatacetat fremstilles i krystallinsk form.

#### EKSEMPEL 5

20 Fremstilling av (S)-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinathydroklorid

A. (S)-2-((2-Amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-benzyloksy-1-propanyl-N-(benzyloksykarbonyl)-L-valinat

N-Benzyloksykarbonyl-L-valin (437 mg; 1,74 mmol; 3 ekvivalenter) suspenderes i diklormetan (1 ml), og det tilsettes  
25 1,3-dicykloheksylkarbodiimid (143 mg; 0,7 mmol; 1,2 ekvivalenter). Blandingen omrøres under nitrogen i 48 timer. Blandingen filtreres gjennom en glassfritte, og det hvite faste residuum vaskes med diklormetan (1 ml). Det sammen-  
30 slåtte filtrat omrøres under nitrogen, og det tilsettes en suspensjon av (R)-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-benzyloksypropan-1-ol (200 mg; 0,58 mmol; 1 ekvivalent) i dimetylformamid (1,5 ml), etterfulgt av 4-

dimetylaminopyridin (18 mg; 14,4 mmol; 0,25 ekvivalenter). Blandingen omrøres under nitrogen i 18 timer, helles i vann (12 ml) og ekstraheres med en blanding av etylacetat (3,5 ml) og toluen (3,5 ml). Det vandige sjikt separeres, og det 5 organiske sjikt vaskes med halvmettet natriumbikarbonat (6 ml), etterfulgt av vann (2 ml). Det organiske sjikt tørkes over magnesiumsulfat og konsentreres under redusert trykk. Residuet felles fra en blanding av etylacetat og sykloheksan for å gi (S)-2-((2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy)-3-benzyloksy-1-propanyl-N-(benzyloksykarbonyl)- 10 L-valinat som et fast stoff.

B. (S)-2-(2-Amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinathydroklorid

(S)-2-(2-Amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-benzyloksy-1-propanyl-N-(benzyloksykarbonyl)-L-valinat (225 15 mg; 3,9 mol) oppløses i metanol (12 ml), og det tilsettes konsentrert saltsyre (0,3 ml; 3,9 mmol). Blandingen plasse- res under nitrogen, og det tilsettes palladium på kull (674 mg). Blandingen hydrogeneres i en Parr-bombe under hydrogen 20 (40-100 psi; gjennomsnittlig 80 psi trykk) i 48 timer. Det tilsettes ytterligere 50 mg palladium på kull, og blandin- gen hydrogeneres ved 100 psi i 24 timer. Blandingen filtre- res gjennom en Celite-pute, og residuet vaskes med metanol (10 ml). Filtratet inndampes til tørrhet under redusert 25 trykk. Residuet oppløses i vann (1,5 ml) og oppvarmes til 60°C. Det tilsettes langsomt under omrøring isopropanol (8 ml) idet man holder temperaturen stabil (60-70°C). Løsning- en avkjøles langsomt til omgivelsestemperatur i løpet av 16 timer. Den erholdte løsning oppvarmes til 30°C, og det 30 tilsettes ytterligere isopropanol (2 ml). Blandingen får langsomt avkjøles til en slutlig temperatur på 11°C i løpet av 4 timer. Krystallene isoleres ved filtrering og vaskes med 2 ml kald 2% vann/isopropanol for å gi (S)-2-(2-amino- 1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl- 35 L-valinathydroklorid.

EKSEMPEL 6

Fremstilling av 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)-metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinataacetat fra 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1,3-propandiyl-bis-(L-valinat)-bis-acetat

2-((2-Amino-1,6-dihydro-6-okso-9H-purin-9-yl)metoksy)-1,3-propandiyl-bis-(L-valinat)-bis-eddiksyresalt (100 mg; en lyofilisert prøve inneholdt 0,6 ekvivalenter overflodig eddiksyre; 0,164 mmol [= totalt 0,426 mmol eddiksyre]) ble  
10 oppløst i deionisert vann (0,4 ml) og delvis nøytralisert ved tilsetning av 24 ml 0,015M ammoniumhydroksydøsning (=0,36 mmol). Blandingen fikk stå ved værelsestemperatur i 67 timer. Prøven ble injisert i to like deler på en preparativ revers fase HPLC-kolonne (YMC-pakning; ODS-AM DM-33-  
15 5; 2 x 250 mm; YMC Inc.). Separasjon ble oppnådd med et løsningsmiddelsystem av 10% metanol/90% 0,1M ammoniumacetat bufret til pH 4 med eddiksyre; flyte-hastighet: 9,5 ml/min., og detektoren innstilt til 256 nm. De to topper som representerer de to diastereomerer av monoesterproduktet ble  
20 samlet. Løsningsmidlet ble inndampet til ca. 2 ml under høyvakuum, og residuet ble lyofilisert to ganger fra vann inneholdende eddiksyre (0,1%) for å fjerne bufferen. 45 mg (0,112 mmol = 68%) 2-((2-amino-1,6-dihydro-6-okso-9H-purin-9-yl)-metoksy)-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinateddiksyresalt  
25 ble isolert som en blanding av to diastereomerer med de følgende kjenne-tegnende topper i NMR-spektret: <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz) DMSO-d<sub>6</sub>-løsning: δ 7,78 (1H, s, H C-8), 6,48 og 6,45 (2 br.s., 2H, NH<sub>2</sub>), 5,44 (mAB, J=11Hz) og 5,43 (s) totalt 2H, CH<sub>2</sub>; 1,91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 0,83 + 0,82 (2d, J=7Hz, 3H, CH<sub>3</sub>),  
30 0,75 + 0,76 (2d, J=7Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

EKSEMPEL 7

Separasjon av (R,S)-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinat

En løsning av (R,S)-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksey-1-propanyl-L-valinat (1,66 g) i 90% 0,1M ammoniumacetat, surgjort til pH 4 med eddiksyre, 10% metanol (9,60 ml) ble tilsatt til en YMC-pakning ODS-AM  
5 HPLC-kolonne (katalog-nr. DM-33-5; størrelse 250 x 20 mm I.D.; partikkel, S-5 mm; 120 A) i 48 injeksjoner på 200 µl med eluering ved 9,5 ml/min. under anvendelse av en mobil fase av 90% 0,1M ammoniumacetat surgjort til pH 4 med eddiksyre, 10% metanol. Toppene ble påvist under anvendelse  
10 av en Knauer variabel bølgelengdemonitor innstilt til 256 nm, og fraksjonene ble samlet manuelt. Tre sett fraksjoner ble samlet: topp 1 (retensjonstid 24,4 min.), en overlappende region mellom toppene og topp 2 (retensjonstid 27,8 min.). Fraksjonene fra hvert sett ble slått sammen, inndampet under redusert trykk for å fjerne metanolen og deretter lyofilisert for å fjerne de gjenblivende flyktige komponenter. Residuet ble oppløst i vann, surgjort til pH 4 med eddiksyre og lyofilisert igjen, hvilket gav topp 1 (1,57 g) og topp 2 (0,91 g). HPLC-analyse av produktene  
15 under anvendelse av en YMC-pakning ODS-AM-kolonne (katalog-nr. RM-33-5; størrelse 250 x 4,6 mm I.D.; partikkel, S-5 mm; 120 A) under eluering ved 0,5 ml/min. under anvendelse av en mobil fase av 90% 0,1M ammoniumacetat, surgjort til pH 4 med eddiksyre, 10% metanol, viste at topp 1 (retensjonstid 24,4 min. på den preparative kolonne) inneholdt en  
20 blanding av 70,8% topp 1 (retensjonstid 21,1 min.), 26,4% topp 2 (retensjonstid 24,6 min.) og 2,8% fullt hydrolysert produkt (retensjonstid 12,4 min.); og topp 2 (retensjonstid 27,8 min. på den preparative kolonne) inneholdt en blanding  
25 av 68,5% topp 2 (retensjonstid 22,0 min.), 27,5% topp 1 (retensjonstid 20,2 min.) og 4% fullt hydrolysert produkt (retensjonstid 11,6 min.). Topp 2 (0,91 g) og topp 1 (1,57 g) ble begge oppløst i 90% 0,1M ammoniumacetat surgjort til pH 4 med eddiksyre, 10% metanol (3,60 ml) og rensset igjen  
30 under anvendelse av det ovenfor beskrevne system med 18 injeksjoner på 200 µl. To sett fraksjoner som tilsvarte topp 1 og 2 ble samlet, slått sammen og delvis inndampet under redusert trykk for å fjerne metanolen, og resten ble

lyofilisert for å fjerne de gjenblivende flyktige komponenter. Residuet fra hvert sett fraksjoner ble oppløst i vann, forsiktig surgjort til pH 4 med eddiksyre og igjen lyofilisert. Fraksjonene som tilsvarte topp 1 gav et hvitt, dunaktig fast stoff (0,70 g) som virket hygroskopisk når det ble utsatt for luft; HPLC-analyse (utført som beskrevet ovenfor) viste at dette var en blanding inneholdende 94,9% topp 1 (retensjonstid 21,1 min.), 4,6% topp 2 (retensjonstid 26,7 min.) og 0,5% fult hydrolysert produkt (retensjonstid 11,8 min.); <sup>1</sup>H-NMR-analyse (<sup>d6</sup>DMSO, δ-verdier oppgitt i forhold til tetrametylsilan som intern standard) oppviste de kjennetegnende topper δ 5,43 (m<sub>AB</sub>, 2H, J<sub>AB</sub> = 11,1 Hz, d<sub>A</sub> 5,44, d<sub>B</sub> 5,43), 3,02 (d, 1H, J=5,2 Hz), 0,82 (d, 3H, J=6,8 Hz), 0,75 (d, 3H, J=6,8 Hz). Fraksjonene som tilsvarte topp 2 gav et hvitt, dunaktig fast stoff (0,81 g), som virket hygroskopisk når det ble utsatt for luft; HPLC-analyse (utført som beskrevet ovenfor) viste at dette var en blanding inneholdende 91,0% topp 2 (retensjonstid 29,8 min.), 8,4% topp 1 (retensjonstid 28,4 min.) og 0,6% fult hydrolysert produkt (retensjonstid 14,4 min.); <sup>1</sup>H-NMR-analyse (<sup>d6</sup>DMSO, δ-verdier oppgitt i forhold til tetrametylsilan som intern standard) oppviste de kjennetegnende topper δ 5,43 (s, 2H), 2,99 (d, 1H, J=5,2 Hz), 0,83 (d, 3H, J=6,8 Hz), 0,76 (d, 3H, J=6,8 Hz).

#### 25 EKSEMPEL 8

A. Fremstilling av (R)-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-okso-purin-9-yl)metoksy-3-benzyloksy-1-propanyl-(N-benzyloksykarbonyl)-L-valinat

Til en løsning av N-benzyloksykarbonyl-L-valin (327 mg; 1,30 mmol; 3 ekvivalenter) i diklormetan (25 ml) under nitrogen ble det tilsatt 1,3-dicykloheksylkarbodiimid (134 mg; 0,65 mmol; 1,5 ekvivalenter), og reaksjonsblandingen ble omrørt ved værelsestemperatur i 13,5 time. Den erholdte blanding ble filtrert for å fjerne det uløselige materiale, og løsningsmidlet ble inndampet under redusert trykk under

anvendelse av en rotasjonsfordamper. Det erholdte hvite skum ble oppløst i tørr DMF (10 ml) og tilsatt direkte til en løsning av (S)-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)-metoksy-3-benzylloxy-1-propan-1-ol (150 mg; 0,43 mmol; 1 ekvivalent), også i tørr DMF (10 ml). 4,4-Dimetylaminopyridin (13 mg; 0,11 mmol; 0,25 ekvivalenter) ble tilsatt til DMF-løsningen, og reaksjonsblandingen ble omrørt ved værelsestemperatur i 27 timer, ved hvilket tidspunkt TLC-analyse viste at utgangsmaterialet var oppbrukt. Reaksjonsblandingen ble inndampet under redusert trykk, og det ubehandlede produkt ble renset ved "flash"-kromatografi under anvendelse av en mobil fase av 95% metylenklorid og 5% metanol for å gi tittelforbindelsen som et amorft fast stoff (158 mg; 63%).

B. Fremstilling av (R)-2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydrokso-1-propanyl-L-valinathydroklorid

(R)-2-(2-Amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-benzylloxy-1-propanyl-(N-benzylloxykarbonyl)-L-valinat (158 mg; 0,27 mmol) ble oppløst i metanol (15 ml), og det ble tilsatt konsentrert saltsyre (24 ml; 0,27 mmol). Blandingen ble plassert under nitrogen, og det ble tilsatt 10% palladium på kull (48 ml). Blandingen ble hydrogen i en Parr-ryster under hydrogen (50 psi trykk) i 5 timer. Blandingen ble filtrert gjennom en Celite-pute, og residuet ble vasket med metanol (25 ml). Inndamping av det sammenslåtte filtrat og vaskinger under redusert trykk gav tittelforbindelsen (107 mg; 95%). HPLC-analyse av produktet under anvendelse av en YMC-pakning ODS-AM-kolonne (katalog-nr. RM-33-5; størrelse 250 x 4,6 mm I.D.; partikkel, S-5 mm; 120 Å) under eluering ved 0,5 ml/min. under anvendelse av en mobil fase av 90% 0,1M ammoniumacetat surgjort til pH 4 med eddiksyre og 10% metanol, viste at det var en 85:15-blanding av (R)- og (S)-diastereomerer.

EKSEMPEL 9Bestemmelse av den orale absorpsjon (biologisk tilgjengelighet) i rotte

Følgende test ble anvendt for å bestemme den orale absorpsjon (oral biologisk tilgjengelighet) av forbindelsen med formel I (L-monovalinesteren av ganciclovir), og andre gancicloviraminosyreestere, andre ganciclovirestere og -etere som ble testet i sammenlignende hensikt.

For å måle den orale biologiske tilgjengelighet av en forbindelse ble først plasmanivået av forbindelsen i rotte av hannkjønn bestemt etter en enkelt oral (po) dose av forbindelsen. For å måle den orale biologiske tilgjengelighet av en prodroge, ble først plasmanivået av den aktive forbindelse, i dette tilfelle ganciclovir, bestemt i rotte av hannkjønn etter en enkelt po-dose av prodrogen. Deretter ble plasmanivået av den aktive forbindelse, ganciclovir, bestemt i rotte av hannkjønn etter en enkelt intravenøs (iv) dose av forbindelsen. For ganciclovir er den enkelte dose i hvert tilfelle, po og iv, på 10 mg/kg; for en prodrogeester (inkl. L-monovalinesteren av ganciclovir) er den enkelte dose i hvert tilfelle, po og iv, en ekvimolar dose med 10 mg/kg ganciclovir. Fra de to målinger etter po- og iv-administrasjon, ble den orale biologiske tilgjengelighet beregnet ved å dividere det totale areal under kurven for konsentrasjonen vs. tiden etter po-administrasjon med det totale areal under kurven for konsentrasjonen vs. tiden etter iv-administrasjon, på egnet måte korrigert for doseringen, ifølge ligningen:

$$F_{(p.o.)}(\%) = \left[ \frac{AUC_{(p.o.)}}{AUC_{(i.v.)}} \right] \times \left[ \frac{dose_{(i.v.)}}{dose_{(p.o.)}} \right] \times 100$$

AUC-verdiene (det totale areal under kurven) ble beregnet over hele tidsrommet som ble analysert, fra 0 til 24 timer.

Doseringsvehiklet for oral og intravenøs dosering bestod av normalt saltvann inneholdende 2% eddiksyre. I begge tilfeller var forbindelsens konsentrasjon ekvivalent med 4,0 mg/ml ganciclovir, med et doseringsforhold ekvivalent med 10 mg/kg (2,5 ml/kg) ganciclovir. En rotte på 200 g fikk 0,5 ml av den orale legemiddelløsning dosert ved gavage eller ved injisering i halevenen.

Rottene ble akklimatisert til laboratoriumomgivelsen i tre dager og fastet over natten før eksperimentets start og inntil 4 timer etter doseringen. Blod ble samlet fra 4 rotter til hvert av de følgende tidspunkter: 0 minutter (før doseringen), 5 minutter (kun iv), 15 minutter, 30 minutter, 1 time, 2 timer, 3 timer, 5 timer, 7 timer, 10 timer og 24 timer. Blodet ble centrifugert med én gang for å erholde plasma, og plasmaen ble frosset ved -20°C inntil analysen fant sted.

#### Test for ganciclovir i plasma

Alikvoter av plasma (0,50 ml) ble blandet med 0,020 ml intern standard (acyclovir, 15 µg/ml i 10% metanol/vann) og 3,0 ml acetonitril. Blandingen ble virvlet, og den erholdte felning ble fjernet ved sentrifugering (4.000 g; 10 min.). Supernatanten ble inndampet til tørrhet under nitrogen og rekondisjonert i 200 µl HPLC mobil fase. Alikvoter (0,05 ml) ble analysert ved HPLC under anvendelse av en Keystone Hypersil BDS, 250 x 4,6 mm C18-kolonne. Den mobile fase inneholdt 2% acetonitril i 30 mM natriumfosfatbuffer inneholdende 5 mM heptansulfonsyre, pH 2,0; og ble pumpet ved en hastighet på 1,0 ml/min. Ganciclovir og den interne standard ble påvist og målt ved UV-absorbering ved 254 nm.

ORAL BIOLOGISK TILGJENGELIGHET

FORBINDELSE	ORAL BIOLOGISK TILGJENGELIGHET (F%)	REFERANSE
Ganciclovir (G) {2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1,3-propandiol}	7,9	US 4.355.032
G-bis(propionsyre)ester	17,7	J. Pharm. Sci. 76, 180-184 (1987)
G-bis(L-valin)ester	52,0	EP 375 329
G-L-valinester- benzyleter	ikke påvisbar	-
G-bis(fenylglycin) - esterdiacetat	8,18	-
G-dibenzyleter	ikke påvisbar	-
<b>Aminosyreester ifølge oppfinnelsen</b>		
G-L-valinataacetat	84,0	
G-L-valinathydroklorid	98,1	

EKSEMPEL 10

Bestemmelse av den orale absorpsjon (biologisk tilgjenge-  
5 lighet) i Cynomolgus-ape

Følgende test ble anvendt for å bestemme den orale absorp-  
sjon (oral biologisk tilgjengelighet) av forbindelsen med  
formel I i Cynomolgus-ape.

Dyr, dosering og samling av prøver

10 Det ble anvendt Cynomolgus-ape av hannkjønn med en kropps-  
vekt på 5 til 7 kilo. Dyrene ble foret med apefôr, frukt og  
vann og holdt i en lyscyklus på 12 timer. De testede for-  
bindelser ble formulert i en konsentrasjon som var ekvimo-

lar med 10 mg/ml løsning av ganciclovir i saltvann. Den orale formulering ble administrert ved gavage i et forhold på 1,0 ml/kg for en slutlig dose som var ekvimolar med 10 mg/kg dose ganciclovir. iv-formuleringen av ganciclovir ble formulert i saltvann inneholdende 0,2% HCl i en konsentrasjon på 20 mg/ml og administrert i et forhold på 0,5 ml/kg.

Dyrene fastet fra kvelden før doseringen og inntil 4 timer etter doseringen. Det ble tatt blodprøver fra hver ape 0 (før dosering), 5 minutter (kun iv), 15 minutter, 30 minutter, 1 time, 2 timer, 3 timer, 5 timer, 7 timer, 10 timer og 24 timer etter doseringen. Blodprøvene ble samlet i hepariniserte sprøyter, og plasmaen ble isolert med én gang ved sentrifugering og frosset ved -20°C inntil analysen fant sted.

#### 15 Test for ganciclovir i plasma

Alikvoter av plasma (0,50 ml) ble blandet med 0,020 ml intern standard (acyclovir, 15 µg/ml i 10% metanol/vann) og 3,0 ml acetonitril. Blandingen ble virvlet, og den erholdte felning ble fjernet ved sentrifugering (4.000 g; 10 min.). Supernatanten ble inndampet til tørrhet under nitrogen og rekondisjonert i 200 µl HPLC mobil fase. Alikvoter (0,05 ml) ble analysert ved HPLC under anvendelse av en Keystone Hypersil BDS, 250 x 4,6 mm C18-kolonne. Den mobile fase inneholdt 2% acetonitril i 30 mM natriumfosfatbuffer inneholdende 5 mM heptansulfonsyre, pH 2,0; og ble pumpet ved en hastighet på 1,0 ml/min. Ganciclovir og den interne standard ble påvist og målt ved UV-absorbering ved 254 nm.

Den biologiske tilgjengelighet (F) beregnes ifølge ligningen som ble gitt i eksempel 9.

30 Prodrogen 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinat hadde en oral biologisk tilgjengelighet på 35,7%. 2-(2-Amino-1,6-dihydro-6-okso-purin-9-yl)metoksy-1,3-propandiyl-bis-L-valinat hadde en

oral biologisk tilgjengelighet på 23,5%. Ganciclovir hadde en biologisk tilgjengelighet på 9,9%. Administrasjon av samme prodroge oralt og ganciclovir iv til samme ape fører til en middels oral biologisk tilgjengelighet for prodrogen på 41,6%.

#### EKSEMPEL 11

De følgende eksempler på planlagte ganciclovir-L-valinmonoesterkapsler inneholder som bærerstoffer povidon, et binde-  
 10 middel; kornstivelse, en disintegrant; og stearinsyre, et smøre- og glidemiddel; hvilke fylles på et todelt hårdgelatinkapselskall. Vann er den granulerende væske, og fjernes ialt vesentlig i løpet av behandlingen.

#### Kvantitativ sammensetning av ganciclovir-

#### L-valinmonoesterkapsler

15 (En kapsel tre ganger daglig)

Ingrediens	Vekt pr. kapsel (mg)	% vekt/vekt
Ganciclovir-L-valinmonoesterhydroklorid	390,00	92,75
Povidon	12,61	3,00
Kornstivelse	16,81	4,00
Stearinsyre <sup>1</sup>	1,05	0,25
Vann <sup>2</sup>		
Total fyllevekt (teoretisk) <sup>3</sup>	420,47	100,00

Pulverblandingen fylles på todelte hårdgelatinkapselskall.

<sup>1</sup> Mengden av stearinsyre kan variere fra 0,1 vekt% til 5,0 vekt%.

<sup>2</sup> Mengden av vann kan variere for å fremkalle en akseptabel granulering, og tørkes bort.

<sup>3</sup> Den totale fyllevekt (teoretisk) omfatter ikke den gjenblivende fuktighet som kan være tilstede i det slutlige produkt.

Kvantitativ sammensetning av ganciclovir-L-valinmonoesterkapsler  
(To kapsler tre ganger daglig)

Ingrediens	Vekt pr. kapsel (mg)	% vekt/vekt
Ganciclovir-L-valinmonoesterhydroklorid	312,00	92,75
Povidon	10,09	3,00
Kornstivelse	13,45	4,00
Stearinsyre <sup>1</sup>	0,84	0,25
Vann <sup>2</sup>		
Total fyllevekt (teoretisk) <sup>3</sup>	336,38	100,00

<sup>10</sup> Pulverblandingen fylles på todelte hårdgelatinkapselskall.

<sup>1</sup> Mengden av stearinsyre kan variere fra 0,1 vekt% til 5,0 vekt%.

<sup>2</sup> Mengden av vann kan variere for å fremkalle en akseptabel granulering, og tørkes bort.

<sup>15</sup> <sup>3</sup> Den totale fyllevekt (teoretisk) omfatter ikke den gjenblivende fuktighet som kan være tilstede i det slutlige produkt.

Eksempel på en fremgangsmåte ved fremstilling av ganciclovir-L-valinmonoesterkapsler

1. Bland ganciclovir-L-valinmonoesteren og en del av kornstivelsen i en egnet mixer.
- 5 2. Løs opp povidonet i vannet under omrøring.
- 3 Tilsett (2) til (1) under fortsatt omrøring, for å danne en granulering.
4. Kvern våtgranulatet hvis nødvendig.
5. Tørk våtgranulatet i en tørker.
- 10 6. Passer tørrgranulatet, resten av kornstivelsen og stearinsyren gjennom en kvern.
7. Bland (6) i en egnet mixer.
8. Fyll den egnede mengde av (7) på todelte hårdgelatin-kapselskall.

**P a t e n t k r a v**

## 1. Forbindelse

k a r a k t e r i s e r t v e d at den er 2-(2-amino-  
1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-  
5 L-valinat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav,  
eventuelt hydrokloridet eller acetatet, i form av sin (R)-  
eller (S)-diastereomer eller i form av blandinger av de to  
diastereomerer.

## 2. Forbindelse ifølge krav 1,

10 k a r a k t e r i s e r t v e d at den er en blanding  
inneholdende like deler (R)- og (S)-diastereomer.

## 3. Forbindelse ifølge krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den forekommer i  
krystallinsk form.

## 15 4. Forbindelse ifølge krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den er (R)-2-(2-  
amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-  
propanyl-L-valinat eller dens farmasøytisk akseptable  
salter.

## 20 5. Forbindelse ifølge krav 1,

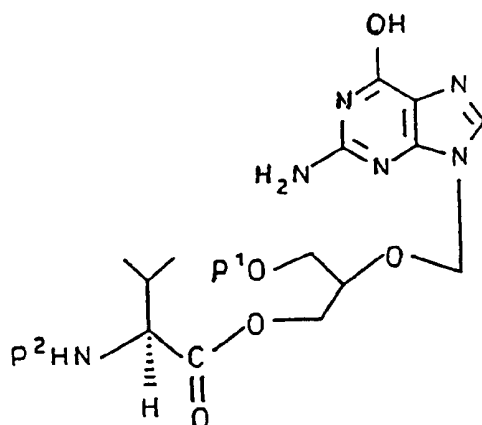
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er (S)-2-(2-  
amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-  
propanyl-L-valinat eller et farmasøytisk akseptabelt salt  
derav, eventuelt hydrokloridet eller acetatet.

25 6. Farmasøytisk sammensetning, eventuelt for intravenøs  
administrasjon,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder en  
forbindelse ifølge et av kravene 1 til 5, valgfritt  
inneholdende et farmasøytisk akseptabelt tilsetningsstoff  
30 eller bærerstoff.

## 7. Forbindelse

karakteriseret ved formel



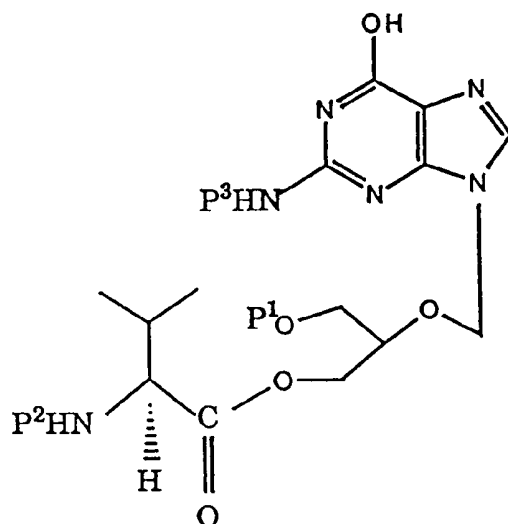
hvor

10 P¹ betyr hydrogen eller en hydroksybeskyttelsesgruppe og P² betyr en aminobeskyttelsesgruppe.

8. Fremgangsmåte ved fremstilling av forbindelsen 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinat eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller en diastereomer derav,

15 karakteriseret ved at den omfatter:

(a) fjerning av en amino- og/eller hydroksybeskyttelsesgruppe, eventuelt under sure betingelser, fra en forbindelse med formel:



hvor  $P^1$  betyr en hydroksybeskyttelsesgruppe eller hydrogen,  $P^2$  betyr en aminobeskyttelsesgruppe og  $P^3$  betyr hydrogen eller  $P^2$ ,

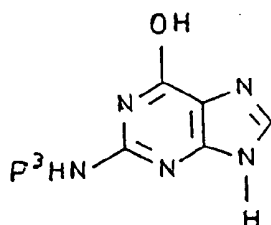
for å gi forbindelsen 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav;

(b) omdannelse av forbindelsen 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinat til et farmasøytisk akseptabelt salt derav; eller

(c) esterifisering av 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1,3-propandiol (ganciclovir) eller et salt derav med et aktivert derivat av L-valin; eller

(d) kondensasjon av et valgfritt substituert guanin med formel:

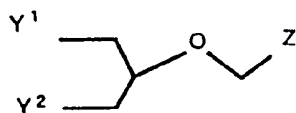
15



valgfritt i persilylert form,

hvor  $P^3$  betyr hydrogen eller en aminobeskyttelsesgruppe, med et 2-substituert glyserol med formel:

20



hvor  $Y^1$  og  $Y^2$  uavhengig betyr halogen, lavere acyloksy, lavere alkyloksy eller aryl(lavere)alkyloksygrupper, og  $Z$  betyr en avgående gruppe utvalgt fra lavere acyloksy, metoksy, isopropyloksy, benzyloksy, halogen, mesyloksy eller tosyloksy;

25

valgfridd i nærvar av en Lewissyrekatalysator, for å gi forbindelsen 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinat; eller

5 (e) delvis hydrolyse av bis-esteren 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-1,3-propandiyl-bis-(L-valinat) eller et salt derav for å gi monoesteren 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav; eller

10 (f) diastereomerseparasjon av 2-(2-amino-1,6-dihydro-6-oksopurin-9-yl)metoksy-3-hydroksy-1-propanyl-L-valinat til sine (R)- og (S)-diastereomerer.

9. Anvendelse av en forbindelse ifølge et av kravene 1 til 5 ved fremstilling av farmasøytiske sammensetninger for  
15 behandling av antivirale og beslektede sykdommer.