



SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) KUULUTUSJULKAISU 68402
UTLÄGGNINGSSKRIFT

C (45) Patentti myönnetty 10 09 1985
Patent meddelat

(51) Kv.lk.4/Int.Cl.4 C 07 F 9/65 // C 07 D 473/18

(21) Patenttihakemus — Patentansökning	780626
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	24.02.78
(23) Alkupäivä — Giltighetsdag	24.02.78
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	25.08.78
(44) Nähtäväksi panon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.05.85

(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 24.02.77

USA(US) 771778 Toteennäytetty-Styrkt
24.12.77 Englanti-England(GB) 53905/77
Toteennäytetty-Styrkt

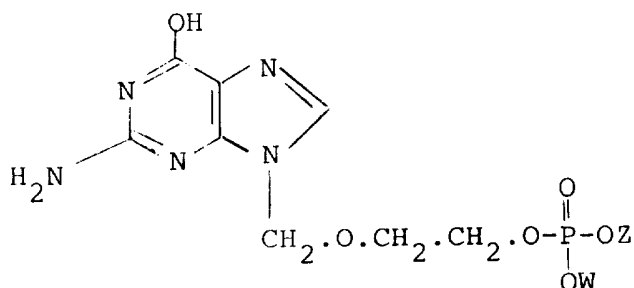
(71) The Wellcome Foundation Limited, 183-193 Euston Road, London NW1,
Englanti-England(GB)

(72) Howard John Schaeffer, Raleigh, North Carolina, USA(US)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen 9-(2-hydroksietoksimetyyli)-
guaniinimonofosfaattijohdannaisen valmistamiseksi - Förfarande för
framställning av ett terapeutiskt användbart 9-(2-hydroxietoximetyl)-
guaninmonofosfatderivat

Keksintö koskee menetelmää terapeuttisesti käyttökelpoisen 9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinimonofosfaattijohdannaisen valmistamiseksi, jonka kaava on



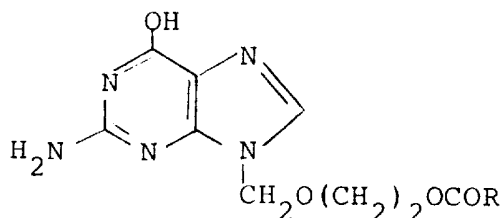
(I)

jossa W ja Z ovat samoja tai erilaisia ja tarkoittavat vetyä tai farmaseuttisesti hyväksyttävää kationia.

On tunnettua, että puriinien 9-(2-hydroksietoksimetyyli)-johdannaisilla on virustenvastaista aktiivisuutta erilaisia DNA- ja RNA-virusluokkia vastaan sekä in vitro- että in vivo-kokeissa (GB-patenttihakemus 38178/74). Erityisesti nämä yhdisteet ovat virustenvastaisina aineina aktiivisia Vaccinia- ja Herpes-viruksia vastaan, kuten imettäväisten Herpes simplex, zoster ja varicella viruksia vastaan, jotka virukset aiheuttavat kaniineilla Herpesarveiskalvotulehduksen ja hiirillä Herpes-aivotulehduksen.

Nyt on havaittu, että 9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaninimonofosfaattiesterillä sen lisäksi, että sillä on hyvä viruksenvastainen aktiivisuus, on etuna huomattavasti parempi liukoisuus ainakin pH-alueella 1-7,5 kuin vastaavalla fosforyloimattomalla yhdisteellä.

FI-patenttijulkaisusta 60709 tunnetaan kaavan I mukaista fosfaattiesterijohdannaista vastaava alkoholi. Nyt kuvatus fosfaattiyhdisteen (ja myös sen mononatriumsuolan) viruksenvastainen aktiivisuus on noin 50 % ei-fosforyloidun yhdisteen vastavasta (0,2 ja 0,1 μM). Fosfaattiyhdisteen arvo on kuitenkin suhteellisen korkea verrattuna ko. emäyhdisteen (acyclovir'in) muihin estereihin, kuten ilmenee seuraavasta taulukosta.



Viruksenvastainen aktiivisuus

<u>R</u>	<u>ED₅₀ (μM)</u>
a) H	0.03
b) $-\text{CH}_3$	0.17
c) $-\text{CH}_2\text{CH}_3$	0.7
d) $-(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	0.37
e) $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$	0.8
f) $-(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	0.08
g) 	30

Viruksenvastainen aktiivisuus on ilmaistu ED_{50} -arvona käyttäen μM -yksiköitä ja se on määritetty Plagne Reduction Assay'llä. Taulukossa esitetyistä tuloksista ilmenee, että erot esteriryhmän koossa ja rakenteessa johtavat viruksenvastaisiin aktiivisuuksiin, jotka huomattavasti eroavat toisistaan, ja tämän vuoksi ei ole ennakoitavissa onko määrätyllä esterillä suuri vai pieni viruksenvastainen aktiivisuus. Tämä oli asianlaista myös nyt kuvattujen fosfaattiesteriyhdisteiden kohdalla, joilla on suhteellisen suuri viruksenvastainen aktiivisuus verrattuna taulukossa esitettyjen estereiden keskimääräiseen aktiivisuuteen. Eräät taulukossa esitetyt esterit ovat aktiivisempia kuin vastaavat fosfaattiyhdisteet, mutta on huomattava, että nyt kuvatuilla yhdistellä hyvän viruksenvastaisen vaikutuksen lisäksi on erinomainen vesiliukoisuus. Kuten taulukosta ilmenee, asestaattiesterillä (yhdiste b) on jonkin verran parempi viruksenvastainen vaikutus kuin fosfaatilla, mutta se liukenee huonosti veteen.

Julkaisussa Journal of Medicinal Chemistry 18(1975), n:o 7, p. 721-726 annetaan ymmärtää, että nukleosidianalogien primääristen hydroksiryhmien fosforylointi parantaa ko. yhdisteiden liukoisuutta. Julkaisussa ei kuitenkaan ole esitetty varsinaista kvantitatiivista vertailua nukleosidin ja vastaavan fosfaatin vesiliukoisuuksien välillä. Sivulla 721 on todettu viruksenvastaisen aineen Ara-A olevan suhteellisen liukenematon veteen ja ko. yhdisteen liukoisuusarvoja on ilmoitettu. Fosfaattijohdannaisien suhteen on sivulla 723 todettu yhdisteiden 3 ja 6 olevan "vesiliukoisia". Yhdiste 3 on Ara-A:n metyylifosfaattianalogi ja yhdiste 6 on hypoksantiiniyhdisteen fosfaatti. Näiden yhdisteiden on ilmoitettu olevan "vesiliukoisia". On kuitenkin huomattava, että useimmat yhdisteet ovat ainakin jonkin verran vesiliukoisia. Julkaisusta ei kuitenkaan ilmene, missä määrin vesiliukoisuus on parantunut. Myöskään Ara-A:n monofosfaatista (yhdiste b) ei ole esitetty vesiliukoisuutta kuvaavia arvoja. Näin ollen julkaisussa kuvattuja havaintoja ei voida suoraan soveltaa nyt kuvattuihin asyklisiin johdannaisiin. Ei siis ollut ennakoitavissa, että nyt kuvatut fosfaattiyhdisteet liukenevat paremmin

veteen kuin vapaan hydroksiryhmän sisältävä yhdiste, jonka vesiliukoisuus on 0,125 %. Esimerkiksi asetaattianalogin (fosfaattiryhmä korvattu asetoksiyhmällä, yhdiste b taulukossa) vesiliukoisuus on 0,62 % huoneen lämpötilassa, kun taas propionyylioksiyhdiste (yhdiste c taulukossa) vesiliukoisuus on vain 0,086 %.

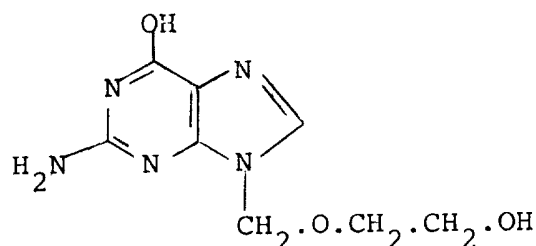
Kaavan I mukaisella vapaalla fosfaattiyhdisteellä ($Z=W=H$) on yllättävä kyky muodostaa erittäin vesiliukoisia emässuoloja. Vapaan fosfaattiyhdisteen vesiliukoisuus on 0,196 %, kun taas mononatriumsuolan ($Z=Na$, $W=H$) vesiliukoisuus on 23,1 %, ts. vesiliukoisuus on kasvanut 100-kertaiseksi. Vertailun vuoksi voidaan todeta, että vastaavan hemisukkinaattiyhdisteen (fosfaattiryhmä korvattu ryhmällä $-OCO(CH_2)_2CO_2H$) vesiliukoisuus on 0,19 %. Korostettakoon, että hemisukkinaattiesteri ja fosfaattiesteri ovat samankaltaisia siinä suhteessa, että molemmat sisältävät ionisen esteriryhmän, joka pystyy muodostamaan emässuoloja. Molemmat yhdisteet liukenevat myös suunnilleen yhtä hyvin veteen. Hemisukkinaattiyhdisteen mononatriumsuolan vesiliukoisuus on kuitenkin vain 2,7 %, joka vastaa noin 10-kertaista kasvua vapaaseen esteriin nähden, kun taas fosfaattiyhdisteillä kasvu on vähintään 100-kertainen. Fosfaattiryhmän kykyä muodostaa erittäin vesiliukoisia suoloja on pidettävä yllättävänä ottaen huomioon vastaavan, kemiallisesti samankaltaisen hemisukkinaattianalogin vesiliukoisuusarvot. Tämä erittäin hyvä liukoisuus veteen on myös yllättävä kun otetaan huomioon, että edellä esitetyssä taulukossa mainitut esterit liukenevat huonosti veteen.

Kaavan I mukainen vapaa fosfaattiyhdiste ($Z=W=H$) ei liukene yhtä hyvin veteen kuin esimerkiksi mononatriumsuola, mutta koska se pystyy muodostamaan erittäin vesiliukoisia suoloja sopivissa väliaineissa, esim. sopivien emästen liuoksissa, on se katsottava erittäin käyttökelpoiseksi.

Kaavan I mukaista 9-hydroksietoksimetyylylguanidiinimono-fosfaattia voidaan valmistaa siten, että

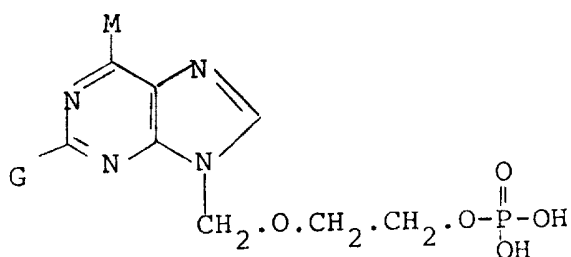
(a) yhdiste, jonka kaava on

68402



(II)

saatetaan reagoimaan fosforylointiaineen kanssa, jolloin saadaan kaavan I mukainen yhdiste, jossa W ja Z tarkoittavat vetyä, tai (b) yhdiste, jonka kaava on



(III)

jossa joko M on 6-hydroksiryhmä ja G on atomi tai ryhmä, joka voidaan korvata aminoryhmällä tai muuttaa aminoryhmäksi selektiivisellä ammonolyysillä, tai G on 2-aminoryhmä, ja M on atomi tai ryhmä, joka voidaan korvata hydroksiryhmällä tai muuttaa hydroksiryhmäksi selektiivisellä hydrolyysillä, muutetaan kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi; ja haluttaessa kaavan I mukainen yhdiste, jossa W ja Z tarkoittavat vetyä, muutetaan kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi, jossa W ja/tai Z on farmaseuttisesti hyväksyttävä kationi, reaktiossa emäksen ja tai suolan kanssa, joka sisältää halutun kationin.

Farmaseuttisesti hyväksyttävä kationi voi olla jokin seuraavista: natrium, kalium, litium, kalsium/2, magnesium/2, alumiinium/3 tai ammonium. Edullisia kaavan I mukaisia yhdisteitä ovat sellaiset, joissa Z on natrium, kalium tai ammonium, ja W on vety ja erityisen edullisia ovat kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa Z on natrium tai ammonium, ja W on vety.

Edellä olevassa W:n ja Z:n määritelmässä monivalenssista kationeista käytettiin ilmaisuja kalsium/2, magnesium/2 ja alumiinium/3, joilla tarkoitetaan, että kationi on jaettu valenssiltaan, so. $\text{Ca}^{++}/2$, $\text{Mg}^{++}/2$ ja $\text{Al}^{+++}/3$. Tällä halutaan osoittaa, että kalsium- tai magnesium-kationit ovat ionimuodossa liittyneet kahteen fosfaattihapteen tai alumiinium kolmeen fosfaattihapteen.

Menetelmävaihtoehdossa (a) käytetään fosforylointiin edullisesti fosforihappojohdannaisia, joissa 1-3 hydroksiryhmistä on korvattu halogeeniatomeilla, esim. kloorilla, kuten fosforioksikloridia. 1-2 hydroksiryhmistä voi myös muodostaa alkoksiryhmiä, jotka voivat lisäksi olla substituoituja ja muodostaa esimerkiksi bentsyylioksidiryhmiä. Tällaisia fosfohalogeenijohdannaisia tai fosfaatteja käytetään tavallisissa neutraaleissa tai alkalisisissa olosuhteissa ja viimeksi mainituissa käytetään aktivoimiseen edullisesti esimerkiksi karbodi-imidiä, kuten disykloheksyylikarbodi-imidiä, paitsi milloin ne ovat anhydrideinä.

Jos vähintään kaksi fosforihappojohdanneksen hydroksiryhmistä on korvattu halogeenilla, niin reaktion jälkeen kaavan II mukaisen yhdisteen kanssa on välttämätöntä poistaa vapaat halogeenit suhteellisen lieväällä vesihydrolyysillä käyttäen esimerkiksi yhtä mooliekvivalenttia vettä veden kanssa sekoittuvassa liuotuksessa, kuten alkoholissa. Seuraavassa vaiheessa voidaan fosfaatin kanssa liitetyt substituoidut tai substituomattomat alkoksiryhmät hydrolysoida sopivassa vesipitoisessa väliaineessa emäksen läsnäollessa. Aromaattisilla ryhmillä substituoiduille alkoksiryhmille, kuten bentsyylioksidiryhmälle, voidaan myös suorittaa hydrogenolyysi, edullisesti katalysaattoria käyttäen tavallisella tavalla, jolloin lohkeaminen tapahtuu pelkistyksen kautta.

Edullisessa suoritustavassa kaavan II mukainen yhdiste saatetaan reagoimaan fosforioksikloridin kanssa trialkyylifosfaatin läsnäollessa, edullisesti korkeintaan 0°C:n lämpötilassa.

Toisessa sopivassa suoritustavassa saatetaan kaavan II mukainen yhdiste reagoimaan fosforioksikloridin kanssa kuivassa pyridiinissä.

Kaava II mukaista yhdistettä voidaan valmistaa menetelmän, joita on kuvattu GB-patenttihakemuksessa 38278/74.

Menetelmävaihtoehdossa (b) kaavan III mukaisen yhdisteen reaktio voidaan suorittaa useilla eri tavoilla, esimerkiksi kun G on halogeeni, merkaptotai alkyylitioryhmä, kuten metyyliiti, se voidaan muuttaa ammonolyysillä amiiniryhmäksi. Tämä menetelmä, kuten monet muut alalla tunnetut, on esitetty teoksessa "Heterocyclic compounds Fused Pyrimidines Part II Purines, toimittanut D.J. Brown (1971), kustantaja: Wiley - Interscience".

M voi olla halogeeniatomi, merkapto- tai alkyylitioryhmä, joka voidaan muuttaa edellä mainitussa kirjassa kuvatuilla hydrolyysimenetelmillä hydroksiryhmäksi.

Kaavan III mukaisia yhdisteitä voidaan valmistaa menetelmän (a) kanssa analogisin menetelmin, joita on kuvattu GB-patenttihakemuksessa 38278/74.

9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinimonofosfaatin farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja voidaan valmistaa neutraloimalla happomuodossa oleva monofosfaatti ekvivalenttisella määrällä emästä, kuten hydroksidia, bikarbonaattia, karbonaattia, joka sisältää halutun kationin, nimittäin natriumin, kaliumin, ammoniumin, kalsiumin, litiumin, magnesiumin tai aluminium. Toisena mahdollisuutena on valmistaa ne vaihtoreaktioilla, jolloin monofosfaatin yhtä suolaa käsitellään halutun kationin sisältävän suolan liuoksella, edullisesti vesiliuoksella. Esimerkiksi 9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinimonofosfaatin niukkaliukoista bariumsuolaa käsitellään vesisuspensionä natriumsulfaattilla bariumin poistamiseksi sangen liukenemattomana bariumsulfaattina, jolloin liuokseen jää natrium-9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinimonofosfaatti.

Kaavan I mukaista yhdistettä voidaan käyttää farmaseuttisissa koostumuksissa yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan kanssa.

Farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantajia ovat aineet, jotka sopivat lääkekoostumuksiin niiden annostamistarkoituksissa. Ne voivat olla kiinteitä, nestemäisiä tai kaasumaisia aineita, jotka ovat muuten inerttejä ja lääketieteellisesti hyväksyttäviä ja sopivat yhteen aktiivisen aineosan kanssa. Näitä farmaseuttisia koostumuksia voidaan antaa suun kautta, parenteraalasti, suppositorina tai pessaareina tai käyttää paikallisesti salvoina, voiteina, aerosoleina tai jauheina, silmä- tai nenätippoina riippuen aina siitä hoidetaanko sisäistä vai ulkoista virusinfektiota.

Sisäisissä infektioissa kaavan I mukaisia yhdisteitä annetaan annoksina 0,1-250 mg/kg laskettuna vapaana fosfaattina edullisesti 1,0-50 mg/kg (imettäväisen kehon paino). Yksikköannos ihmisellä annettuna yhden tai useamman kerran vuorokaudessa on 1-800 mg, edullisesti 1-250 mg, ja edullisimmin 10-200 mg.

Parenteraalissa lääkeannossa tai lääkettä annettaessa paikallisesti tippoina, esim. silmätulehduksissa, kaavan I mukaiset yhdisteet voivat olla vesiliukoisina, joiden pitoisuus on noin 1,0-10 paino/tilav.-%, edullisesti 0,1-7 % ja edullisimmin 0,2-5 %.

Silmän tai muiden ulkoisten kudosten, esim. suun ja ihon infektiota voidaan hoitaa edullisesti paikalliseen käyttöön sopivilla liuksilla, voiteilla tai savoilla. Niiden pitoisuudet ovat noin 1,0-10 %, edullisesti 0,3-6 % ja edullisimmin 3 %.

Vielä eräänä keksinnön aspektina esitetään menetelmä imettäväisten virusinfektioiden käsittelymiseksi antamalla antiviraalisesti vaikuttava, myrkytön määrä edellä määritettyä kaavan I mukaista yhdistettä. Tässä käytettynä ilmaisulla "antiviraalisesti vaikuttava myrkytön määrä" tarkoitetaan etukäteen määritettyä antiviraalista määrää, joka in vivo on tehokas viruksia vastaan.

Keksintöä valaistaan seuraavilla esimerkeillä.

Esimerkki 1

9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinimonofosfaatti

2-kloori-9-(2-hydroksietoksimetyyli)hypoksantiinin (20 mg) sekoitettuun suspensioon trietyylifosfaatissa (0,3 ml) lisättiin -8°C:ssa yhtenä annoksena fosforioksikloridia (0,03 ml). Lämpötila sai kohota 30 minuutissa 0°C:seen. Sitten seosta sekoitettiin 0°C:ssa 40 minuuttia ja +5°C:ssa 50 minuuttia. Seos kaadettiin sitten jäälle, pH säädettiin 2-n kaliumhydroksidilla 7:ään. Saatu liuos uutettiin kaksi kertaa kloroformilla (2x2 ml). Vesifaasin pH säädettiin 2-n kaliumhydroksidilla arvoon 8-8,5, ja sitten lisättiin bariumasetaat-tai (105 mg). Saatu bariumfosfaattisakka suodatettiin. Suodosta käsiteltiin suurella ylimäärällä etanolia, jolloin saostui raakatuotteenä barium-2-kloori-9-(2-hydroksietoksimetyyli)hypoksantiinimonofosfaattia. Sakka koottiin suodattamalla ja suspendoitiin etanoliin. Etanolisuspensiota kuumennettiin sitten höyryhauteella useiden minuuttien ajan, se jäähdytettiin ja suodatettiin. Saatu sakka pestiin vedettömällä eetterillä ja kuivattiin, jolloin saatiin barium-2-kloori-9-(2-hydroksietoksimetyyli)hypoksantiinimonofosfaattia (26 mg).

Barium-2-kloori-9-(2-hydroksietoksimetyyli)hypoksantiinimonofosfaatin (7 mg) suspensioon vedessä (0,5 ml) lisättiin sekoittaen ammoniumsulfaattia (3,96 mg). Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 15 minuuttia, sitten se jäähdytettiin jäähauhteessa. Saostunut

bariumsulfaatti suodatettiin, pestiin vedellä (1 ml) ja etanolilla (10 ml). Suodos ja pesunesteet haihdutettiin alennetussa paineessa saatu jäännös liuotettiin metanoliin (3 ml). Metanoliuos siirrettiin Teflon[®]-vuorattuun ruostumattomasta teräksestä valmistettuun paineastiaan, johon lisättiin myös jäähaudelämpötilassa ammoniak-kikaasulla kyllästettyä metanolia (8 ml). Suljettua paineastiaa kuumennettiin 122°C:ssa 4 tuntia, se jäähdytettiin ja avattiin. Liuotin haihdutettiin mahdollisimman vähiin. Jäännöksenä saatu reaktioseos täplitettiin selluloosa-ohutkerroslevyille (Eastman Chromatogram[®]), jotka kehitettiin n-propanolivesiseoksessa (70:30 v/v). Nauhat kohdissa R_f 0,16 ja 0,34 suspendoitiin tris-puskuriin (0,6 ml) pH 8:ssa, ja selluloosa poistettiin suodattamalla.

Näiden nauhojen osoitettiin entsymaattisella defosforyloinnilla alkalisella fosfataasilla sisältävän 9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinimonofosfaattia ja 2-kloori-9-(2-hydroksietoksimetyyli)hypoksantiinimonofosfaattia, jotka fosfataasin vaikutuksesta muuttuivat vastaavasti 9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniiniksi ja 2-kloori-9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniiniksi. Suodokseen lisättiin E.colista saatua alkalista fosfataasia (2 µl), ja seosta kuumennettiin 2 tuntia 32°C:ssa. Sitten se tutkittiin kromatografisesti selluloosalevyillä (Eastman Chromatogram[®]) kolmella liuotinsysteemillä:

- (a) n-propanoli-vesi (70:30 v/v)
- (b) vesi
- (c) n-propanoli-väkevä NH₄OH-vesi (60:30:10 v/v).

Kussakin systeemissä saatiin kaksi täplää, jotka vastasivat 9-(2-hydroksietoksimetyyli)hypoksantiinia (B).

Liuotin systeemi	R _f (A)	R _f (B)	Reaktiotuotteen R _f
(a)	0,51	0,64	0,51 ja 0,65
(b)	0,68	0,97	0,67 ja 0,97
(c)	0,51	0,71	0,51 ja 0,71

Esimerkki 2

9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinimonofosfaatti

9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinin (0,225 g) ja trietyylifosfaatin (5 ml) jäähdytettyyn (-10°C) seokseen lisättiin sekoittaen fosforioksikloridia (0,76 ml). Reaktioseoksen lämpötila

sai nousta 30 minuutista 0°C:seen ja se pidettiin siinä 2 tuntia. Sitten reaktioseos kaadettiin jään ja veden seokseen ja pH säädettiin 2-n kalumhydroksidilla 7:ään. Saatu liuos uutettiin 2 kertaa kloroformilla ja kerran eetterillä. Vesifaasin pH säädettiin 2-n kaliumhydroksidilla 7,1:ksi ja se lyofilisoitiin. Saatu valkea kiinteä aine liuotettiin veteen (7 ml), ja liuokseen lisättiin metanolia (7 ml) epäorgaanisten suolojen saostamiseksi, jotka sitten suodatettiin. Suodokseen lisättiin asetonia (70 ml), jolloin saostui valkea kumi. Tämä liuotettiin veteen (7 ml), lisättiin etanolia (7 ml) ja seos suodatettiin. Lisättiin suuri ylimäärä asetonia (70 ml) jolloin kumi jälleen saostui. Kumi liuotettiin etanoliin (noin 20 ml) ja liuotin poistettiin haihduttamalla, jolloin saatiin valkeata jauhetta (2,6 g), joka oli halutun fosfaatin epäorgaanisten suolojen seosta. Se liuotettiin veteen (10 ml), liuos vietiin Bio-Gel P-2 pylvääseen (200-400 mesh, 2,7 x 90 cm) ja eluoitiin vedellä. Pääosa eloitui monofosfaatista 50 ml:aan eluaattia. Kun 166 ml eluaattia oli koottu, mikä voitiin osoittaa ohutkerroskromatografisesti selluloosakerroksella (Eastman Chromatogram[®]) n-propanoli-vesi-systeemillä (70:30 v/v); 9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinifosfaatin $R_f = 0,26$ ja kalium-9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinitosaatin $R_f = 0,11$. Eluaatti lyofilisoitiin, jolloin saatiin 0,28 g kiinteätä ainetta, jonka UV-spektroskooppisesti osoitettiin sisältävän 0,2 g monofosfaattia.

Esimerkki 3

9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinifosfaatti

9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinifosfaattia (0,28 g) liuotettiin veteen (30 ml) ja liuoksen pH säädettiin 6:ksi 6-n kloorivetyhapolla. Tuote adsorboitiin 14 ml:lle hiiltä (Fischer 5-690B; 50-200 mesh, happopesty ja deaktivoitu tolueenilla). Hiili pestiin hyvin vedellä ja eluoitiin 70 ml:lla 50-%:ista etanolin vesiliuosta, joka sisälsi 2 % väkevää ammoniumhydroksidia. Liuotin haihdutettiin alennetussa paineessa, jolloin saatiin ammonium-9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinimonofosfaattia (0,048 g); $R_f = 0,30$ Eastman-selluloosalla, n-propanoli-vesi (70:30 v/v).

Esimerkki 4Dinatrium-9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinifosfaatti

9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniinin (25 g) ja trietyyli-fosfaatin (250 ml) jäädytettyn (-30° - -20°C) seokseen lisät-tiin 3 tunnin kuluessa sekoittaen fosforioksidikloridia (54 ml). Reaktioseoksen lämpötila sai sitten 45 minuutin kuluessa kohota 0°C :seen ja se pidettiin siinä vielä 45 minuuttia. Sitten seos kaadettiin jään ja veden seokseen ja pH säädettiin 2-n natrium-hydroksidilla noin 7:ksi. Saatu liuos uutettiin kerran klorofo-rmilla ja kerran eetterillä. Vesifaasin pH säädettiin 2-n natrium-hydroksidilla 6,8:ksi ja sitten 10-n natriumhydroksidilla 7,3:ksi, jolloin saatiin lopulliseksi tilavuudeksi 2,5 l.

Neutraloitu liuos vietiin pylvääseen, joka sisälsi 2000 g Dowex 1 x 8, joka oli tasapainotettu 50 mmoolilla KHCO_3 :a. Eluoi-ttiin 30 litralla 50-500 mmolaarista KHCO_3 :n lineaarista gradient-tia, sitten pestiin 500 mmoolilla KHCO_3 :a. Tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja suurin osa KHCO_3 :sta poistettiin lisää-mällä Dowex 50- H^+ -hartsia ja poistamalla CO_2 tyhjössä. Liuos haih-dutettiin tyhjössä 2 litraksi ja tuote saostettiin 4°C :ssa lisää-mällä 10 l asetonia. Kuivattu sakka (55 g) vietiin 10 x 100 cm:n Bio-Gel P-2 pylvääseen ja eluointiin vedellä. Saatiin 22 g kiin-teätä ainetta. Se kiteytettiin vetysuolana 4°C :ssa pH 3:ssa vedes-tä, ja lisää ainetta saatiin emäliuoksesta kiteyttämällä 20-%:isesta etanolista pH 3:ssa. Vetysuola liuotettiin mahdollisimman pieneen tilavuuteen vettä, pH säädettiin NaOH:lla 8,5:ksi ja tuote saos-tettiin 4°C :ssa 2 tilavuudella etanolia. Tämä sakka liuotettiin 100 ml:aan vettä ja saostettiin 4°C :ssa 9 tilavuudella etanolia, jolloin saatiin 15,1 g 9-(2-hydroksietoksimetyyli)guaniidinatrium-suolaa dihydraattina.

Suolan puhtaus todettiin alkuaineanalyysillä, korkeapai-nenestekromatografialla ja UV-spektreillä.

Bruttokaava: $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6\text{P} \cdot 2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Laskettu: C 24,94 %, H 3,66 %, N 18,19 %, P 8,04 %

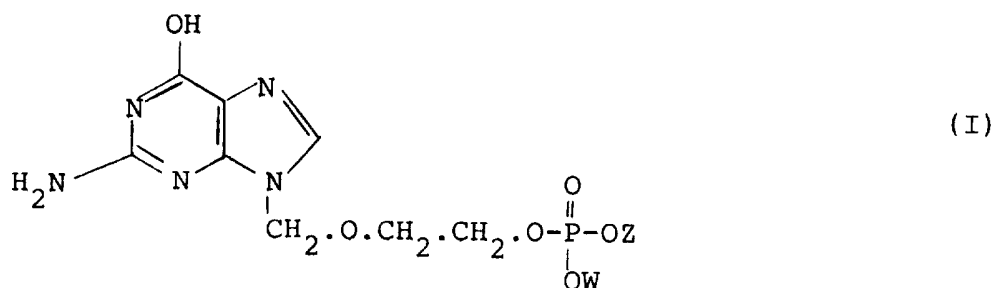
Saatu: C 25,20 %, H 3,63 %, N 18,10 %, P 7,89 %

UV-spektrit:	<u>Liuotin</u>	<u>λ_{max}</u>	<u>ϵ</u>	<u>λ_{min}</u>	<u>sh</u>
	0,1-m HCl	254	12970	225	272
	pH 7	299	14060	219	266
	0,1-m NaOH	255-264	11760	228	

Korkeapainenestekromatografisesti puhtaus = 99 %, emäs/fosfaatti-suhde = 1,00/1,01.

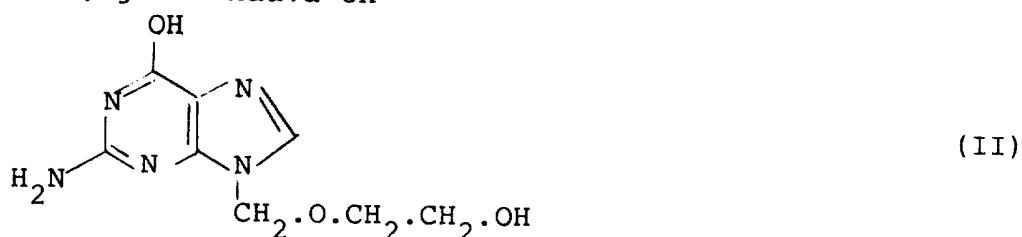
Patenttivaatimukset

1. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen 9-hydroksi-etoksimetyyli-guaniinimonofosfaattijohdannaisen valmistamiseksi, jonka kaava on



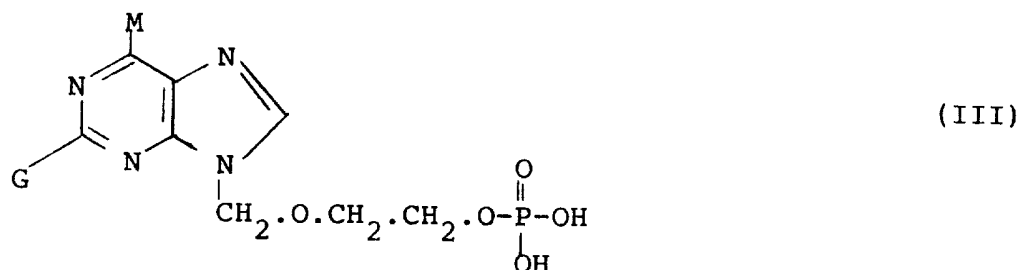
jossa W ja Z ovat samoja tai erilaisia ja tarkoittavat vetyä tai farmaseuttisesti hyväksyttävää kationia, tunnettua siitä, että

(a) yhdiste, jonka kaava on



saatetaan reagoimaan fosforylointiaineen kanssa, jolloin saadaan kaavan I mukainen yhdiste, jossa W ja Z tarkoittavat vetyä, tai

(b) yhdiste, jonka kaava on



jossa joko M on 6-hydroksiryhmä ja G on atomi tai ryhmä, joka voidaan korvata aminoryhmällä tai muuttaa aminoryhmäksi selektiiv-

visellä ammonolyysillä, tai G on 2-aminoryhmä, ja M on atomi tai ryhmä, joka voidaan korvata hydroksiryhmällä tai muuttaa hydroksiryhmäksi selektiivisellä hydrolyysillä, muutetaan kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi; ja haluttaessa kaavan I mukainen yhdiste, jossa W ja Z tarkoittavat vetyä, muutetaan kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi, jossa W ja/tai Z on farmaseuttisesti hyväksyttävä kationi, reaktiossa emäksen tai suolan kanssa, joka sisältää halutun kationin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fosforylointiaine on fosforihappojohdannainen.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fosforihappojohdannaisessa 1-3 hydroksiryhmää on korvattu halogeeniatomeilla.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fosforihappojohdannainen on fosforioksikloridi.

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fosforihapon 1-2 hydroksiryhmää on substituoitu siten, että ne muodostavat alkoksiryhmiä, joissa on mahdollisesti substituentteja.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kaavan II mukainen yhdiste saatetaan reagoimaan fosforioksikloridin kanssa trialkyylifosfaatin läsnäollessa korkeintaan 0°C :n lämpötilassa.

7. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kaavan II mukainen yhdiste saatetaan reagoimaan fosforioksikloridin kanssa kuivassa pyridiinissä.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kaavan III mukainen yhdiste, jossa M on 6-hydroksiryhmä ja G on halogeeniatomi, merkaptoto tai alkyylitioryhmä, muutetaan ammonolyysillä kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi.

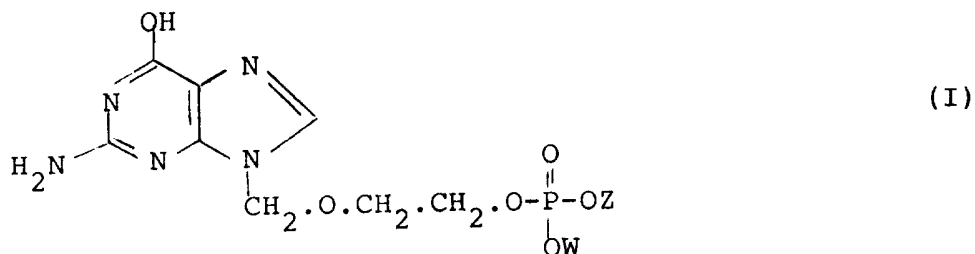
9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kaavan III mukainen yhdiste, jossa M on halogeeniatomi, merkaptoto tai alkyylitioryhmä ja G on 2-aminoryhmä muutetaan kaavan I mukaiseksi yhdisteeksi hydrolyysillä.

10. Jonkin patenttivaatimuksen 1-9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että emäs, jonka kanssa kaavan I mukainen yhdiste, jossa W ja Z tarkoittavat vetyä, saatetaan reagoimaan,

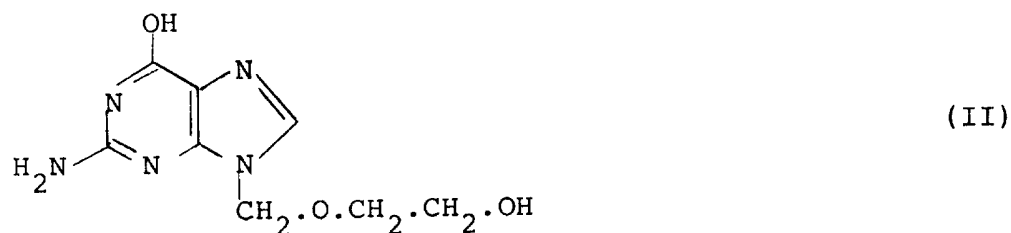
on hydroksidi, bikarbonaatti tai karbonaatti, joka sisältää halutun, farmaseuttisesti hyväksyttävän kationin.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että haluttu kationi on natrium, kalium, am-
monium, kalsium, litium, magnesium tai aluminium.

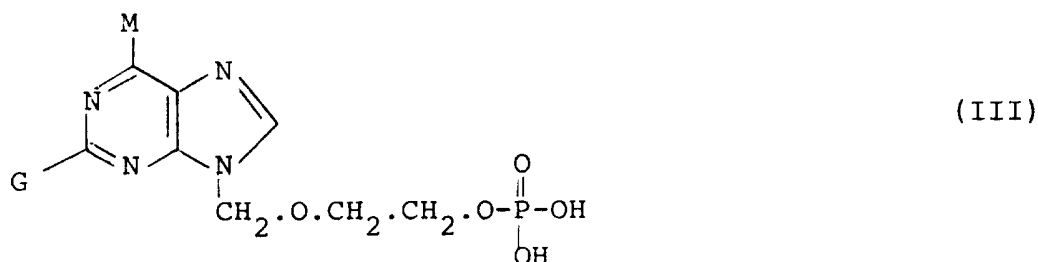
1. Förfarande för framställning av ett terapeutiskt användbart 9-hydroxi-2-metoxymetylguaninmonofosfatderivat med formeln



där W och Z är lika eller olika och betecknar väte eller en farmaceutiskt godtagbar katjon, k ä n n e t e c k n a t därav, att
(a) en förening med formeln



omsätts med ett fosforyleringsmedel, varvid erhålls en förening med formeln (I), där W och Z betecknar väte, eller
(b) en förening med formeln



där antingen M är 6-hydroxigrupp och G är en atom eller grupp, som kan ersättas med en aminogrupp eller omvandlas till en aminogrupp,

genom selektiv ammonolys, eller G är en 2-aminogrupp och M är en atom eller en grupp som kan ersättas med en hydroxigrupp eller omvandlas till en hydroxigrupp genom selektiv hydrolys, omvandlas till en förening med formeln (I): och, om så önskas, omvandlas föreningen med formeln (I), där W och Z betecknar väte, till en förening med formeln (I), där W och/eller Z är en farmaceutiskt godtagbar katjon, genom reaktion med en bas eller ett salt, som innehåller den önskade katjonen.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k - n a t därav, att fosforyleringsmedlet är ett fosforsyraderivat.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k - n a t därav, att 1-3 hydroxigrupper i fosforsyraderivatet är ersätta med halogenatomer.

4. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k - n a t därav, att fosforsyraderivatet är fosforoxiklorid.

5. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k - n a t därav, att 1-2 hydroxigrupper i fosforsyran är substituerade så, att de bildar alkoxigrupper, vilka eventuellt har substituenten.

6. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k - n a t därav, att föreningen med formeln (II) omsätts med fosforoxiklorid i närvaro av trialkylfosfat vid en temperatur av högst 0°C.

7. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k - n a t därav, att föreningen med formeln (II) omsätts med fosforoxiklorid i torrt pyridin.

8. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k - n a t därav, att en förening med formeln (III), där M är en 6-hydroxigrupp och G är en halogenatom, merkaptogrupp eller alkyltio-grupp, omvandlas till en förening med formeln (I) genom ammonolys.

9. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k - n a t därav, att en förening med formeln (III), där M är en halogenatom, merkaptogrupp eller en alkyltio-grupp och G är en 2-aminogrupp, omvandlas till en förening med formeln (I) genom hydrolys.

10. Förfarande enligt något av patentkraven 1-9, k ä n n e t e c k n a t därav, att basen, med vilken föreningen med formeln (I), där W och Z betecknar väte, omsätts är en hydroxid, ett bi-

karbonat eller karbonat, som innehåller den önskade farmaceutiskt godtagbara katjonen.

11. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att den önskade katjonen är natrium, kalium, ammonium,
kalsium, litium, magnesium eller aluminium.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Patentijulkaisuja:-Patentskrifter: Suomi-Finland(FI) 60 709 (C 07 D 473/00).
Muita julkaisuja:-Andra publikationer: Journal of Medicinal Chemistry,
vol. 18 (1975), nro 7, Revankar, G.R., et al., Synthesis and antiviral
activity of certain 5'-monophosphates of 9-D-arabinofuranosyladenine
and 9-D-arabinofuranosylhypoxanthine, p. 721-726.