(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 15 545 T2** 2008.05.21

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 369 424 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 15 545.6**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 253 533.8**
(96) Europäischer Anmeldetag: **04.06.2003**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.12.2003**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **15.08.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.05.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***C07H 19/06*** (2006.01)
C07H 1/06 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
2002163889 05.06.2002 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, GB

(73) Patentinhaber:
Mitsui Chemicals, Inc., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(72) Erfinder:
Ishibashi, Hiroki, Omuta-shi, Fukuoka-ken, JP;
Nagahara, Kiyoteru, Omuta-shi, Fukuoka-ken, JP;
Fukuiri, Yashishi, Omuta-shi, Fukuoka-ken, JP;
Matsuba, Yasuko, Omuta-shi, Fukuoka-ken, JP

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Reinigung von geschützten 2'-Deoxycytidine**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft geschützte 2'-Desoxycytidine und hydratisierte Kristalle davon.

[0002] Die an der 5'-Position geschützten 2'-Desoxycytidine sind nützliche Verbindungen als Rohmaterialien für Antisense-DNA, die in den letzten Jahren entwickelt wurden.

2. Beschreibung des Stands der Technik

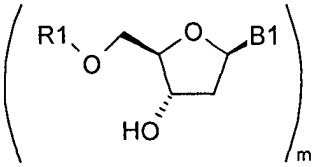
[0003] In der letzten Zeit wurde mit dem Fortschritt in der Entwicklung von genomischen Medikamenten intensiv an Antisense-DNA-Arzneimitteln gearbeitet. Der Fortschritt hat den Bedarf an DNA-Oligomeren, den Rohmaterialien für Antisense-DNA-Arzneimittel, und geschützten Desoxynucleosiden, den Rohmaterialien für DNA-Oligomere, gesteigert. Die Anwendungen zur Herstellung von Medikamenten erfordern andererseits die Verwendung von hochreinen Zwischenprodukten, um die Erzeugung von Nebenprodukten, die Verunreinigungen zugeschrieben wird, zu minimieren.

[0004] Die Japanische ungeprüfte Patentveröffentlichungen Nr. 58-180500 und 63-179889 und die japanische Übersetzung der PCT-Patentveröffentlichung Nr. 06-507883 offenbaren, dass an der 5'-Position geschützte Desoxynucleoside mittels Säulenchromatographie gereinigt werden können. Durch dieses Verfahren können Verunreinigungen mit stark unterschiedlichen Polaritäten und Strukturen leicht entfernt werden, aber Verunreinigungen mit ähnlichen Strukturen können nicht zufrieden stellend entfernt werden. Es ist beispielsweise besonders schwierig, Verunreinigungen, die 5'- oder 3'-Hydroxylgruppen aufweisen, die durch Trityl-Derivate, wie z.B. Dimethoxytritylgruppen, geschützt sind, und jene, die eine nicht erforderliche 3'-Hydroxylgruppe anstelle einer erforderlichen 5'-Hydroxylgruppe aufweisen, die durch ein Trityl-Derivat, wie z.B. eine Dimethoxytritylgruppe, geschützt ist, zu entfernen. Zusätzlich dazu beeinflusst ein Gemisch dieser Verunreinigungen die folgenden Schritte in der Herstellung von Medikamenten stark. Weiters umfasst die Säulenchromatographie eine Reinigungsvorrichtung in großem Ausmaß und eine große Menge an Lösungsmittel für die industrielle Herstellung; aus diesen Gründen wird dieses Verfahren zur Massenproduktion von großen Mengen eines Produkts in der Zukunft nicht geeignet sein.

[0005] Andere Verfahren als eine Säulenchromatographie zur Entfernung von Verunreinigungen wurden untersucht. Die Reinigung durch Umfällung wird in der Japanischen ungeprüften Patentveröffentlichung Nr. 60-152495 und den PCT-Veröffentlichungen Nr. WO00/75154 und WO00/39138 offenbart. Bei dem Umfällungsverfahren wird ein schlechtes Lösungsmittel zu einem guten Lösungsmittel, das eine Rohkomponente enthält, zugesetzt, oder das gute Lösungsmittel, das eine Rohkomponente enthält, wird zu dem schlechten Lösungsmittel zugetropft, um die Zielsubstanz auszufällen. Dieses Verfahren weist deshalb im Prinzip eine geringe Reinigungsfähigkeit auf, da es Schwierigkeiten bei der Entfernung der oben beschriebenen Verunreinigungen verursacht. Zusätzlich dazu ist es schwierig, das Volumenverhältnis zwischen dem guten und dem schlechten Lösungsmittel bei der industriellen Produktion angemessen zu steuern. Ein nicht angemessenes Verhältnis führt zum Erhalt eines öligen oder viskosen Niederschlags. In der Folge ist die Reinigung oft nicht erfolgreich. Gemäß einem in der Japanischen ungeprüften Patentveröffentlichung Nr. 60-152495 offenbarten Verfahren produziert das Umfällungsverfahren die Zielsubstanz in Form einer viskosen Flüssigkeit, die für gewerbliche Anwendungen nicht geeignet ist. Verfahren zur Amorphisierung durch Umfällung wurden ebenfalls offenbart, aber es ist kein Verfahren zur Erzeugung eines Kristalls durch Kristallisation bekannt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] Die vorliegende Erfindung stellt einen hydratisierten Kristall eines geschützten 2'-Desoxycytidins der allgemeinen Formel (1) bereit:

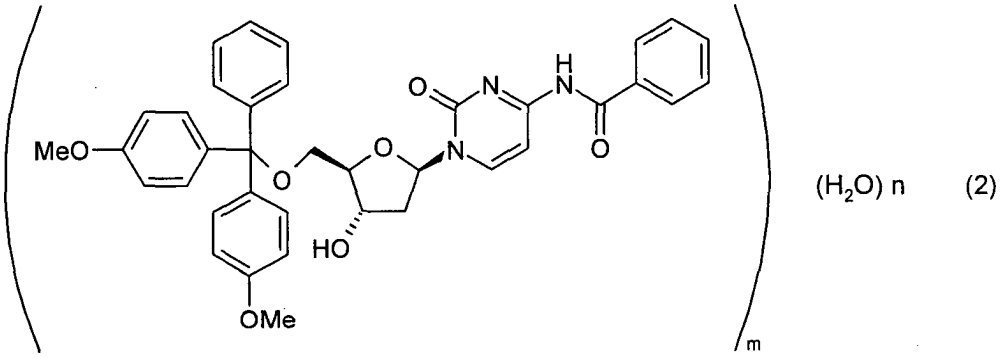


$(H_2O)\ n$ (1)

worin m und n jeweils eine ganze Zahl darstellen; R1 eine 4-Methoxytrityl-, 4,4'-Dimethoxytrityl- oder Triphe-

nylmethylgruppe darstellt; und B1 eine Cytosingruppe mit einer geschützten Aminogruppe darstellt.

[0007] Die Verbindung der allgemeinen Formel (1) ist vorzugsweise ein geschütztes 2'-Desoxycytidin der allgemeinen Formel (2):

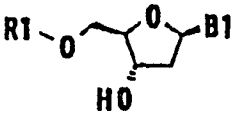


(H_2O) n (2)

worin m und n wie oben definiert sind.

[0008] In dem hydratisierten Kristall beträgt der Gehalt an N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'desoxycytidin vorzugsweise 0,1 % oder weniger.

[0009] Weiters wird ein Verfahren zur Reinigung eines geschützten 2'-Desoxycytidins durch die Ausfällung des geschützten 2'-Desoxycytidins der allgemeinen Formel (3) in Form eines hydratisierten Kristalls aus einer Lösung, die das geschützte 2'-Desoxycytidin und Wasser enthält, und die Gewinnung des geschützten 2'-Desoxycytidins beschrieben:

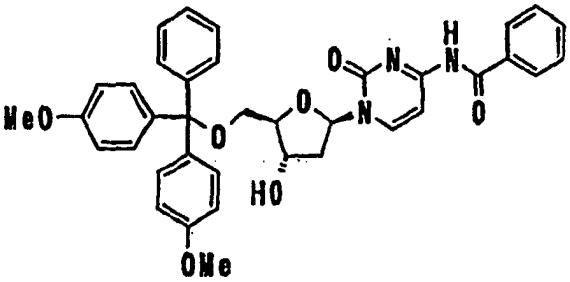


(3)

worin R1 und B1 wie oben definiert sind.

[0010] Bei diesem Verfahren beträgt der Wassergehalt der Lösung vorzugsweise 0,5 oder mehr Äquivalente der durch die allgemeine Formel (3) dargestellten Verbindung.

[0011] Bei diesem Verfahren ist die durch die allgemeine Formel (3) dargestellte Verbindung vorzugsweise ein geschütztes 2'-Desoxycytidin der Formel (4):



(4)

[0012] In dem Verfahren beträgt der Gehalt an N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin in dem gereinigten Kristall vorzugsweise 0,1 % oder weniger.

[0013] Hierin wird weiters ein Verfahren zur Herstellung eines nicht-hydratisierten geschützten 2'-Desoxycytidins der allgemeinen Formel (3) oder (4) durch das Dehydratisieren des hydratisierten Kristalls eines geschützten 2'-Desoxycytidins der allgemeinen Formel (1) oder (2) bei reduziertem Druck beschrieben.

[0014] Das Verfahren ermöglicht eine effizientere Herstellung von hochreinen geschützten 2'-Desoxycytidinen in industriellem Maßstab.

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0015] Die vorliegende Erfindung wird nun detailliert beschrieben.

[0016] In den allgemeinen Formeln (1) und (3) gemäß der vorliegenden Erfindung steht B1 für eine Cytosingruppe mit einer durch eine Schutzgruppe geschützten Aminogruppe. Beispiele für die Schutzgruppe umfassen eine Alkylgruppe, eine Alkylacylgruppe und eine Benzoylgruppe, die substituiert werden kann.

[0017] Die Alkylgruppe kann unverzweigt oder verzweigt sein und kann eine andere funktionelle Gruppe (einen Substituenten) aufweisen. Beispiele für den Substituenten umfassen Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-, 2-Propyl-, n-Butyl- und Isobutylgruppen.

[0018] Die Alkylacylgruppe kann unverzweigt, verzweigt oder ringförmig sein und kann eine andere funktionelle Gruppe (einen Substituenten) aufweisen. Beispiele für die Substituenten umfassen Acetyl-, Propionyl-, n-Butyryl-, Isobutyryl-, Pivaloyl-, Valeryl-, Isovaleryl-, Cyclopropyl-, Phenylacetyl-, Phenoxyacetyl- und (Isopropylphenoxy)acetylgruppen.

[0019] Die Benzoylgruppe kann substituiert sein. Die Phenylgruppe in der Benzoylgruppe kann einen Substituenten entweder an der 2-, der 3- oder der 4-Position oder eine Vielzahl an Substituenten an diesen Positionen aufweisen. Beispiele für den Substituenten umfassen Alkylgruppen, wie z.B. Methyl-, Ethyl-, 2-Propyl-, n-Butyl und tert-Butylgruppen; Hydroxylgruppen; Alkyloxygruppen, wie z.B. Methoxy-, Ethoxy-, n-Propyloxy-, 2-Propyloxy- und n-Butyloxygruppen; Nitrogruppen; Halogengruppen, wie z.B. Fluor-, Chlor-, Brom- und Todgruppen; Aminogruppen; Alkylaminogruppen, wie z.B. Methylamino-, Ethylamino-, n-Propylamino-, Dimethylamino-, Diethylamino- und Diisopropylaminogruppen; Acylgruppen, wie z.B. Acetyl-, Propionyl- und Benzoylgruppen; Phenylgruppen und Pyridinylgruppen.

[0020] Beispiele für die Benzoylgruppen umfassen spezifisch Benzoyl-, 2-Chlorbenzoyl-, 3-Chlorbenzoyl-, 4-Chlorbenzoyl-, 2-Brombenzoyl-, 3-Brombenzoyl-, 4-Brombenzoyl-, 2-Fluorbenzoyl-, 3-Fluorbenzoyl-, 4-Fluorbenzoyl-, 2-Methoxybenzoyl-, 3-Methoxyenzoyl-, 4-Methoxybenzoyl-, 2-Nitrobenzoyl-, 3-Nitrobenzoyl-, 4-Nitrobenzoyl-, 2-Aminobenzoyl-, 3-Aminobenzoyl-, 4-Aminobenzoyl-, 2-Methylaminobenzoyl-, 3-Methylaminobenzoyl-, 4-Methylaminobenzoyl-, 2-Dimethylaminobenzoyl-, 3-Dimethylaminobenzoyl-, 4-Dimethylaminobenzoyl-, 4-Phenylbenzoyl- und 4-Acetylbenzoylgruppen.

[0021] Eine Lösung, die geschützte 2'-Desoxycytidine und Wasser enthält, kann außerdem ein weiteres mischbares Lösungsmittel enthalten, das hydratisierte Kristalle der geschützten 2'-Desoxycytidine ausfällen kann. Beispiele für nicht-wässrige Lösungsmittel umfassen Alkohole, wie z.B. Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropylalkohol, Butanol, Pentanol und Cyclohexanol; Ether, wie z.B. Diethylether, Tetrahydrofuran und Dioxan; Ketone, wie z.B. Aceton, Methylethylketon und Methylisobutylketon; gesättigte Kohlenwasserstoffe, wie z.B. Pentan, Hexan, Methylpentan, Cyclohexan, Heptan, Nonan und Decan; aromatische Kohlenwasserstoffe, wie z.B. Benzol, Toluol, Cumol, Xylol, Mesitylen, Diisopropylbenzol und Triisopropylbenzol; halogenierte Kohlenwasserstoffe, wie z.B. Dichlormethan, Chloroform und Dichlorethan; Pyridine, wie z.B. Pyridin, Lutidin und Chinolin; und polare Lösungsmittel, wie z.B. tertiäre Amine (z.B. Triethylamin und Tributylamin), Acetonitril, Dimethylformamid, Dimethylimidazolidinon und Dimethylsulfoxid. Diese Lösungsmittel können einzeln oder in Kombination eingesetzt werden.

[0022] In den hydratisierten Kristallen erleichtert Wasser die Bildung einer Kristallstruktur. Die hydratisierten Kristalle in der vorliegenden Erfindung umfassen Kristalle, in denen Wasser in das Kristallgitter integriert ist, und Verbindungskristalle, die durch eine schwache Wechselwirkung zwischen den geschützten 2'-Desoxycytidinen und Wasser entstehen. Die Form der hydratisierten Kristalle und die Kristallstruktur sind nicht eingeschränkt.

[0023] Die hydratisierten Kristalle der geschützten 2'-Desoxycytidine können eine geringe Menge des nicht-wässrigen Lösungsmittels enthalten, das in der wässrigen Lösung von geschütztem 2'-Desoxycytidin während des Kristallisationsprozesses enthalten ist.

[0024] Der bei der Kristallisation eingesetzte Wassergehalt kann 0,5 Äquivalente oder mehr, vorzugsweise 1,0 Äquivalent oder mehr, der geschützten 2'-Desoxycytidine ausmachen.

[0025] Die Verfahren zur Bildung der hydratisierten Kristalle sind nicht eingeschränkt. Die Kristalle können beispielsweise durch die Zugabe von Wasser zu einer Lösung aus den geschützten 2'-Desoxycytidinen oder durch die Zugabe der geschützten 2'-Desoxycytidine zu einem wässrigen Lösungsmittel gebildet werden.

[0026] Die Konzentration der geschützten 2'-Desoxycytidine bei der Kristallisation liegt gewöhnlicherweise im Bereich von 1 % bis 50 % und vorzugsweise im Bereich von 5 % bis 40 %.

[0027] Die Temperatur der Lösung während der Kristallisation liegt vorzugsweise im Bereich von -10 °C bis zum Siedepunkt des Lösungsmittels, wenngleich die Temperatur nicht auf diesen Bereich beschränkt ist. Ein einziger Kristallisationsschritt stellt gewöhnlicherweise eine ausreichend hohe Reinheit sicher; ein weiterer Kristallisationsschritt stellt jedoch höhere Reinheit bereit. Zur Erleichterung der Kristallisation können Impfkristalle eingesetzt werden.

[0028] Die hydratisierten Kristalle von geschützten 2'-Desoxycytidinen, die auf diese Weise gereinigt wurden, können, bei Bedarf, bei reduziertem Druck, vorzugsweise von 0,1 bis 100 mmHg, dehydratisiert werden, wodurch hydratisierte geschützte 2'-Desoxycytidinkristalle mit reduziertem Wassergehalt, ein Pulver aus nicht hydratisiertem, geschütztem 2'-Desoxycytidin oder ein Pulver aus teilweise hydratisiertem, geschütztem 2'-Desoxycytidin gebildet werden.

[0029] Die Dehydratisierungstemperatur ist nicht eingeschränkt und liegt gewöhnlicherweise im Bereich von Raumtemperatur bis 200 °C. Die Dehydratisierung kann mit einem strömenden trockenen Gas (z.B. Stickstoff) oder einem Dehydratisierungsmittel (z.B. Silicagel und Diphosphorpentoxid) erfolgen.

[0030] Verunreinigungen, die durch das hierin beschriebene Reinigungsverfahren entfernt werden können, umfassen N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin und N^4-Benzoyl-3',5'-O-bis(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin. Der Gehalt an N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin in den geschützten 2'-Desoxycytidinen beträgt 0,1 % oder weniger, vorzugsweise 0,01 % oder weniger, unabhängig davon, ob der hydratisierte Kristall verbleibt oder nicht. Der Gehalt an N^4-Benzoyl-3',5'-O-bis(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin in den geschützten 2'-Desoxycytidinen beträgt 0,3 % oder weniger, vorzugsweise 0,1 % oder weniger, unabhängig davon, ob der hydratisierte Kristall verbleibt oder nicht (wobei die Prozentsätze als durch eine Flüssigkeitschromatographie gemessene Prozentfläche ausgedrückt sind).

[0031] Wie oben beschrieben stellt das hierin beschriebene Verfahren eine wirksame Reinigung für geschützte 2'-Desoxycytidine bereit.

[0032] Die folgenden Beispiele, die die vorliegende Erfindung beschreiben, dienen nicht zur Einschränkung des Umfangs der vorliegenden Erfindung.

BEISPIELE

Bedingung 1 für Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) für die Beispiele und Vergleichsbeispiele

(Analytische Bedingung für N^4-Benzoyl-2'-desoxycytidin und N^4-Benzoyl-3',5'-O- bis(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin)

Säule: Develosil TMS-UG-5
150 mm × 4,6 mm (Durchmesser)
Durchflussrate: 0,6 ml/min
Säulentemperatur: 35 °C
Detektionswellenlänge: 254 nm
Mobile Phase: Gradienten

[0033]

Zeit (min)	Lösung B (%)
0	20
30	100
35	100
37	20
50	Ende

[Lösung A]

[0034] Methanol (60 ml) wurde einer Lösung von $NaH_2PO_42H_2O$ (1,92 g) und Na_2HPO4 (2,43 g) in Wasser (2.940 ml) beigemischt, und das Gemisch wurde entgast.

[Lösung B]

[0035] Methanol (2.700 ml) wurde einer Lösung von $NaH_2PO_42H_2O$ (196 mg) und Na_2HPO_4 (248 mg) in Wasser (300 ml) beigemischt, und das Gemisch wurde entgast.

Bedingung 2 für HPLC für die Beispiele und Vergleichsbeispiele

(Analytische Bedingung für N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin)

Säule: YMC-Pack CN A-512
150 mm × 6,0 mm im Durchmesser
Durchflussrate: 1,0 ml/min
Säulentemperatur: 35 °C
Detektionswellenlänge: 235 nm
Durchlaufzeit: 80 min
Injektionsvolumen: 10 µl
Mobile Phase: Gradienten

[0036]

Zeit (min)	Lösung B (%)
0	14
25	50
60	100
80	100
82	14
102	Ende

[Lösung A]

[0037] Eine Lösung von $NH_4H_2PO_4$ (1,15 g) und $(NH_4)_2HPO_4$ (0,92 g) in Wasser (2.000 ml) wurde entgast.

[Lösung B]

[0038] Ein Gemisch aus Acetonitril (1.200 ml) und Lösung A (400 ml) wurde entgast.

Bedingungen für eine Röntgenbeugungsmessung (XRD) für die Beispiele und Vergleichsbeispiele

Vorrichtung: RAD-1A (Rigaku International Corporation)
Röntgenziel: Cu, 30 kV 15 mA
Scanningrate: 2°/min

Bedingungen für eine Differentialscanning-Kalorimetrie (DSC) für die Beispiele und Vergleichsbeispiele

Vorrichtung: DSC821 e (METTLER TOLEDO)
DSC-Pfanne: Aluminium
Erhitzungsrate: 5 °C/min
Atmosphäre: N_2-Strom

REFERENZBEISPIEL 1

Herstellung von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-d imethoxytrityl)-2'-desoxycytidin

[0039] Zu einer Lösung von N^4-Benzoyl-2'-desoxycytidin (119,0 g) in Pyridin (1,5 l) wurde 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (113,5 g) im Verlauf von 2 h zugesetzt, und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur weitere 4 h lang gerührt. Natriumhydrogencarbonat (33,8 g) wurde zugesetzt und 2 h lang gerührt, wonach die Reaktionslösung eingeengt wurde. Ethylacetat (1,2 l) und Wasser (300 ml) wurden zu dem Rückstand zugesetzt, und das Gemisch wurde gerührt. Eine kleine Menge gesättigter Salzlösung wurde zu dem Gemisch zugesetzt, und die resultierende Flüssigkeit wurde abgetrennt. Die extrahierte organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Das Gemisch wurde filtriert, wonach das Lösungsmittel entfernt

wurde. Der Rückstand wurde mittels Silicagel-Säulenchromatographie mit Ethylacetat als Lösungsmittel gereinigt. Eine Fraktion, die die Zielsubstanz enthielt, wurde zu Diisopropylether (2,0 l) unter starkem Rühren zugetropft, wonach das resultierende Gemisch 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt wurde. Das Filtrat wurde in einem Vakuum bei 50 °C getrocknet, um nicht-hydratisiertes N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (153,3 g) zu liefern. Das XRD-Diagramm zeigte, dass das freie Produkt amorph war. Weiters enthielt die Komponente N^4-Benzoyl-2'-desoxycytidin, das das Rohmaterial war, N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin und N^4-Benzoyl-3',5'-O-bis(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin, wobei es sich bei beiden um Nebenprodukte handelte, und die Anteile der entsprechenden Peakbereiche betrugen jeweils 1,0 %, 0,15 % bzw. 2,2 %.

BEISPIEL 1

Synthese von hydratisierten Kristallen von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin

[0040] Das nicht-hydratisierte N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (2,0 g), das in Referenzbeispiel 1 hergestellt wurde, wurde in 1,2-Dichlorethan (5 ml) gelöst, und Wasser (0,1 g) wurde zu der Lösung zugesetzt. Die Lösung wurde bei -24 °C einen Tag lang stehen gelassen, um die Zielsubstanz zu kristallisieren. Die resultierenden Kristalle wurden abfiltriert und in Vakuum bei 50 °C getrocknet, um hydratisierte Kristalle von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (0,8 g) zu erhalten. Der Feuchtigkeitsgehalt in den Kristallen wurde unter Einsatz des Karl-Fischer-Verfahrens ermittelt und betrug 2,7 %. Das XRD-Diagramm wies deutliche Reflexe auf, die den Kristallen zugeordnet wurden, insbesondere bei 5,6°, 7° und 10,3°. Weiters wies das DSC-Thermogramm einen endothermen Peak bei 109 °C auf, was den Schmelzpunkt der Kristalle anzeigt.

[0041] Die Komponente enthielt N^4-Benzoyl-2'-desoxycytidin, N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin und N^4-Benzoyl-3',5'-O-bis(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin, und die Anteile der entsprechenden Peakbereiche entsprachen jeweils 0,05 %, der Nachweisgrenze (0,01 %) oder weniger bzw. 0,05 %.
^{1}H-NMR($CDCl_3$): δ 8,7 (s, 1H); 8,3 (d, 1H); 7,9 (d, 2H); 7,2-7,6 (m, 13H); 6,8-6,9 (m, 4H); 6,3 (m, 1H); 4,5 (m, 1H); 4,2 (m, 1H); 3,8 (s, 6H); 3,4-3,5 (m, 2H); 2,7-2,9 (m, 2H); 2,3 (m, 1H)

BEISPIEL 2

Synthese von hydratisierten Kristallen von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin

[0042] Das nicht-hydratisierte N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (2,0 g), das in Referenzbeispiel 1 hergestellt wurde, wurde in Butylacetat (5 ml) gelöst. Hexan (0,5 ml) wurde zu der Lösung zugetropft. Dann wurden Wasser (0,1 g) und die hydratisierten Kristalle von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (10 mg), die in Beispiel 1 hergestellt wurden, zu der Lösung zugesetzt, und das Gemisch wurde einen Tag lang auf Eis stehen gelassen, um die Zielsubstanz zu kristallisieren. Die resultierenden Kristalle wurden abfiltriert und in Vakuum bei 50 °C getrocknet, um hydratisierte Kristalle von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (1,3 g) zu erhalten. Der Feuchtigkeitsgehalt in den Kristallen wurde unter Einsatz des Karl-Fischer-Verfahrens ermittelt und betrug 2,2 %. Das XRD-Diagramm wies deutliche Reflexe auf, die den Kristallen zugeordnet wurden, insbesondere bei 5,6°, 7° und 10,3°. Weiters wies das DSC-Thermogramm einen endothermen Peak bei 112 °C auf, was den Schmelzpunkt der Kristalle anzeigt.

[0043] Die Komponente enthielt N^4-Benzoyl-2'-desoxycytidin, N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin und N^4-Benzoyl-3',5'-O-bis(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin, und die Anteile der entsprechenden Peakbereiche entsprachen jeweils 0,12 %, der Nachweisgrenze (0,01 %) oder weniger bzw. 0,07 %.

BEISPIEL 3

Synthese von hydratisierten Kristallen von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin

[0044] Das nicht-hydratisierte N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (2,0 g), das in Referenzbeispiel 1 hergestellt wurde, wurde in Acetonitril (5 ml) gelöst. Wasser (7 ml) wurde zu der Lösung zugetropft. Dann wurden die hydratisierten Kristalle von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (10 mg), die in Beispiel 1 hergestellt wurden, zu der Lösung zugesetzt, und das Gemisch wurde 5 h lang auf Eis stehen gelassen, um die Zielsubstanz zu kristallisieren. Die resultierenden Kristalle wurden abfiltriert und in Vakuum bei 50 °C getrocknet, um hydratisierte Kristalle von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (1,3 g) zu erhalten. Das DSC-Thermogramm wies einen endothermen Peak bei 112 °C auf, was den

Schmelzpunkt der Kristalle anzeigt.

[0045] Die Komponente enthielt N^4-Benzoyl-2'-desoxycytidin, N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin und N^4-Benzoyl-3',5'-O-bis(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin, und die Anteile der entsprechenden Peakbereiche entsprachen jeweils 0,1 %, der Nachweisgrenze (0,01 %) oder weniger bzw. 0,04 %.

BEISPIEL 4

Synthese von hydratisierten Kristallen von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin

[0046] Das nicht-hydratisierte N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (2,0 g), das in Referenzbeispiel 1 hergestellt wurde, wurde in Aceton (5 ml) gelöst. Wasser (8 ml) wurde zu der Lösung zugetropft. Dann wurden die hydratisierten Kristalle von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (10 mg), die in Beispiel 1 hergestellt wurden, zu der Lösung zugesetzt, und das Gemisch wurde 5 h lang auf Eis stehen gelassen, um die Zielsubstanz zu kristallisieren. Die resultierenden Kristalle wurden abfiltriert und in Vakuum bei 50 °C getrocknet, um hydratisierte Kristalle von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (1,4 g) zu erhalten. Das DSC-Thermogramm wies einen endothermen Peak bei 114 °C auf, was den Schmelzpunkt der Kristalle anzeigt.

[0047] Die Komponente enthielt N^4-Benzoyl-2'-desoxycytidin, N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin und N^4-Benzoyl-3',5'-O-bis(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin, und die Anteile der entsprechenden Peakbereiche entsprachen jeweils 0,07 %, der Nachweisgrenze (0,01 %) oder weniger bzw. 0,1 %.

BEISPIEL 5

Synthese von hydratisierten Kristallen von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin

[0048] N^4-Benzoyl-2'-desoxycytidin (40,3 g) wurde in Pyridin (302,4 g) suspendiert, und die Suspension wurde auf 10 °C abgekühlt. Zu der Suspension wurde 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (47,5 g) bei 10 °C zugesetzt, und das Gemisch wurde 4 h lang bei dieser Temperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde Natriumhydrogencarbonat (12,9 g) zu dem Gemisch zugesetzt und 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde die Reaktionsflüssigkeit eingeengt. Butylacetat (473 g) wurde zum Rückstand zugegeben, und das resultierende Gemisch wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt, wonach die unlösliche Komponente abfiltriert wurde. Hexan (140 g) wurde zu der resultierenden organischen Phase bei Raumtemperatur zugetropft. Wasser (3,3 g) und die hydratisierten Kristalle von N^4 Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (0,1 g), die in Beispiel 1 hergestellt wurden, wurden zu der organischen Phase zugesetzt. Das Gemisch wurde 1 Tag lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Zielsubstanz zu kristallisieren, wonach Hexan (93 g) zugetropft wurde und die Kristallisation 5 h lang bei Raumtemperatur wiederholt wurde.

[0049] Die resultierenden Kristalle wurden abfiltriert und in Vakuum bei 50 °C getrocknet, um hydratisierte Kristalle von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (63,7 g) zu liefern. Das DSC-Thermogramm wies einen endothermen Peak bei 110 °C auf, was den Schmelzpunkt der Kristalle anzeigt.

[0050] Die Komponente enthielt N^4-Benzoyl-2'-desoxycytidin, N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin und N^4-Benzoyl-3',5'-O-bis(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin, und die Anteile der entsprechenden Peakbereiche entsprachen jeweils 0,05 %, der Nachweisgrenze (0,01 %) oder weniger bzw. 0,15 %.

BEISPIEL 6

Reinigung von hydratisierten Kristallen von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin

[0051] Die hydratisierten Kristalle von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (60 g), die in Beispiel 5 hergestellt wurden, und Aktivkohle (3 g) wurden zu Acetonitril (300 g) zugesetzt, und das resultierende Gemisch wurde 1 h lang bei 55 °C gehalten. Die unlösliche Komponente wurde abfiltriert. Wasser (240 g) wurde zugetropft, und die hydratisierten Kristalle von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (0,1 g) wurden zu der Lösung zugesetzt. Das resultierende Gemisch wurde bei Raumtemperatur 2 h lang stehen gelassen, um die Zielsubstanz zu kristallisieren.

[0052] Weiters wurde Wasser (240 g) zugetropft, und die Kristallisation wurde 2 h lang bei Raumtemperatur wiederholt. Die resultierenden Kristalle wurden abfiltriert und in Vakuum bei 50 °C getrocknet, um die hydrati-

sierten Kristalle von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (55,8 g) zu reinigen. Der Feuchtigkeitsgehalt der Kristalle wurde unter Einsatz des Karl-Fischer-Verfahrens bestimmt und betrug 2,3 %.

[0053] Das DSC-Thermogramm wies einen endothermen Peak bei 114 °C auf, was den Schmelzpunkt der Kristalle anzeigt.

[0054] Die Komponente enthielt N^4-Benzoyl-2'-desoxycytidin, N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin und N^4-Benzoyl-3',5'-O-bis(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin, und die Anteile der entsprechenden Peakbereiche entsprachen jeweils der Nachweisgrenze (0,01 %) oder weniger, der Nachweisgrenze (0,01 %) oder weniger bzw. 0,05 %.

BEISPIEL 7

Synthese von hydratisierten Kristallen von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin

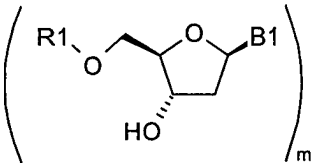
[0055] Die hydratisierten Kristalle von N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (40 g) wurden in einem Trockenschrank in Vakuum (10 mmHg) bei 65 °C 40 h lang unter einem Stickstoffstrom getrocknet, um N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (39,1 g) in Form eines weißen Pulvers zu liefern. Der Feuchtigkeitsgehalt der Kristalle betrug 0,1 %. Das XRD-Diagramm wies keinen deutlichen Reflex auf, was anzeigt, dass das Pulver amorph war. Dementsprechend wies das DSC-Thermogramm keinen endothermen Peak auf.

VERGLEICHSBEISPIEL 1

[0056] Unter Bezugnahme auf PCT-Veröffentlichung Nr. WO00/75154 wurde das nicht-hydratisierte N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-d imethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (2,00 g), umfassend N^4-Benzoyl-2'-desoxycytidin, N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin und N^4-Benzoyl-3',5'-O-bis(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin mit Peakbereichanteilen von 1,0 %, 0,15 % bzw. 2,2 %, in Acetonitril (2,3 ml) gelöst. Die Lösung wurde zu Wasser (41 ml) unter starkem Rühren zugetropft, und das resultierende Gemisch wurde 1 h lang gerührt. Ein weißer Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, zwei Mal mit Wasser gewaschen und bei 50 °C in Vakuum getrocknet, um N^4-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin (1,82 g) zu liefern. Das XRD-Diagramm und das DSC-Thermogramm zeigten weder einen Absorptionspeak noch einen endothermen Peak aufgrund von Kristallisation, was anzeigt, dass die resultierenden Komponenten nicht kristallisiert waren. Weiters enthielt die Komponente N^4-Benzoyl-2'-desoxycytidin, N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin und N^4-Benzoyl-3',5'-O-bis(4,4'-d imethoxytrityl)-2'-desoxycytidin, und die entsprechenden Peakbereiche betrugen 0,9 %, 0,13 % bzw. 1,8 %, was anzeigt, dass das oben beschriebene Verfahren im Wesentlichen keine Wirkung auf die Reinigung hatte.

Patentansprüche

1. Hydratisierter Kristall eines geschützten 2'-Desoxycytidin der allgemeinen Formel (1):



(H_2O) n (1)

worin:
m und n jeweils eine ganze Zahl darstellen;
R1 eine 4-Methoxytrityl-, 4,4'-Dimethoxytrityl- oder Triphenylmethylgruppe darstellt; und
B1 eine Cytosingruppe mit einer geschützten Aminogruppe darstellt.

2. Hydratisierter Kristall nach Anspruch 1, worin die geschützte Aminogruppe eine Aminogruppe ist, die durch eine Schutzgruppe, ausgewählt aus: einer Alkylgruppe, einer Alkylacylgruppe und einer Benzoylgruppe, geschützt ist und die gegebenenfalls substituiert ist.

3. Hydratisierter Kristall nach Anspruch 2, worin die Schutzgruppe eine Benzoylgruppe ist, die gegebenenfalls substituiert ist.

4. Hydratisierter Kristall nach Anspruch 3, worin die Phenylgruppe in der Benzoylgruppe einen Substituen-

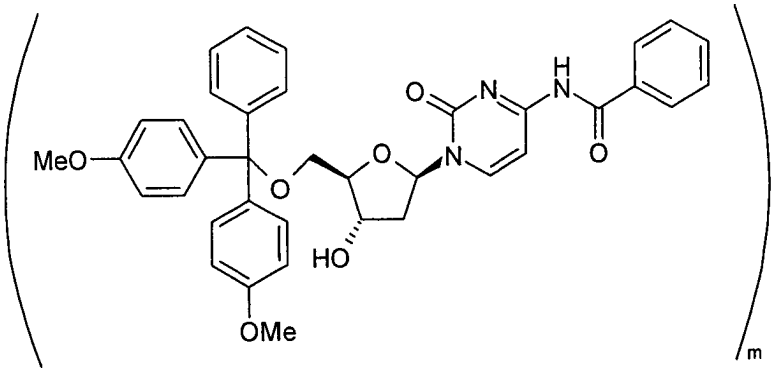
ten an entweder einer 2-, 3- oder 4-Position aufweist oder mehrere Substituenten an diesen Positionen aufweist.

5. Hydratisierter Kristall nach Anspruch 3 oder Anspruch 4, worin der/die Substituent(en) ausgewählt ist/sind aus:
Alkyl,
Hydroxyl,
Alkoxy,
Nitro,
Halogen,
Amino,
Alkylamino,
Acyl,
Phenyl und
Pyridinyl.

6. Hydratisierter Kristall nach Anspruch 3 oder Anspruch 4, worin der/die Substituent(en) ausgewählt ist/sind aus:
Methyl, Ethyl, 2-Propyl, n-Butyl, tert-Butyl,
Methoxy, Ethoxy, n-Propyloxy, 2-Propyloxy, n-Butyloxy,
Fluor, Chlor, Brom, Iod,
Methylamino, Ethylamino, n-Propylamino, Dimethylamino, Diethylamino, Diisopropylamino,
Acetyl, Propionyl und Benzoyl.

7. Hydratisierter Kristall nach Anspruch 2, worin die Schutzgruppe ausgewählt ist aus:
Benzoyl,
2-Chlorbenzoyl, 3-Chlorbenzoyl, 4-Chlorbenzoyl,
2-Brombenzoyl, 3-Brombenzoyl, 4-Brombenzoyl,
2-Fluorbenzoyl, 3-Fluorbenzoyl, 4-Fluorbenzoyl,
2-Methoxybenzoyl, 3-Methoxybenzoyl, 4-Methoxybenzoyl,
2-Nitrobenzoyl, 3-Nitrobenzoyl, 4-Nitrobenzoyl,
2-Aminobenzoyl, 3-Aminobenzyl, 4-Aminobenzoyl,
2-Methylaminobenzoyl, 3-Methylaminobenzoyl, 4-Methylaminobenzoyl,
2-Dimethylaminobenzoyl, 3-Dimethylaminobenzoyl, 4-Dimethylaminobenzoyl,
4-Phenylbenzoyl und
4-Acetylbenzoyl.

8. Hydratisierter Kristall nach Anspruch 1 der allgemeinen Formel (2):



$(H_2O)\ n$ (2)

9. Hydratisierter Kristall nach einem der Ansprüche 1 bis 8, worin der Gehalt an N^4-Benzoyl-3'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxycytidin 0,1 % oder weniger beträgt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen