



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 48152

(13) C2

(51) 6 C07H19/06

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ГІДРОХЛОРИДУ ГЕМЦИТАБІНУ

1

2

(21) 97062781

(22) 14 11 1995

(24) 15 08 2002

(86) PCT/US95/14864, 14 11 1995

(31) 08/355,372

(32) 13 12 1994

(33) US

(46) 15 08 2002, Бюл. № 8, 2002 р

(72) Бергпунд Ричард Алан, US

(73) Елі Лілл енд Компані, US

(56) EP, A1, 0 577 303, 21 06 1993, кл. C07H 19/04

US, A, 4 526 988, 02 07 1985, кл. C07D 307/32

US, A, 5 223 608, 29 06 1993, кл. C07H 1/00

(57) 1 Спосіб одержання гідрохлориду гемци-  
табіну, який включає

а) відщеплення захисних груп від  $\beta$ -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону каталітичною кількістю алкіламіну у присутності метанолу або етанолу у середовищі, практично вільному від води,

б) оброблення одержаного розчину хлористоводневою кислотою та протирозчинником, і

с) виділення одержаного твердого гідрохлориду гемцитабіну

2 Спосіб за п 1, де алкіламіном є діетиламін

3 Спосіб за п 1, де розчинником на стадії (а) є метанол

4 Спосіб за п 3, де протирозчинник на стадії (б) вибраний з-поміж ацетону, ацетонітрилу, тетрагідрофурану, пропанолу, бутанолу, ізобутанолу, втор-бутанолу та ізопропанолу

5 Спосіб за п 4, де протирозчинником є ізопропанол

6 Спосіб за п 5, де співвідношення метанолу та ізопропанолу становить 1:1

7 Спосіб за п 3, де використовують 15-25 мл метанолу на 1 г  $\beta$ -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону8 Спосіб за п 7, де використовують 20 мл метанолу на 1 г  $\beta$ -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону9 Спосіб за п 1, де  $\beta$ -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-он одержують *in situ* з 2-деокси-2,2-дифтор-3,5-добензоіл-D-рибофуранозил-1-

метансульфонату та цитозину

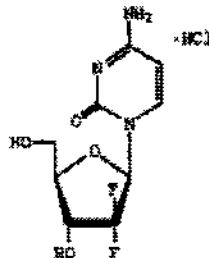
10 Спосіб за п 9, де використовують 10-20 мл метанолу на 1 г 2-деокси-2,2-дифтор-3,5-добензоіл-D-рибофуранозил-1-метансульфонату

11 Спосіб за п 10, де протирозчинником є ізопропанол

12 Спосіб за п 11, де співвідношення метанолу та ізопропанолу становить приблизно 1:1

Передумови створення винаходу

Гідрохлорид 1-(2'-деокси-2',2'-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону (відомий також як гідрохлорид 2'-деокси-2',2'-дифторцитидину або гідрохлорид гемцитабіну - див. Формула I) належить до ряду 2'-деокси-2',2'-дифторнуклеозидів, відомих у техніці. Такі сполуки описані у патентах США № 4,526,988 та № 4,808,614, де вказано на їх антивірусну активність. У заявці № 184,365 на Європейський патент вказано, що ці ж дифторнуклеозиди мають онколітичну активність. Гідрохлорид гемцитабіну піддається клінічним випробуванням для визначення його придатності як засобу для лікування різноманітних ракових пухлин, наприклад, раку підшлункової залози.



(I)

Синтез гемцитабіну є багатостадійним процесом - див. патенти США № 4,526,988, № 4,808,614 та № 5,223,608, а також заявки на Європейські патенти № 577,303, № 577,304 та № 587,364. У більшості з цих шляхів синтезу як передостанній проміжний продукт використовують  $\beta$ -1-(2'-деокси-

(13) C2

(11) 48152

(19) UA

2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-он, який піддають відщепленню захисних груп та перетворенню в сіль для одержання кінцевого бажаного продукту у вигляді хлористоводневої солі. Наприклад, у патенті США № 5,223,608, колонка 10, рядок 41 і далі, вказано, що бензоільні захисні групи "видаляють гідролізом за допомогою сильно або помірно сильної основи".

Вказано також, що "для кожної з захисних груп потрібно, щонайменше, один молярний еквівалент основи". У прикладах 7 та 11 цього патенту описано використання безводного аміаку у метанолі для здійснення цього відщеплення захисних груп, результатом чого є утворення хлориду амонію, який не розчиняється у використовуваних органічних розчинниках і має бути видалений шляхом оброблення водою.

Одержання хлористоводневої солі гемцитабіну також описано в літературі. Див. патент США № 5,223,608, колонка 11, рядок 22 і далі, а також Приклад 8, де для одержання кристалічного гідрохлориду гемцитабіну використовують гарячий ізопропанол та концентровану хлористоводневу кислоту.

Цей винахід пропонує більш економічний спосіб одержання гідрохлориду гемцитабіну, що забезпечує підвищений вихід. Спосіб виключає використання надлишку основи та втрати продукту внаслідок присутності води.

Розкриття суті винаходу

Цей винахід пропонує спосіб одержання гідрохлориду гемцитабіну, який включає

а) відщеплення захисних груп від  $\beta$ -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону за допомогою каталітичної кількості алкіламіну у присутності метанолу або етанолу у середовищі, практично вільному від води,

б) оброблення отриманого розчину хлористоводневою кислотою та протирозчинником (агентом, що осаджує продукт з розчину), і

с) виділення одержаного твердого гідрохлориду гемцитабіну.

Найкращий варіант здійснення винаходу

При відщепленні захисних груп від  $\beta$ -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону, протонний розчинник, який використовується, є фактично нуклеофілом, який атакує бензоільну групу. Ця атака каталізується основою, і в стехіометричних кількостях основи нема потреби.

Термін "алкіламін" у значенні, використовуваному в цьому описі, означає органічний амін, який містить одну, дві або три алкільні групи і який здатен доводити рН реакційної суміші до рівня, щонайменше, 9,5. Прикладами таких реагентів є метиламін, етиламін, пропіламін, ізопропіламін, бутиламін, диметиламін, діетиламін, дипропіламін, діізопропіламін, дибутиламін, етаноламін, триметиламін, триетиламін, трипропіламін, N-метил-N-етиламін, N-метил-M-пропіламін, N-метил-N-бутиламін, M-етил-M-пропіламін тощо. Як буде показано нижче, цей винахід вимагає, щоб гідрохлорид алкіламіну також був розчинним у реакційній суміші. Крім того, для забезпечення умов ефе-

ктивного протікання реакції, алкіламін має бути досить нелетким, щоб забезпечити ефективне проходження реакції при підвищених температурах. Виходячи з цього, у цій реакції алкіламіном, якому віддається перевага, є діетиламін, хоча можливе використання також інших алкіламінів.

Термін "каталітична кількість" стосується кількості алкіламіну, яка сприяє нуклеофільній атаці протонного розчинника на бензоільні захисні групи. Як правило, використовують 0,1-0,5 молярного

еквівалента (відносно застосовуваної кількості  $\beta$ -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону), найбільша перевага віддається 0,2-0,4 еквівалента, однак, обізнаним фахівцям зрозуміло, що оптимальна кількість використовуваного алкіламіну буде залежати від хімічних та фізичних властивостей алкіламіну за умови, що рН реакційного середовища підтримується на рівні не нижче 9,5.

Вираз "у середовищі, практично вільному від води" вказує, що реакцію проводять без додаткової кількості води. Тому перевага віддається використанню реагентів та розчинників, які практично не містять води. Реакційну суміш можна захищати від атмосферної вологості, але ця пересторога не є обов'язковою. Цьому обмеженню, яке не є критичним для реакції відщеплення захисних груп, віддається перевага, оскільки кінцевий цільовий продукт - гідрохлорид гемцитабіну розчинний у воді і, отже, присутність води буде зменшувати вихід цільового продукту на стадії кристалізації.

Як вказано вище, при відщепленні захисних груп від  $\beta$ -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону протонний нуклеофіл каталізується основою і, отже, цей протонний реагент і має вирішальне значення для цієї реакції. Оскільки теоретично, для проходження сольволізу може бути використаний будь-який протонний розчинник, перевага віддається використанню спирту, більша перевага - використанню етанолу, а найбільша перевага - метанолу. Перевага цьому вибору віддається з кількох міркувань - по-перше, субстрат та гідрохлорид алкіламіну, а також і кінцевий продукт, розчинні у метанолі. По-друге, як побічний продукт утворюється метилбензоат, котрий також є розчинним у метанолі та осаджувальному розчиннику - ізопропанолі або ацетоні. Метанол можна також використовувати водночас як реагент і розчинник. І, нарешті, як вказано вище, реагент має бути практично вільним від води.

Фахівцям у цій галузі хімії зрозуміло, що теоретично можна використовувати інші субстрати, окрім

$\beta$ -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону, але захисні групи повинні забезпечувати розчинність субстрату та побічного продукту, як описано вище. Крім того, обидві захисні групи не повинні бути обов'язково однаковими. Отже, в разі довільного вибору алкіламіну та протонного розчинника придатними будуть субстрати, в яких 3'-та/або 5'-гідроксильні групи захищені іншими захисними групами, наприклад, заміщеними бензоільними (наприклад, 4-метилбензоїлами), однак, вони не забезпечують переваг і є фактично економічно

менш вигідними для використання

Сольволиз найкраще проводити при температурах від 0°C до 80°C, перевага віддається підвищенням температур. Найбільша перевага віддається температурі кипіння реакційної суміші зі зворотним холодильником (50-60°C, якщо використовують метанол і діетиламін), при таких умовах сольволиз, як правило, завершується на протязі 1-8 год

Перевага віддається використанню кількості метанолу або етанолу, яка відповідає приблизно 15-25 об'ємам на одиницю маси вихідного матеріалу -  $\beta$  -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону (мг/г). Оптимальним співвідношенням є 20 об'ємів метанолу на одиницю маси. Перевага віддається також використанню кількості протирозчинника, яка приблизно відповідає кількості використовованого метанолу або етанолу, хоча придатними є також інші співвідношення. Якщо  $\beta$  -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-он одержують in situ з 2-деокси-2,2-дифтор-3,5-дибензоіл-О-рибофуранозил-1-метансульфонату і цитозину (наприклад, як описано у заявці на Європейський патент № 577,303), то вихід  $\beta$  -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону становить, як правило, 70%, якщо цю схему реакції включено в запропонований спосіб, то кількість використовованого метанолу або етанолу відповідає 10-20 об'ємам відносно вихідного матеріалу - мезипату (див., наприклад, поданий нижче Приклад 3)

Процес утворення та виділення гідрохлориду гемцитабіну виконують звичайно шляхом охолодження реакційної суміші після сольволізу до температури навколишнього середовища та додавання протирозчинника, наприклад, ацетону, ацетонтрилу, тетрагідрофурану, пропанолу, бутанолу, ізобутанолу, втор-бутанолу або ізопропанолу, якому віддається перевага. Основа гемцитабіну, алкіламін, гідрохлорид алкіламіну та метилбензоат - усі ці сполуки розчинні у цій суміші, однак при введенні хлористого водню цільовий гідрохлорид гемцитабіну буде кристалізуватися, в той час як побічні продукти та реагенти, які не прореагували, залишаться у розчині. Хлористий водень, як правило, додають у вигляді газоподібного хлористого водню або концентрованої хлористоводневої кислоти до pH 1,5-2,0, надлишок кислоти, зокрема, хлористоводневої кислоти, не потрібен і може негативно вплинути на вихід. Незважаючи на те, що до складу концентрованої хлористоводневої кислоти входить вода, ця мінімальна кількість води істотно не впливає на вихід.

Утворений гідрохлорид гемцитабіну потім виділяють з реакційної суміші за допомогою традиційних засобів, тобто, фільтрування, центрифугування, відстоювання тощо.

Вихідні матеріали та проміжні продукти для одержання сполук згідно з цим винаходом є у продажу або їх можна легко одержати за допомогою інших методів, відомих з літератури. Посилання на відповідні літературні методики цитовані у прикладах та перелічені після наведеного нижче розділу

прикладів

Подані нижче приклади додатково ілюструють одержання сполук згідно з цим винаходом. Приклади подано лише з метою ілюстрації, їх не слід розглядати як такі, що у будь-який спосіб обмежують об'єм цього винаходу.

Терміни та аббревіатури, які використовуються у цих прикладах, при відсутності спеціальних вказівок мають свої звичайні значення, наприклад, «PXBE» ("HPLC") означає рідинну хроматографію високої ефективності, "°C" - градуси за Цельсієм, «ммоль» ("mmol") - мілімоль, «г» ("g") - грам, «л» ("L") - літр, «мл» ("ml") - мілілітр, "M" - молярний або молярність, «екв» ("eq") - молярний еквівалент.

Приклад 1

Гідрохлорид 1 - (2' -деокси-2', 2' -дифтор- D-рибофуранозил) -4-амінопіримідин-2-ону

$\beta$  -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-О-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-он (0,24г, 0,51ммоль, 1 екв.) суспендували у метанолі (7мл), потім додавали діетиламін (0,01мл, 0,102ммоль, 0,2екв.) Суміш нагрівали при 55°C протягом 2 год 20 хв.

Для виділення продукту суміш фільтрували, фільтр промивали ізопропанолом (3,5мл). Фільтрат та промивну рідину змішували, pH за допомогою концентрованої хлористоводневої кислоти (0,3мл) доводили до 1,5-2,0. Осад випадав через 1-2 хв. Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 год і фільтрували. Твердий продукт промивали спочатку ізопропіловим спиртом (5мл), а потім ацетоном (5мл). Дані PXBE показують, що ступінь чистоти вищезгаданого продукту перевищує 99%.

Ідентифікацію основних компонентів розчину виконували порівнянням даних PXBE з автентичними стандартними зразками. Пробу для PXBE готували таким чином: 0,6-0,8г реакційної суміші або 10-15мг 1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону вмішували в мірну колбу 50мл і доводили об'єм до мітки водою. Колонку промивали елюентом A=0,05M ацетатний буфер, pH 5,0, B=ацетонтрил, швидкість потоку 1,5мл/хв. Профіль елюенту: 97% A, 3% B на протязі 5 хв, градієнт до 30% A, 70% B протягом 10 хв, 30% A, 70% B на протязі 5 хв, повернення до 97% A, 3% B протягом 2 хв і підтримання цього складу елюенту протягом 13 хв. Використовували колонку Zorbax RxC8 довжиною 25см. Довжина хвилі детектування 275нм, швидкість потоку у колонці 1,5мл/хв, об'єм проби 10мкл.

За допомогою PXBE були визначені такі значення часу затримання:

- цитозин та інші домішки - 2,4-2,6 хв,
- $\alpha$  -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-он - 5-6 хв,
- $\beta$  -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-он - 6-7 хв,
- бензойна кислота - 10-11 хв,
- 1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3'- або 5'-монобензоіл-D-Рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-он - 14-15 хв,
- метилбензоат - 16,5-17,5 хв, і
- $\beta$  -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-О-бензоіл-D-Рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-он

- 19-20 хв

#### Приклад 2

Гідрохлорид 1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону

$\beta$ -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-O-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-он (0,24г, 0,51ммоль, 1екв) суспендували у метанолі (7мл), потім додавали пропіламін (0,0084мл, 0,102ммоль, 0,2екв) Суміш нагрівали при 55°C протягом 3 год

Для виділення продукту суміш фільтрували, фільтр промивали ізопропанолом (3,5мл) Доводили рН суміші фільтрату та промивної рідини до 1,5-2,0 за допомогою концентрованої хлористоводневої кислоти (0,3мл) Осад утворювався через 1-2 хв Суміш перемішували при 0-5°C протягом 90 хв і фільтрували Твердий продукт промивали спочатку ізопропіловим спиртом (5мл), а потім ацетоном (5мл) Дані аналізу способом РХВЕ, виконаного, як описано у Прикладі 1, показали, що ступінь чистоти виділеного твердого продукту становив 98,9%

#### Приклад 3

Гідрохлорид 1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону

$\beta$ -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-O-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-он (отриманий шляхом реакції 3,836г 2-деокси-2,2-дифтор-3,5-дibenzoіл-D-рибофуранозил-1-метансульфонату (8,4ммоль) з 20,0г (180ммоль) цитозину, як описано у заявці на Європейський патент № 577,303) суспендували у метанолі (54мл) Суміш нагрівали при 50°C протягом 3 год з перемішуванням і доводили рН до 10 за допомогою діетиламіну (0,3мл, 2,9ммоль, 0,34екв) Перемішування продовжували і суміш нагрівали при 55-60°C протягом 14 год

Для виділення продукту додавали до суміші знебарвлювальне активне вугілля (0,17г) та ізопропіловий спирт (40мл) Суміш перемішували при 20-25°C протягом 1 год Суміш охолоджували до 0-5°C, перемішували протягом 30 хв, після чого фільтрували через шар фільтрувального матеріалу Осад на фільтрі промивали ізопропіловим спиртом (14мл) Доводили рН об'єднаного фільтрату до 1,5-1,8 за допомогою концентрованої хлористоводневої кислоти (0,95мл), і суміш після утворення осаду перемішували при 0-5°C протягом 2 год, після чого фільтрували Твердий продукт промивали ізопропіловим спиртом (2x15мл), а потім ацетоном (1x15мл) Дані аналізу способом РХВЕ, проведеного, як описано у Прикладі 1, показали, що ступінь чистоти виділеного твердого продукту становив 99,4% Загальний вихід продукту становив 57,6% (мас) (в розрахунку на мезилат)

#### Приклад 4

Гідрохлорид 1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону

$\beta$ -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-O-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-он (2,58г, 5,48ммоль) суспендували у метанолі (56мл) Суміш нагрівали до 40-45°C при перемішуванні і доводили рН до 10 додаванням діетиламіну (0,1мл, 0,97ммоль, 0,2екв) Перемішування продовжували і суміш нагрівали при 50-60°C протягом 6,5 год Після цього суміш перемішували при 20-25°C протягом ночі (15 год)

Для виділення продукту додавали до суміші знебарвлювальне активне вугілля (0,2г) та ізопропіловий спирт (42мл) Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 год Фільтрували суміш через шар фільтрувального матеріалу, осад на фільтрі промивали ізопропіловим спиртом (14мл) До об'єднаного фільтрату додавали метанол, у такій кількості, щоб загальний об'єм розчину склав 112мл Після цього розчин ділили на два рівні об'єми Доводили рН одного розчину до 1,5, другого - до 2,5 за допомогою концентрованої хлористоводневої кислоти Обидва розчини охолоджували до 0-5°C, перемішували протягом 2 год, після чого фільтрували Твердий продукт на фільтрі, виділений з кожного розчину, промивали ізопропіловим спиртом (5мл), а потім ацетоном (5мл) Після висушування вихід продукту становив з розчину рН 1,5 - 89,6% (мас), з розчину рН 2,5 - 82,8% (мас) Дані аналізу способом РХВЕ, проведеного, як описано у Прикладі 1, показали, що ступінь чистоти продукту, виділеного при рН 1,5, становив 99,1%, ступінь чистоти матеріалу, одержаного при рН 2,5, становив 99,6%

#### Приклад 5

Гідрохлорид 1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-ону

$\beta$ -1-(2'-деокси-2',2'-дифтор-3',5'-ди-O-бензоіл-D-рибофуранозил)-4-амінопіримідин-2-он (0,24г, 0,51ммоль) суспендували у метанолі (7мл), який містив 0,03мл діетиламіну (0,26ммоль, 0,5екв) Суміш нагрівали при 50-60°C протягом 6 год при перемішуванні

Для виділення продукту суміш охолоджували до кімнатної температури і додавали ізопропіловий спирт (7мл) рН суміші доводили до 1,5 за допомогою концентрованої хлористоводневої кислоти (0,30мл) Після перемішування протягом 2-3 хв утворювався осад Перемішування продовжували протягом 1 год при 0-5°C, після цього суміш фільтрували Вихід одержаного продукту становив 98% (мас)

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71