

Ali Suliman

T-1105 (3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi)
favipiraviirin synteesien keskeisenä välituotteena

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Kemiantekniikka

Opinnäytetyö

21.10.2015

Tekijät) Otsikko Sivumäärä Aika	Ali Suliman T-1105 (3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi) favipiraviirin synteesisen keskeisenä välituotteena 32 sivua + 3 liitettä 21.10.2015
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Kemiantekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Prosessien suunnittelu ja käyttö
Ohjaajat)	Hannu Elo, professori, Helsingin yliopisto Kari Salmi, yliopettaja, Metropolia Ammattikorkeakoulu
<p>Tämän insinööriyön tarkoituksena oli valmistaa 3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidia, joka on favipiraviirin (T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi) synteesisen keskeinen välituote. Favipiraviiri (T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi) ja sitä muistuttavat yhdisteet T-1105 ja T-1106 ovat osoittaneet hyvää aktiivisuutta virusinfektioita vastaan laboratorioeläimissä.</p> <p>Insinööriyön aikana syntetisoitiin viisi kertaa T-1105 dieetyyli-2-aminomalonaattihydrokloridista kaksivaiheisella synteessillä. Koko ajan yritettiin säätää reaktion olosuhteita, että ne tulevat optimaalisemmiksi. Osa synteeseistä toimi kuten oli suunniteltu ja osa ei toiminut. T-1105:n synteeseistä kolmesta saatiin tuotetta onnistuneesti ja kahdesta reaktiosta ei syntynyt tuotetta.</p> <p>Insinööriyössä esitetään favipiraviirin valmistuksen optimointitapa, kun se syntetisoidaan vain viidessä vaiheessa dietyyli-2-aminomalonaattihydrokloridista verrattuna aikaisemmin julkistettuun menetelmään, jossa tuote valmistettiin seitsemässä vaiheessa 3-amino-2-pyratsiinikarboksylihaposta. Lisäksi löydettiin nopeampi menetelmä 2-aminomalondiamidihydrokloridin valmistamiseen.</p> <p>Aineiden rakenteita selvitettiin ja varmistettiin NMR-spektroskopiolla, alkuaineanalysaattorilla ja sulamispistelaiteella.</p> <p>Työ suoritettiin Helsingin yliopiston Biokeskuksessa farmaseuttisen biologian osastolla, missä pyritään kehittämään mm. uusia mikrobilääkkeitä.</p>	
Avainsanat	Favipiraviiri, T-1105, ebola-virus, synteesi, antiviraalinen aktiivisuus

Author(s) Title Number of Pages Date	Ali Suliman T-1105 (3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide) as a central intermediate in the synthesis of favipiravir 32 pages + 3 appendices 21 October 2015
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Chemical Engineering
Specialisation option	Process Engineering
Instructor(s)	Hannu Elo, professor , Helsinki University Kari Salmi, Principal Lecturer, Metropolia
<p>The aim of this engineering project was to prepare 3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide (T-1105), which is a central intermediate in the synthesis of Favipiravir (T-705; 6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide). Favipiravir (T-705; 6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide) and the related pyrazinecarboxamide compounds, T-1105 ja T-1106, have shown positive activities against virus infections caused in laboratory animals.</p> <p>During this engineering project 3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide T-1105 was synthesized from diethyl aminomalonate hydrochloride five times by a two-stage synthesis. Every time attempts were made to adjust the reaction conditions so that they would be optimal. Part of the synthesis reactions worked as planned and some did not. Three of the planned T-1105 synthesis reactions successfully yielded the desired product, and two reactions did not yield it.</p> <p>This thesis shows an optimization method of Favipiravir's synthesis (synthesis in 5 steps from diethyl aminomalonate hydrochloride) in previous literature it was synthesized in 7 steps from 3-amino-2-pyrazinecarboxylic acid. In addition, a faster way to produce 2-aminomalonamide hydrochloride, was found.</p> <p>The structures of synthesized molecules were characterized by NMR spectroscopy, elemental analysis and melting point analysis.</p> <p>The thesis was carried out at the University of Helsinki, Division of pharmaceutical biosciences, which aims to develop new antimicrobial drugs.</p>	
Keywords	Favipiravir, T-1105, ebola-virus, synthesis, antiviral activity

Sisällysluettelo

Lyhenteet ja symboliluettelo

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	2
2.1	Ebola-epidemia - Taudin historia ja nykyhetki	2
2.2	NMR-spektroskopia	4
2.3	Alkuaineanalyysi	6
2.4	Favipiraviiri lääkeaineena: ebola, HIV ja influenssa	8
2.5	T-1105 (3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi) favipiraviirin synteisien keskeisenä välituotteena	10
2.6	T-1105:n synteeseistä	11
3	Kokeellinen osa	13
3.1	Työn tavoite	13
3.2	T-1105:n synteisien suoritus, optimointi ja vertailu	14
3.2.1	Synteesi 3-amino-2-pyratsiinikarboksyylilihaposta	16
3.2.2	Synteesi, jossa rengasrakenne tehdään glyoksaalista ja 2-aminomalondiamidista	19
3.2.3	Työssä kehitetty 2-aminomalonamidin uusi helppo synteesi	21
3.2.4	Tuotteiden autenttisuuden varmistus ja puhtaudenselvittely NMR-spektrometrialla.	22
3.3	Johtopäätökset. T-1105:n synteisien vertailu	30
	Kirjallisuusluettelo	32

Liitteet

Liite 1. Työssä käytetyt analyttiset instrumentit.

Liite 2. Työssä käytetty synteasilaitteisto.

Liite 3. Synteesituotteita (T-1105), jonka olen tehnyt yliopiston biokeskuksessa farmaseuttisen biologian osastolla.

Lyhenteet ja symboliluettelo

AIDS	Immuunikato
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
EBOV	Ebola-virus
Favipiravir	T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinkarboksamidi
CMV	Sytomegalovirus
HCV	Hepatiitti C -virus
HIV	Ihmisen immuunikatovirus
HSV	Herpes simplex virus
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi
RNA	Ribonukleinihappo
TMS	Tetramethylsilaani
T-1105	3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi
J	KytKentäväkio
d	Dubletti
δ	Kemiallinen siirtymä
s	Singletti
brs	Leveä singletti

1 Johdanto

Viime vuodesta lähtien tutkimuksen yksi painopiste on ollut Ebola-viruksen aiheuttamien sairauksien ehkäiseminen ja rokotteiden kehittäminen. Ebola on yksi maailman vaarallisimmista taudeista ja vaarana on, että se leviää hallitsemattomasti rajojen yli.

Maaliskuussa 2014 suurin ja pahin Ebola-epidemia historiassa puhkesi Länsi-Afrikassa. Nyt on meneillään kaikkien aikojen laajin Ebola-epidemia. Ebola on suhteellisen harvinaisen tauti. Jos nykyistä epidemiaa ei lasketa, niin Ebolaan on kuollut vuoden 1976 jälkeen kaikkiaan 1700 ihmistä [1]. Lääkehoito on jäänyt kehittämättä, koska ebola on aikaisemmin ollut paikallinen virustauti ja se on vaarallinen tutkia. Lääkeyhtiöiden hyötyminen tästä rahallisesti on ollut vaikeaa ja siksi kiinnostusta ei juuri ole ollut. Tautia on kyllä tavattu Keski-Afrikasta muutamia kertoja, mutta epidemiat ovat olleet suhteellisen pieniä ja rajoittuneet paikallisiksi. Tämänhetkinen epidemia (Zaire-versio) on parempi kuin aikaisemmat yhteensä.

Tämän insinööritöön tarkoituksena oli valmistaa 3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidia (T-1105), joka on favipiraviirin (T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinkarboksamidi) synteessin keskeinen välituote. Työ suoritettiin professori Hannu Elon tutkimusryhmässä Helsingin yliopiston biokeskuksessa farmaseuttisen biologian osastolla 1.09–31.12.2014 Hannu Elon ohjauksessa.

Favipiraviiri (T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinkarboksamidi) ja sitä muistuttavat pyratsiinikarboksamidiyhdisteet T-1105 ja T-1106 ovat osoittaneet hyvää aktiivisuutta laboratorioeläimissä eri RNA-virusten, kuten influenssavirusten, arenavirusten, bunyavirusten, Länsi-Niilin viruksen (WNV), keltakuumeviruksen (YFV) ja suu- ja sorkkatautiin (FMDV) aiheuttamia infektioita vastaan.

Favipiraviiri (T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinkarboksamidi), joka tunnetaan myös nimellä Avigan, on kokeellinen viruslääke, joka on hyväksytty Japanissa käytettäväksi influenssaa vastaan. Lääke näyttää olevan hyödyllinen hiirimallissa Ebola-tautiin, ja kliininen tutkimus on ollut suunnitteilla Ebola-potilaille Guineassa marraskuussa 2014. Favipiraviirilla voidaan hoitaa Ebolaa ja muita virustauteja [2].

2 Kirjallisuuskatsaus

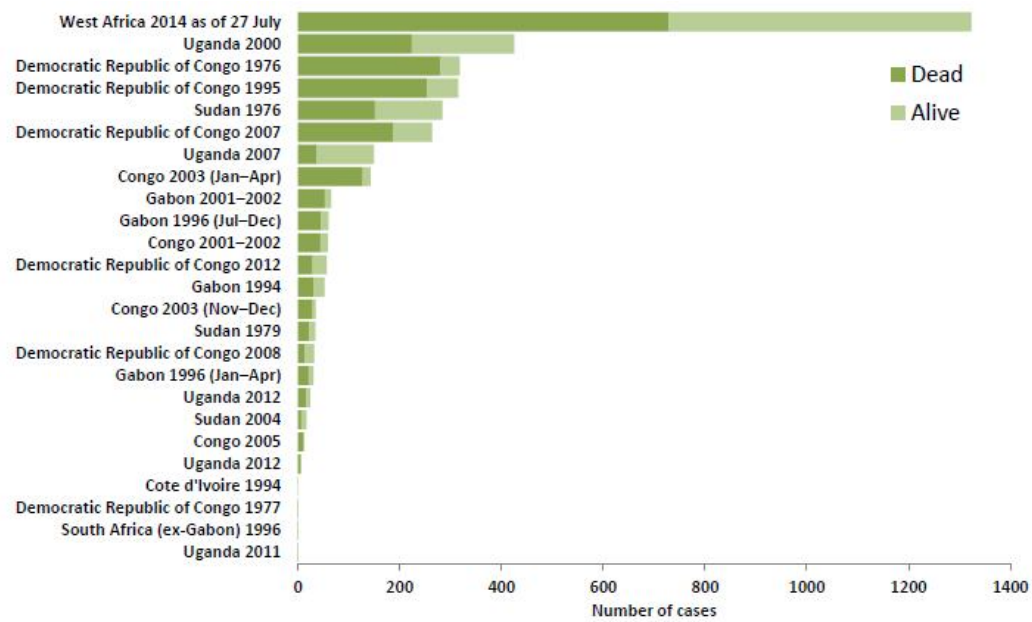
2.1 Ebola-epidemia - Taudin historia ja nykyhetki

Ebola-virus (EBOV) oli ensimmäinen tunnistettu verenvuotokuumevirus. Se löydettiin vuonna 1976, joka on viisi vuotta ennen AIDS:in ja seitsemän vuotta ennen HIV:n löytämistä. Ebola-virus on säännöllisesti johtanut epidemioiden syntymiseen, erityisesti Kongossa (Zaire), Sudanissa ja Ugandassa, mutta vasta viime aikoina se herätti maailmanlaajuisesti huolta.

Historian pahin ja laajin Ebola -epidemia on ollut käynnissä vuodesta 2014 useissa Länsi-Afrikan maissa. Se on aiheuttanut merkittävää kuolleisuutta, jossa ilmoitettu kuolevuus on noin 71 %. Se alkoi levitä Guineassa joulukuussa 2013 ja levisi Liberiaan ja Sierra Leoneen. Paikallinen epidemia (kaksikymmentä tapaus) esiintyi Nigeriassa ja yksi tapaus sattui Senegalissa. Molemmat maat olivat taudista vapaita 20. päivänä lokakuuta 2014. Useita tapauksia on raportoitu Malissa. Todetut tapaukset Yhdysvalloissa ja Espanjassa ovat johtaneet sekundääri-infektioon sairaanhoidon työntekijöille, mutta tauti ei levinnyt edelleen. Maailman terveysjärjestö WHO ja asianomaiset hallitukset ovat 11.11.2014 raportoineet yhteensä 14413 sairastunutta ja 5504 kuolemantapausta, vaikka WHO uskoo, että tämä merkittävästi aliarvioi epidemian suuruuden, jossa todelliset luvut ovat kolme kertaa suuremmat kuin on raportoitu. Lähes kaikki tapaukset ovat olleet kolmessa alkuperäisessä maassa.

Muutamia Ebola-tapauksia ilmeni lokakuun 2014 alussa Yhdysvalloissa, Espanjassa ja Makedoniassa. Espanjassa ja Yhdysvalloissa tauti tarttui sairaaloissa Ebola-potilaista näitä hoitaneisiin henkilöihin. Ebolan pelättiin alkavan levitä Yhdysvalloissa ja Euroopassa.

Alla esitetty kuva1. kertoo EBOV:n leviämisen 1976-2104 [3].



Sources: Adapted from WHO and CDC [3,20]

Kuva 1. Yleiskuvaus Ebov:n puhkeamisesta 1976–2014 (sources Adapted from WHO and CDC) [3].

Ebola on viruksen aiheuttama vakava verenvuotokuume, joka johtaa usein kuolemaan. Tartunnan saaneista yli 50 % kuolee. Ebola-virus aiheuttaa verenvuotokuumeen, jonka oireita ovat muun muassa korkea kuume, ripuli, päänsärky ja veren vuoto [4].

Ebola tarttuu suorassa kosketuksessa sairastuneen tai kuolleen henkilön ruumiinertiteisiin, kuten vereen, sylkeen ja virtsaan[4].

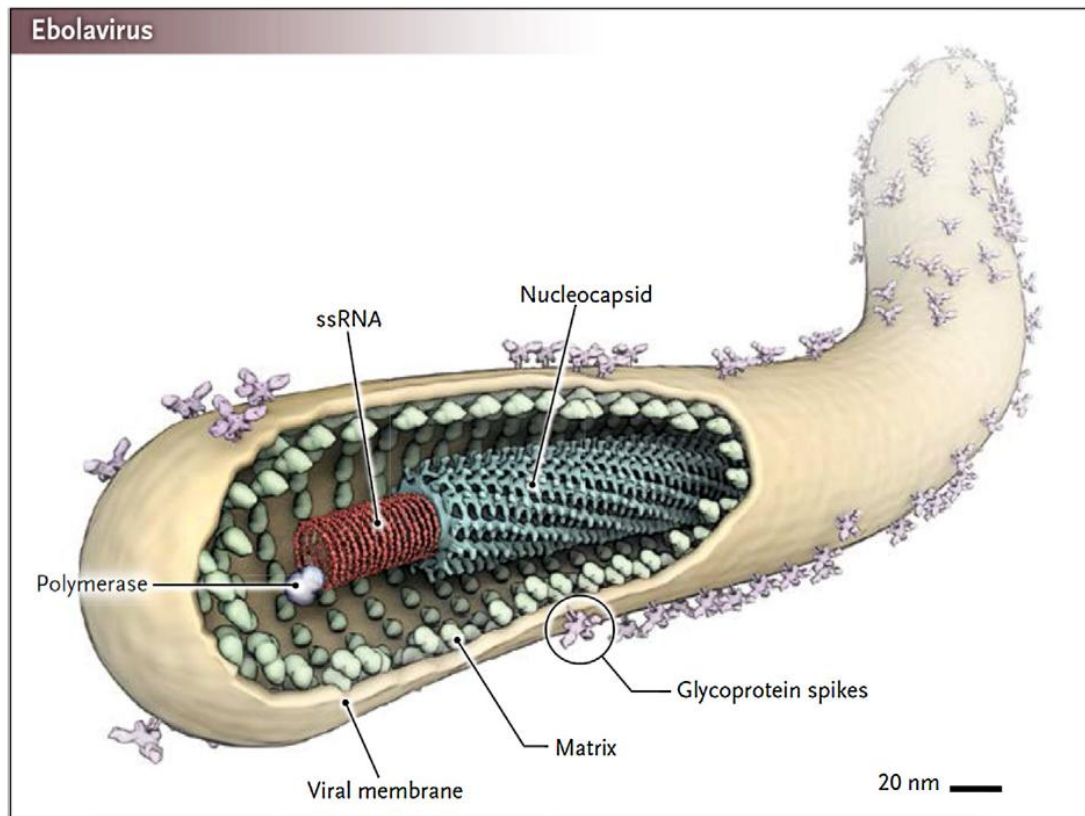
Ebola voi myös tarttua suojaamattomassa seksikontaktissa sairaan tai toipuvan henkilön kanssa (aina yhdeksän viikkoa toipumisen jälkeen). Tartunnan voi saada myös suorassa kosketuksessa elävään tai kuolleetseen villieläimeen, esimerkiksi apinat, antiloopit ja lepakot [4].

Epidemia-alueella tartunnan voi saada sairaalassa. Terveystieteiden työntekijät voivat saada tartunnan hoitaessaan Ebola-potilaita, mikäli varotoimissa on puutteita [4].

Ebola ei tartu ilmateitse, hyttysten välityksellä eikä pilaantuneen ruoan tai veden välityksellä [4].

Ebola voidaan todeta verinäytteestä, osoittamalla vasta-aineita tai itse virus. Ebolaan ei ole olemassa rokotetta. Ebolavirus tuhoutuu helposti saippualla, kloorikäsittelyllä sekä kuivilta pinoilla ja auringon valossa [4].

Kuvassa 2 nähdään EBOV:n rakennekuva [5].



Kuva 2. Ebola-virus rakennekuva [5].

2.2 NMR-spektroskopia

Ydinmagneettista resonansspektroskopiaa (NMR, nuclear magnetic resonance spectroscopy) käytetään pääasiallisesti orgaanisten yhdisteiden rakennemäärityksiin. se on tärkein ja tehokkain orgaanisten yhdisteiden rakennetutkimusmenetelmä. Sillä voidaan monesti selvittää tutkittavan yhdisteen rakennekaavan. NMR:llä pystytään tutkimaan myös aineiden biologisia ominaisuuksia, kuten molekyylien ja niiden osien liikettä nesteessä. Tämä on tärkeää esimerkiksi lääkeainetutkimuksessa. NMR:llä voidaan tutkia myös lääkeaineiden rakenteen ja vaikutuksen välisiä riippuvuuksia. Tavallisimmin sovellutus on kuitenkin rakenteiden selvittäminen tai varmistaminen. NMR perustuu atomiytimien käyttäytymiseen ulkoisessa magneettikentässä. NMR-spektrometri koostuu seuraavista välttämättömistä komponenteista; magneetti, joka generoi B_0 -kentän, radiotaajuuspulssi-generaattori ja vastaanotin, mittapää ja työasema, jolla suorittaa mittaukseen vaadittavat komennot.[6, s. 27]

Ensimmäisissä NMR -spektrometrisissa mittauksissa (1940-luvulla) [7, s. 1]. hyödynnettiin sähkömagneetteja, jotka nykypäivään verrattuna omasivat matalan herkkyyden ja huonon vakauden.[6, s. 27]

Tieteellisen ja teknologisen kehityksen myötä alettiin 1970-luvulla käyttää suprajohteita.[7, s. 1]. Nykyajan spektrometreissa hyödynnetään suprajohtavaa solenoidimagneettia, jonka jäähtyessään neste tyypeä ja neste heliumia apuna käyttäen alle kriittisen lämpötilan, sähköä johtavan materiaalin sähkövastaus häviää. Suprajohteen suurin etu on sen kyky tuottaa stabiili ja jatkuva magneettikenttä, jonka vuoksi saadaan aikaan parempi piikkien erotuskyky [7, s. 35]. Hyödyksi voidaan myös laskea suprajohteen nolla energiankulutus.

NMR -spektrometri käyttää lyhytkestoisia radiotaajuuspulsseja tuottaakseen muutoksen populaatioerossa (α - tilojen suhde $-\beta$ tiloihin). Nykyaikaiset laitteet säteilyttää yhden pussin aikana koko taajuusalueen (FT-NMR). Tutkittavan ytimen resonanssitaajuus sattuu alueelle, joka on vain miljoonasosia (ppm) rf-lähtetimen taajuudesta.

NMR-spektrometrin ehkä tärkein osa mittapää, joka sijaitsee magneettikentän keskellä ja johon näyteputki menee. Mittapäässä on radiotaajuuskämit, jotka ovat viritettyinä tietyille taajuuksille, tutkittavien ytimien taajuusalueille.

Suoritettavaan mittaukseen liittyvät parametrit; pussitusten lukumäärä, relaksaatioaika, sekä muut tarvittavat komennot tehdään tietokoneavusteisesti.

Piikkien paikat spektrissä ilmoitetaan ppm-lukemina (ppm = parts per million /miljoonasosaa) siitä syystä, että varjostuksen vaikutus on vain miljoonasosia absorbitotaajuudesta. Tällaista asteikkoa kutsutaan delta-asteikoksi.

Lukemat esitetään yleensä sisäiseen standardiin verrattuina. Käytetty standardi on tetrametyylisilaani (TMS), jonka delta-arvo= 0 ppm.

Protonispektrissä signaalit eli piikit ovat 5 - 15 ppm välillä, mutta yleisemmin ne sijoituvat välille 0 - 10 ppm. Hiilellä (^{13}C) ppm alue on satoja ppm:ä.

Delta-asteikolla ilmoitettua signaalin paikka sanotaan kemialliseksi siirtymäksi.

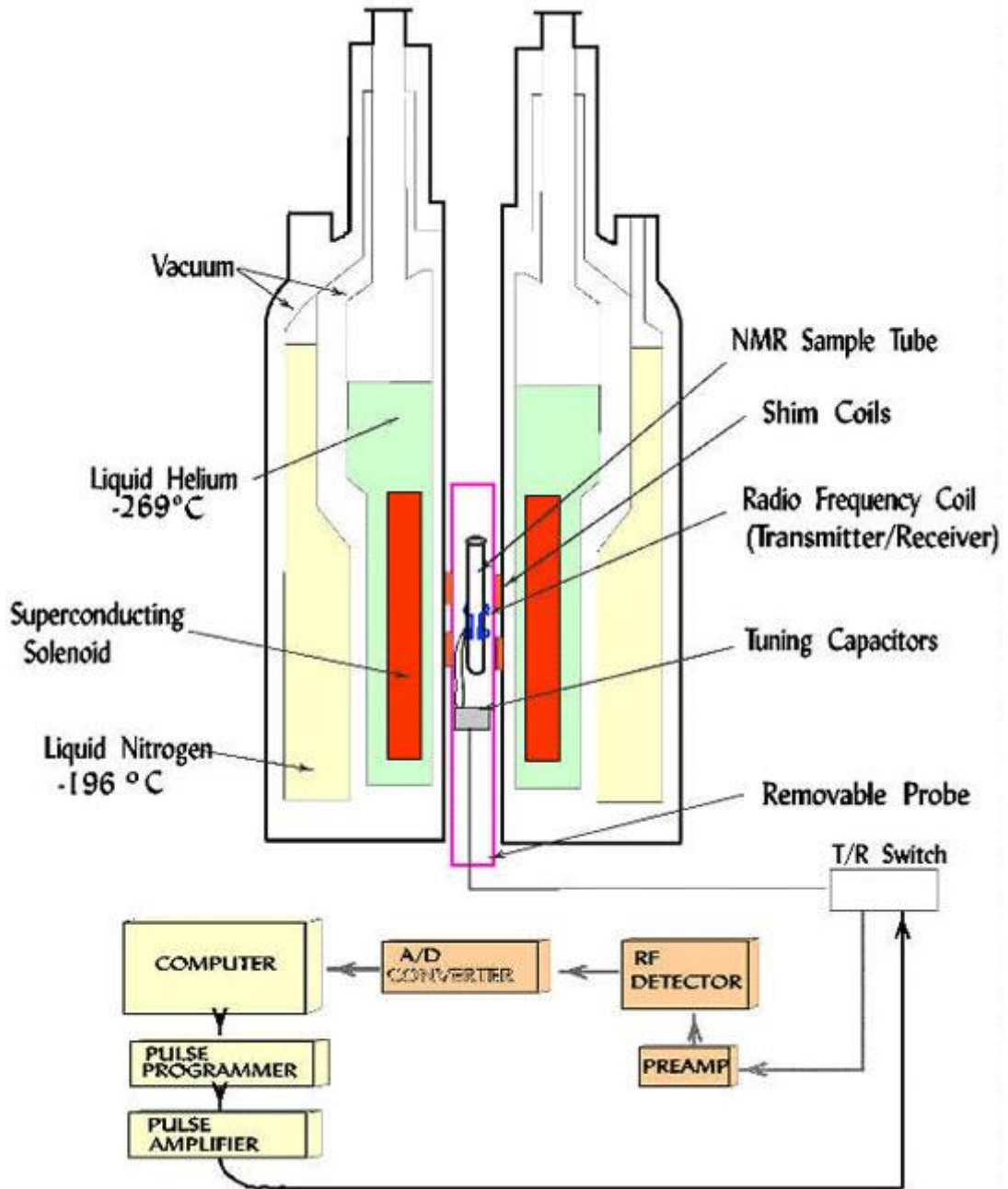
Kemiallinen siirtymä kuvaa siis kemiallisen lähiympäristön vaikutusta protoniin.

NMR-laitteen magneettikenttä jakaa ytimet eri energiatiloihin. Spekttrin mittauksessa sähkömagneettinen säteily siirtää ytimiä näiden energiatilojen välillä joko sen suuntaisesti (α -ydin, spin-arvo = $\frac{1}{2}$) tai sitä vastaan (β -ydin, spinarvo = $-\frac{1}{2}$). Spinsysteemissä jokainen spin on voimakkaan magneettikentän lisäksi vuorovaikutuksessa myös viereisten spinien magneettikenttien kanssa, jolloin jokainen spin resonoi hieman eri taajuudella. Spin-spin-kytkennän avulla voidaan selvittää viereisissä

hiiliatomeissa olevien vetyatomien lukumäärä.

Kemiallisen siirtymän ja spin-spin-kytkennän seurauksena NMR-spektri kuvaa molekyylin rakennetta ja ympäristöä.

Kuvassa 3 on kaaviokuva NMR-spektrometrin ja sen komponenteista.



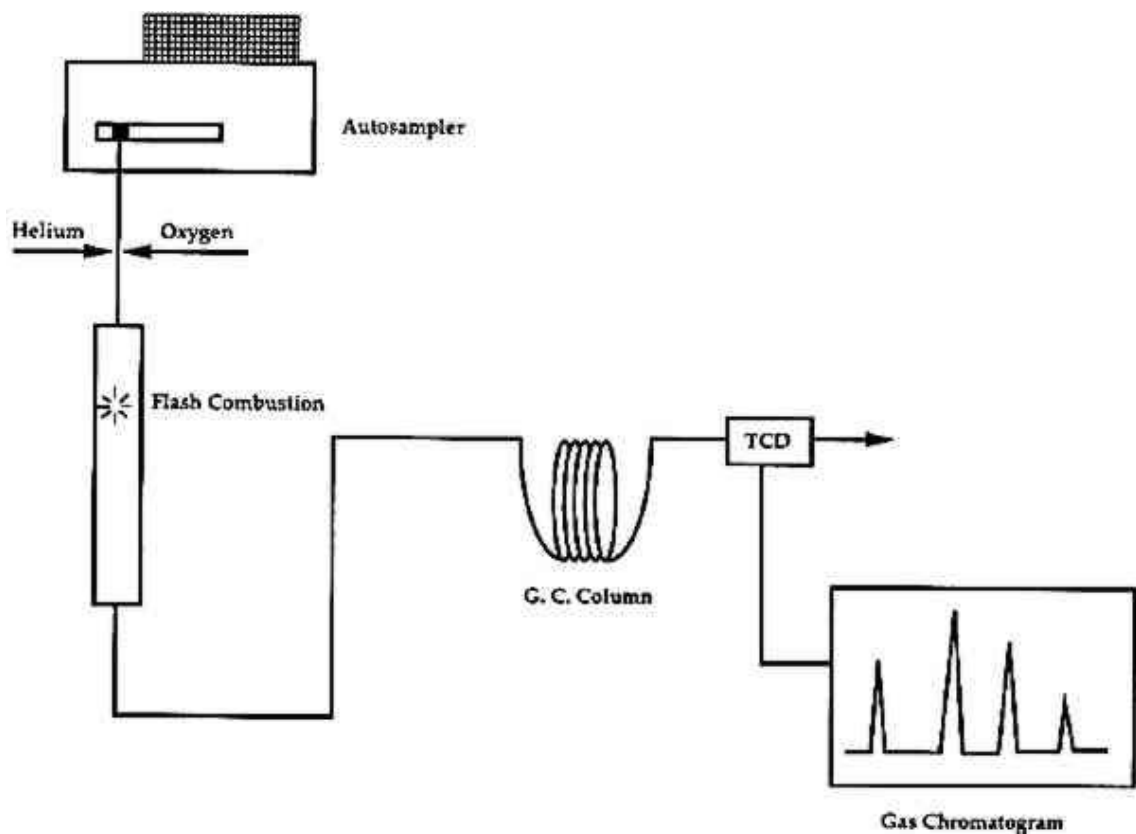
kuva 3. NMR-spektrometri ja sen komponentit [8]

2.3 Alkuaineanalyysi

Alkuaineanalyysiä käytetään tuotteen puhtauden tarkistamiseen ja täydentämään muita analyttisiä menetelmiä. Alkuaineanalyysillä määritetään orgaanisen yhdisteen hiili-,

vety- ja typpipitoisuuksia, myös rikki- ja happipitoisuuksia on mahdollista määrittää. Alkuaineiden määrittäminen tapahtuu polttamalla näyte puhtaassa hapessa ja korkeassa lämpötilassa (noin 1000 °C), jolloin mahdollisia palokaasuja ovat hiilidioksidi, vesihöyry, typen oksidit, alkuaine typpi ja rikin oksidit. Poltossa syntyneet palokaasut analysoidaan, ja sen perusteella poltetun aineen alkuainepitoisuus saadaan selville. Mitatut alkuainepitoisuudet ilmoitetaan prosenttiosuuksina ja niitä verrataan yhdisteelle laskettuihin teoreettisiin arvoihin.

Kuvassa 4 on kaaviokuva alkuaineanalysaattorista ja sen komponenteista.



Kuva 4. Yleinen kaavio alkuaineanalysaattorista ja sen komponenteista [9].

2.4 Favipiraviiri lääkeaineena: ebola, HIV ja influenssa

Mikrobiologian ja infektiosairauksien merkitys lääketieteessä on lisääntymässä. Mikrobitaudit ovat suuri kansanterveydellinen ongelma ja aiheuttavat suuria kustannuksia yhteiskunnalle, vuonna 2000 kirjoitettiin Suomessa kansaneläkelaitoksen tilastojen mukaan noin 2,7 miljoona antibioottireseptiä. Antibioottilääkehoitoa sai 1,5 miljoona suomalaista.

Influenssa on aiheuttanut suurta sairastuvuutta ja kuolleisuutta maailmassa, joten tehokasta hoitoa tarvitaan. Influenssavirus kuuluu orthomyxoviridae-perheeseen. Sitä on kolme tyyppiä, A, B ja C.

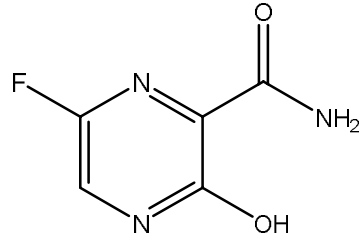
Yhdysvalloissa pelkästään kausi-influenssa aiheuttaa 5 - 20 % amerikkalaistensairastumiseen, mikä tarkoittaa, että yli 200,000 ihmistä joutuu sairaalahoidon ja aiheutuu 36,000 kuolemantapausta [3]. Maailmanlaajuisesti kausi-influenssa aiheuttaa 250000 - 500000 kuolemantapausta vuosittain [10].

Favipiravir (T-705; 6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide), joka tunnetaan myös nimellä Avigan, on kokeellinen viruslääke, joka on hyväksytty Japanissa 2002 (Toyama Chemicals) käytettäväksi influenssaa vastaan. Lääke näyttää olevan hyödyllinen hiirimallissa Ebola-tautia vastaan. Favipiravirilla voidaan hoitaa Ebolaa ja muita virustauteja.

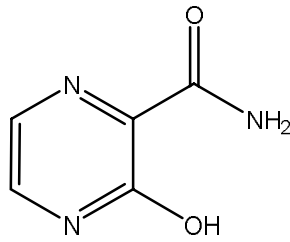
Aiemmin tehdyt tutkimukset soluviljelmässä ja hiirimalleissa ovat osoittaneet, että favipiravirilla on voimakas terapeutinen teho viruksia vastaan (influenssavirukset; tärkeät viruspatogeenit, kuten hepatiitti C- virus (HCV), HIV, HSV, CMV ja norovirus) [11].

Favipiraviirin synteeseistä

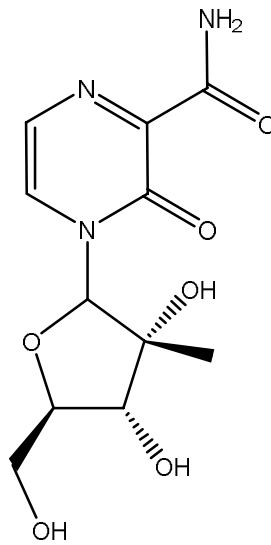
Favipiraviiri (T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi), ja sitä muistuttavat yhdisteet T-1105 ja T-1106 löydettiin ja syntetisoitiin Toyama Chemical Co:ssa. Niiden rakenteet esitetään kuvassa. 5.



Favipiraviiri T-705



T-1105

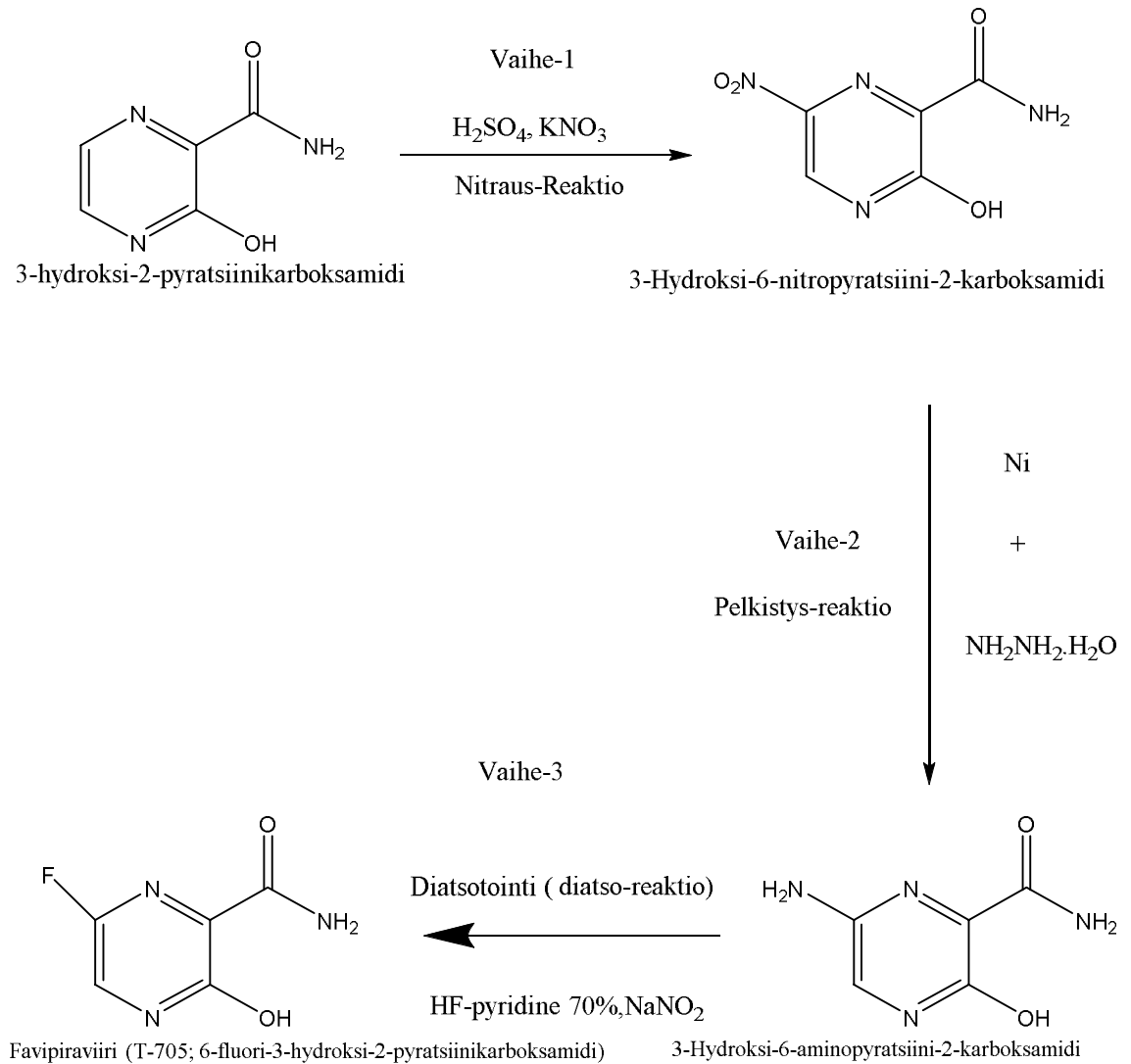


T-1106

Kuva 5. Favipiraviirin (T-705), T-1105:n ja T-1106:n rakennekaavat.

2.5 T-1105 (3-hydroksi-2- pyrasiinikarboksamidi) favipiraviirin synteessin keskeisenä välituotteena

Kuvassa 6 on esitetty reaktiovaiheet yhdessä favipiraviiri:n valmistuksen menetelmästä ongelmana on se, että nitraus-reaktiossa syntyy kaasumaista typpidioksidia NO_2 .



Vaihe-1 : Nitraus-reaktio, jossa NO_2 -ryhmä liitetään kohdemolekyyliin.

Vaihe-2: Pelkistys-reaktio, jossa nitroryhmä pelkistetään aminoryhmäksi

Vaihe-3:Diatsotointi-reaktio, jossa NH_2 -ryhmä hajota diatsoniumsuolan avulla (käytetty diatsointi reagenssi on natriumnitriitin ja fluorihappoa) NH_2 -ryhmän tilalle korvattiin fluorilla.

Kuva 6. T-1105 (3-hydroksi-2- pyrasiinikarboksamidi) favipiraviirin synteessille esitetyt reaktio-vaiheet.

2.6 T-1105:n synteeseistä

T-1105 synteisien toteutuksessa sovellettiin eri artikkelien synteessiohjeita. Valmistettavia molekyylejä on syntetisoitu aiemmin, joten synteisien suunnittelussa nojattiin samankaltaisten molekyyliden synteessiohjeisiin. Työhön kuului myös synteisien lähtöainesten valmistaminen. Synteisien kulut kirjoitettiin tarkasti työn tekohetkellä laboratoriotyöpäiväkirjaan, jonka avulla kirjoitettiin seuraavat synteessiohjeet. Ne ovat tarkkoja kuvauksia siitä, miten synteetit on suoritettu.

Taulukossa 1 on esitetty T-(1105) kemikaalimominaisuuksia.

Taulukko 1. T-(1105) kemikaalimominaisuuksia

Gas rekisteri No	55321-99-8
Kemikaali nimi	3-hydroksi-2- pyratsiinikarboksamidi
Molekyylikaava	C ₅ H ₅ N ₃ O ₂
Molekyylipaino	139,114 g/mol
Aineen tyyppi	heterosyklinen

Taulukko 2. T-(1105) käyttöturvallisuus tiedote (REACH EU 453/2010) mukaisesti

Kauppanimike	3-Hydroxypyrazine-2-carboxamide
Artikkelinumero	H28250
CAS-numero	55321-99-8
Aineen tai seoksen merkitykselliset tunnistetut käytöt	SU24 Tieteellinen tutkimus ja kehitys
Luokitus asetuksen (EY) N:o 1272/2008 mukaisesti	GHS07
Käyttöturvallisuustiedotteen toimittajan tiedot	Alfa Aesar GmbH&Co.KG
H315	Ärsyttää ihoa
H319	Ärsyttää voimakkaasti silmät
H335	Saattaa aiheuttaa hengitysteiden ärsytystä

Taulukossa 2 nähdään T-(1105) käyttöturvallisuustiedote (REACH EU 453/2010) ja luokitus asetuksen (EY) N:o 1272/2008 mukaisesti. Luokitus direktiivin 67/548/ETY tai direktiivin 1999/45/EY mukaisesti:



Haitallinen/ärsyttävä/herkistävä/ vaarallinen otsonikerrokselle

R-lausekkeet:

R36/37/38 : Ärsyttää silmiä, hengityselimiä ja ihoa.

H-lausekkeet: H315/319/H335

Turvalausekkeet

Taulukossa 3 on esitetty T(1105) turvalausekkeet merkinnät.

P261 välttä pölyn/savun kaasun/sumun/höyryn/suihkeen hengittämistä.

varotoimenpiteet, henkilönsuojaimet ja menettely hätätilanteessa:
käytettävä suojavaarustusta.

Ympäristöön kohdistuvat varotoimet: Ainetta ei saa päästä ympäristöön ilman asianmukaisia viranomaisten lupia

Taulukko 3. T(1105) turvalausekkeet merkinnät asetuksen (EY) N: o 1272/2008 mukaisesti.

P261	välttä pölyn/savun kaasun/sumun/höyryn/suihkeen hengittämistä
P305+P351+P338	Jos kemikaalia joutuu silmiin: huuhto huolellisesti vedellä usean minuutin ajan
P302+P352	Jos kemikaalia joutuu iholle: pese runsaalla vedellä ja saippualla.
P321	Eriyishoitoa tarvitaan (katso pakkauksen merkinnöissä).
P405	Varastoi lukitussa tilassa.
P501	Hävitä sisältö/pakkaus paikallisten/alueellisten/kansallisten/kansainvälisten määräysten mukaisesti.

3 Kokeellinen osa

3.1 Työn tavoite

Tavoitteena oli valmistaa Favipiraviirin (T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi) ydinrakenteena toimiva T-1105 (3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi). Favipiraviiri T-705 (6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi), ja sitä muistuttavat yhdisteet pyratsiinikarboksamidi T-1105 ja T-1106 ovat tunnettuja ja niille on julkaistu synteesejä.

Materiaalit

Kemikaali yhdisteet. T-705 kemikaali ja siihen liittyvät pyratsiinikarboksamidit yhdisteet T-1105 ja T-1106 löydettiin ja syntetisoitiin Toyama Chemical Co, Ltd. Niiden rakenteet oli esitetty kuvassa. 5.; 2-Aminomalonamidin valmistamiseen käytetty lähtöaineet ovat dietyyliaminomalonaattihydrokloridi ja 40 % glyoksaali, molemmat ovat valmistettu Merck Schuchardt OHG (Saksa). Ammoniakkiuosta on valmistettu Merk. KGaA (Saksa).

T-1105;3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidin valmistamiseen käytetty lähtöaineet ovat 40 % glyoksaalista , jonka valmistettu Merck Schuchardt OHG (Saksa) ja 2-aminomalonamidia olen syntetisoinut itse.

Synteesi 3-hydroksipyratsiini-2-karboksyylihapon valmistamiseen käytetty lähtöaineet ovat 3-aminopyratsiini-2-karboksyyli happo, 98 % , valmistettu Alfa Aesar . Rikkihappoa ja natrium nitriitti ovat valmistettu VWR chemicals PROLABO.

Tutkimustyössä käytettiin pieninä määrinä lähtöaineita, joiden ainemäärä vaihteli 10.0 – 20.0 *mmol* välillä.

Tässä työssä lääkeaine-ehdokkaiden rakenteiden selvittäminen tai varmistaminen tutkittiin NMR:lla, alkuaineenanalysaattorilla (EA 110 CHNS-O) ja sulamispistelaitteella.

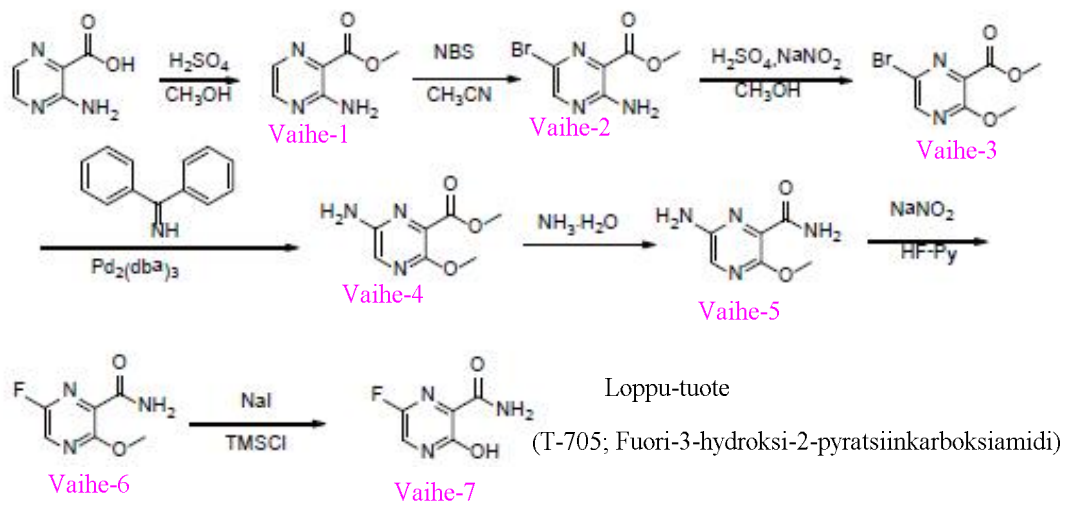
NMR-spektrit saatiin käyttäen Varian Mercury Plus 300 spektrometri, liuotin DMSO-d₆. Kemiälliset siirtymät on raportoitu miljoonasosina (ppm).

Tässä työssä liuottimena käytettiin Aldrich-merkkistä 99,5-atomi-prosenttista deuterioitua dimetyylisulfoksidia eli DMSO-d₆, kiinteää näytettä punnittiin n.40 mg, liuotettiin 800 µl DMSO-d₆:iin, katsottiin liukeneeko aine liuottimen sekaan vai pitääkö se suodattaa NMR-putkeen. Suodatuksessa käytettiin apuna pientä määrää puuvilla, jonka läpi aine pasteur-pipetin avulla pipetoitiin NMR-putkeen.

Valmiin näytteen NMR-spektri mitattiin Varian 300 MHz:n laitteella.

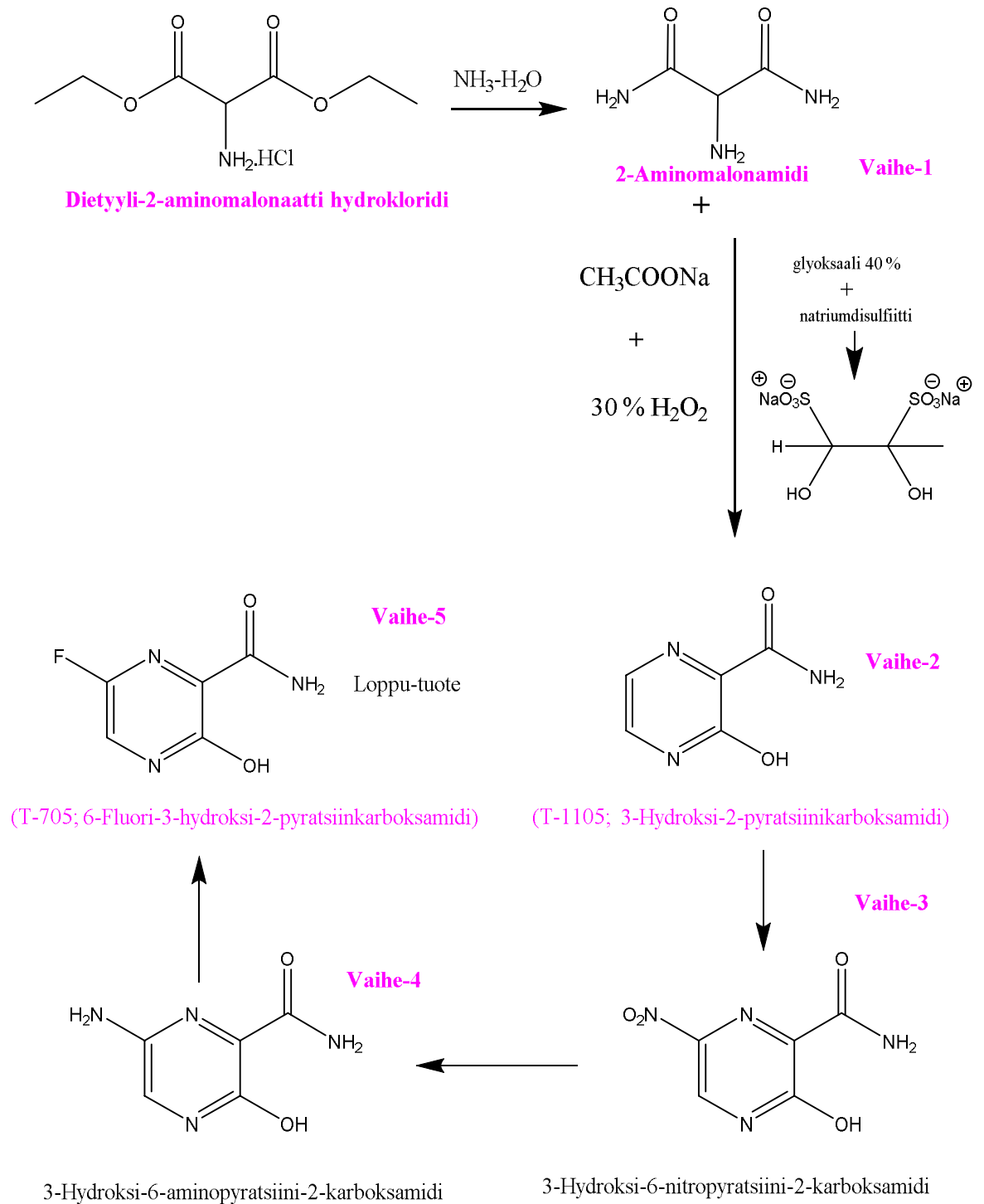
3.2 T-1105:n synteesien suoritus, optimointi ja vertailu

Favipiraviirille (T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi) on aiemmin julkaistu synteettinen menetelmä, joka on esitetty kuvassa 7. Se on syntetisoitu 7-vaiheessa 3-amino-2-pyratsiinikarboksyylihaposta. Kuitenkin, ovat erittäin kalliita, eikä menetelmä sovellu suuren mittakaavan tuotantoon ja sillä on huono saanto.



Kuva 7. Kaavio favipiraviiri:n ((T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi) synteesi menetelmästä, joka on julkistettu aikaisemmin.

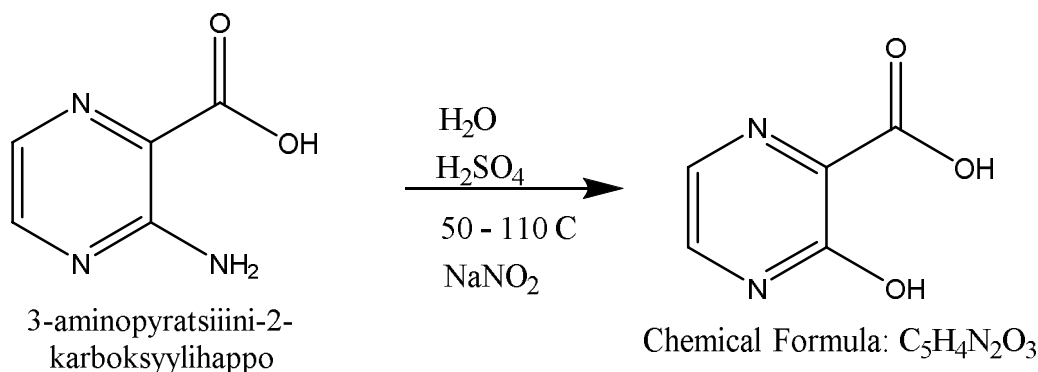
Alla esitetty kuva kertoo T 705 synteessin optimointitavan, jossa yhdiste syntetisoidaan vain 5-vaiheisella menetelmällä dietyyli-2-aminomalonaattihydrokloridista.



Kuva 8. Favipiraviirin (T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinkarboksamidi) synteesi viidessä vaiheissa dietyyli-2-aminomalonaattihydrokloridista.

3.2.1 Synteesi 3-amino-2-pyratsiinikarboksyylihaposta

Kuvassa 9 on esitetty synteesi, jossa 3-aminopyratsiini-2-karboksyylihaposta valmistetaan 3-hydroksipyratsiini-2-karboksyylihappoa.



Kuva 9. 3-Hydroksipyratsiini-2-karboksyylihapon synteesi

Tavoitteena oli syntetisoida 3-hydroksipyratsiini-2-karboksyylihappoa, lähtöaineena käytettiin 3-aminopyratsiinikarboksyylihappoa. Kuvassa 9 esitettiin lähtöaineiden ja reaktiotuotteiden.

3-aminopyratsiinikarboksyylihappo (2 g, 14,37 mmol) liuotettiin 16 ml veteen, 400rpm huoneen lämmössä, Sen väri vesiliuoksessa on beige. Lähtöaineeseen lisättiin (16 ml, 3,75 M) rikkihappoa, rikkihapon lisäyksen yhteydessä väri muuttui beigeistä vihertäväruskeaksi, n. 5 min kuluttua muuttui takaisin beigeiksi, tähän mennessä reaktio tapahtui huoneenlämmössä. Refluksointi alkoi lämmittämällä reaktioseosta 50 °C:een, 20 minuutin kuluttua reaktioseos muuttui kellertäväksi, silloin reaktion sisälämpötila on 45 °C ja hauteenlämpötila on 52 °C. Refluksointi jatkoi edelleen, kunnes lämpötila saavutti 70 °C:tta.

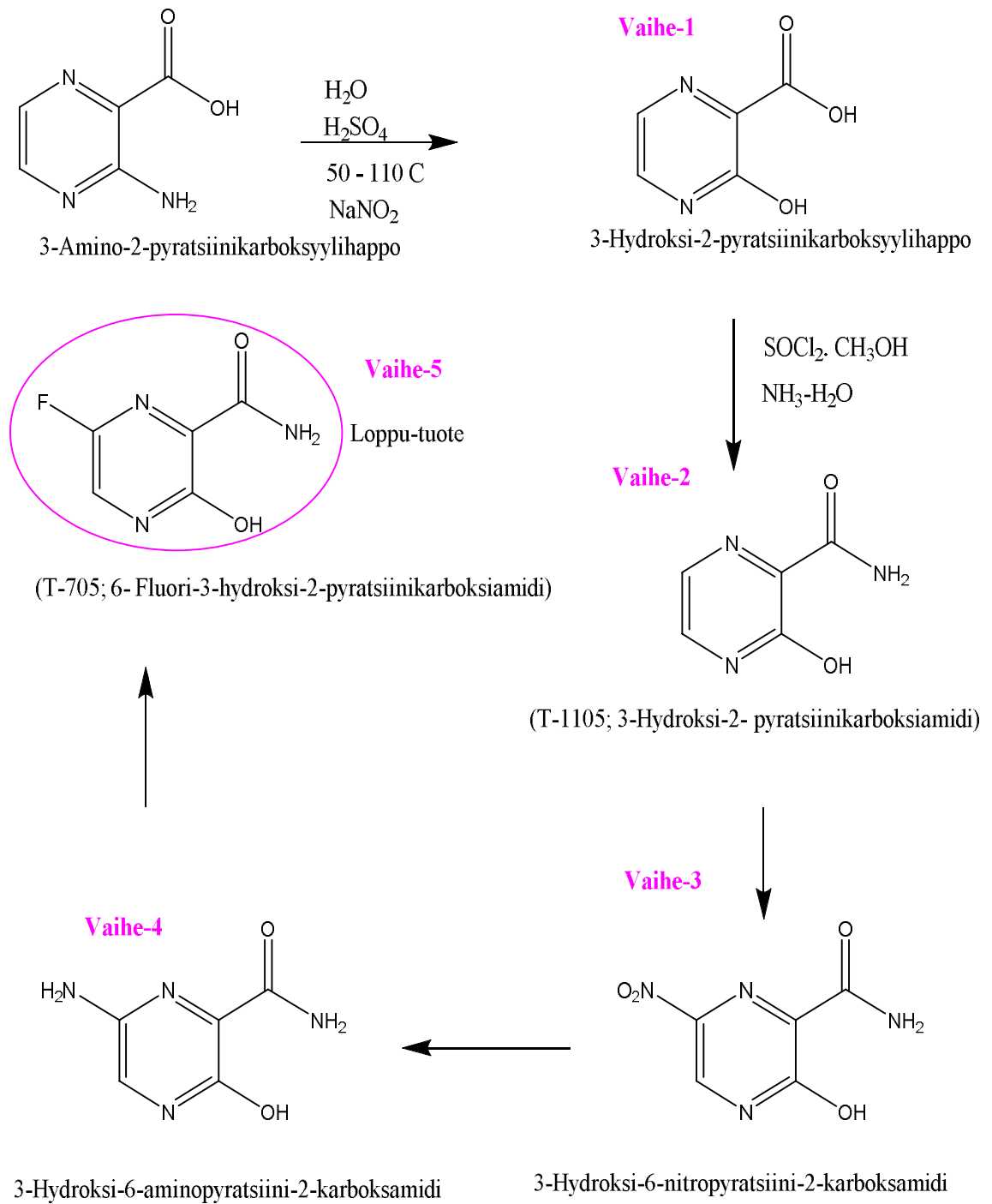
Alettiin tiputtaa natriumnitriitti (1, 19 g, 17,25 mmol) tiputussuppilon avulla, NaNO_2 lisäyksen yhteydessä vapautui (NO_2) typpioksidia, lisäksi alkoi muodostua runsaasti sakkaa, sakan väri on likaisen Beigeä. Huomattiin, että sakan määrä lisääntyi kolvissa NaNO_2 lisäysten yhteydessä. Kun koko natriumnitriitti on lisätty, reaktion lämpötila laskenut 48 °C:seen. sekoitusteho nostettiin 450 rpm. Refluksointi alkaa taas kun reaktionlämpötilaa nousi 110 °C: seen, sakan väri muuttui keltaiseksi. refluksiointi jatkui 2 tuntia. Sen jälkeen reaktio lopetettiin ja annettiin seoksen jäähtyä huoneenlämmössä yön yli. Sakka on edelleen keltaista. Reaktioseos suodatettiin E4-sinterillä. sakka jätettiin kui-

vumaan vetokaapissa yön yli. Sakkaa eli 3-hydroksipyraatsiini-2-karboksylihappoa saatiin 1,91 g. 3-hydroxypyrazine-2-karboksylihappoa uudelleenkiteytettiin liuottamalla 50 ml veteen.

3-hydroxypyrazine-2-karboksylihappoa (1,91 g, 0,01364 mol, 90 %) $^1\text{H-NMR}$ CHNS-O, m.p osoittivat, että tuote oli riittävän puhdasta.

Insinööriyössä valmistettiin 3-hydroksipyraatsiini-2-karboksylihappoa, josta favipiraviria (T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyraatsiinikarboksylihappoa) voidaan valmistaa.

Myöhemmin todettiin, että sen valmistaminen oli turvallisuuden kannalta vaikeaa.

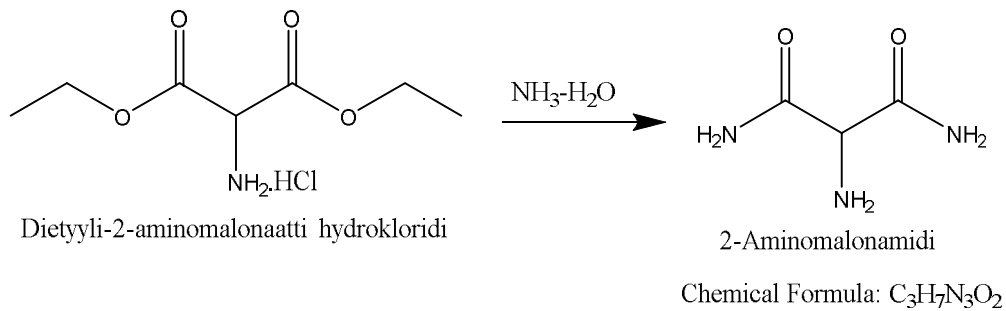


Kuva 10. Kaavio, jonka ilmenee T-705:n synteesi, kun yhdiste syntetisoidaan 5-vaiheisella menetelmällä 3-amino-2-pyridiini-karboxyylihaposta.

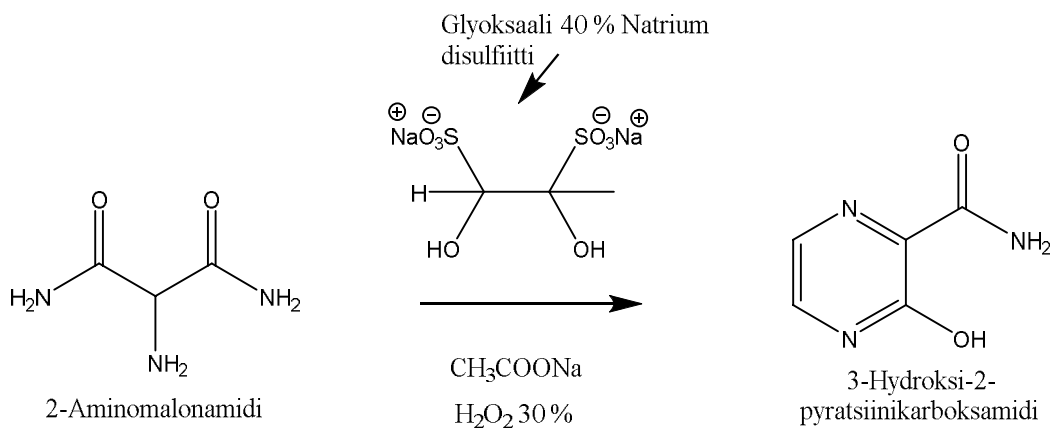
3.2.2 Synteesi, jossa rengasrakenne tehdään glyksaalista ja 2-aminomalondiamidista

Kuvassa 11 on esitetty T-1105:n synteesin, jossa yhdiste syntetisoitu kaksivaiheisella menetelmällä dietyyli-2-aminomalonaattihydrokloridista.

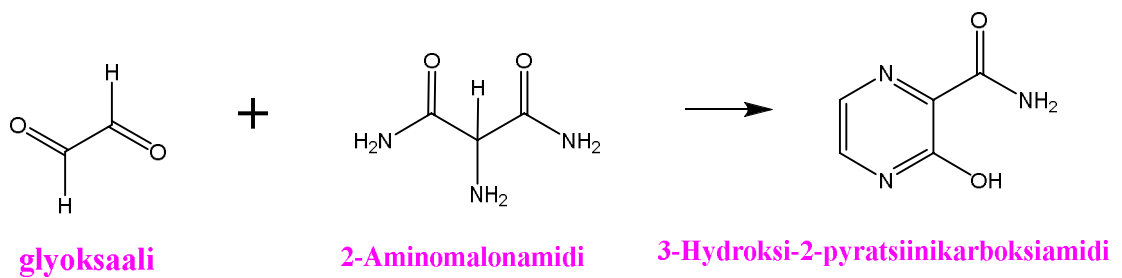
Exp 1



Exp 2



Kuva 11. Kaavio, jonka ilmenee 2-Aminomalondiamidin valmistus



Kuva 12. 3-Hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidin synteesi.

Kuvassa 12 ilmene, 2-Aminomalonamidin valmistus glyoksaalista natrium metabisulfitista.

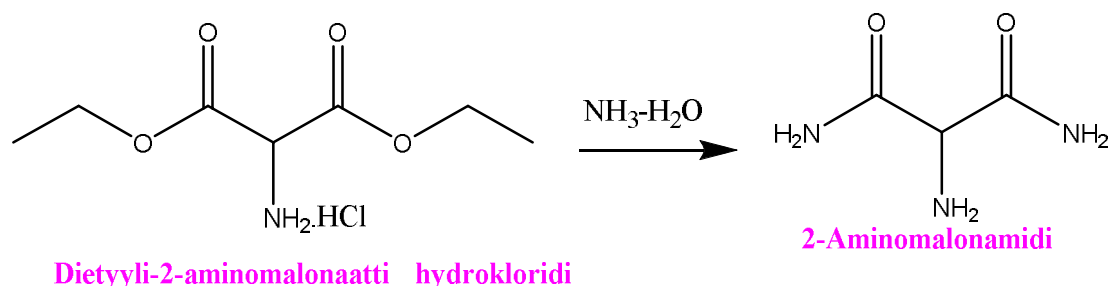
T-1105 (3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi) voidaan syntetisoida glyoksaali natrium metabisulfitista ja 2-aminomalondiamidista [13;14].

Glyoksaali (4,15 ml; 40 % vesiliuosta) ja natrium meta bisulfitia (8,1875 g) liuotettiin 23,75 ml veteen. Seos lämmitettiin 65 °C:een sekoitukseen olleessa 400 rpm tunnin verran. Sakka muodostui ja laskeutuu pohjaan. 2-Aminomalonamidi (4,25 g) lisättiin edelliseen olevan reaktioseokseen, lopuksi reaktioseos lämmitettiin 80 °C:een kolme tuntia, sekoitusteho pysy koko ajan 400 rpm reaktionaikana. Reaktionseokseen lisättiin 20,375 g Natriumasetaattia ja 9,25 ml vetyperoksidia(30 %). Vetyperoksidin tiputus yhteydessä , alettiin jäähdyttää reaktioseosta 50 °C:een. Reaktio seos jäi vetokaapissa yön yli. Reaktioseos suodatettiin E4-sintterilla, sakka (2-hydroxypyrazine-3-carboxamide) annettiin kuivumaan vetokaapissa yön yli.

2-hydroksipyratsiini-3-karboksamidi uudelleenkiteytetty liuottamalla 40 ml veteen

T-1105 (3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi) (2,47805 g, 0,01781 mol, 63,9 %) ¹H-NMR CHNS-O, m.p osoittivat, että tuote oli riittävän puhdasta.

3.2.3 Työssä kehitetty 2-aminomalonamidin uusi helppo synteesi



Kuva 13. 2-Aminomalonamidin valmistus dietyyli-2-aminomalonaattihydrokloridilla

Kuvassa 13 ilmenee, 2-Aminomalonamidin valmistus dietyyli-2-aminomalonaattihydrokloridista.

Dietyyli-2-aminomalonate (25 g) laitetaan kolviin 150 ml:aan 40 % ammoniakkia NH_3 (aq), MG-sekoitus 350 rpm. Aloitetaan aineen lisäys erissä jauhesuppilon avulla, aine liukeni nopeasti väritön liuos. Viiden minuutin aikana on lisätty 60 % aineesta, lisäys jatkuu. Loppuerää huuhdellaan mukaan n.2-3 ml:lla ammoniakkia. Noin 20 minuutin päästä aineen lisäys oli valmis, jolloin liuoksessa on selvästi havaittavissa lievä kullankeltainen sävy. Kaikki on liennut, kirkas liuos.

Kolvi suljetaan muovi hioskorkilla. sekoitus jatketaan edelleen (350 rpm). Väri tuntuu hiljainen voimistuvan. Noin 30 minuuttia aineen lisäystä alkaa muodostua runsaasti valkoista kiteistä sakkaa. Sakka näyttää valkoiselta, mutta ylhäältä päin katsottuna reaktioseos on vaalea sitruunakeltainen, vaniljakastikkeen värinen.

Sekoitus pysäytettiin hetkiksi, jolloin havaitaan valkoisen sakan laskeutuvan pohjaan (erittäin runsas sakka). päällä olevan neste on vaaleankeltainen. Sekoitus jatkui taas. noin 4 tunnin päästä reaktion aloittamisesta, ei uutta havaintoa, Jätetään seosta veto-kaapissa yön yli, myös jätetään magneettisauva pyörimään teholla 350 rpm.

Reaktioseos suodatettiin E4-Sintterilla, sakka otettiin talteen. Tuotteenväri on vaalean keltaista. Suodos haihdutettiin Rotavaporilla ja suodatettiin E4-Sinterillä, jotta saatiin suodoksenfraktio-1. Se otettiin talteen. Suodoksenfraktio-1 värinen on tummankeltaista ja se eroa vähän tuotteesta, jonka on vaaleankeltaista.

2-Aminomalonamidin (11,6292 g, 0,05495 mol, 84,1 %) $^1\text{H-NMR}$ CHNS-O, m.p osoittivat, että tuote oli riittävän puhdasta.

2-Aminomalonamidin kemikaalimominaisuuksia esitetään seuraavasti:

CAS rekisteri No: 62009-47-6

Kemikaali nimi: 2-aminomalonamidi

Molekyylikaava: C₃H₇N₃O₂

Molekyylipaino: 117,107 g/mol

2-aminomalonamidin on tunnettu ja sille on julkaistu synteesejä, mutta nämä eivät ole optimaalisia ja ongelmattomia.

Aikaisemmin tehtyjen menetelmien perusidea pysy samana eli dietyylimalonidiamidi ja ammonia annettiin reagoida keskenään, mutta aikaisemmin siihen käytetty suuria määriä katalyyttejä, esimerkiksi isonitroso malonaattia Hydrauksessa on käytetty palladiumhiiltä ym. Aikaisemmin raportoidussa menetelmässä on käytetty myös etanoliliuottimia. mutta meidän menetelmässä siihen parjattiin ilman etanolia. Myös reaktio tapahtui huoneenlämmössä verrattuna aikaisemmin tehtyyn menetelmään, siihen reaktioihin käytetty eri lämpötiloja, eli meidän menetelmä on taloudellisempi kuin aikaisemmin julkistettuun menetelmään.

3.2.4 Tuotteiden autenttisuuden varmistus ja puhtaudenselvittely NMR-spektrometrialla.

Lääkeaineiden rakenteiden selvittäminen, varmistaminen ja vaikutuksen välisiä tutkittiin NMR:llä, alkuaineenanalyysointilaitteella ja sulamispistelaiteella.

Ala olevassa taulukossa 4 ilmenee, lääkeaineesta mitattiin sulamispisteet.

Taulukko 4. Lääkeaine-ehdokkaiden puhtauden selvittäminen tai varmistaminen sulamispistelaiteella

Lääke-aineen nimi	Mitattu sulamispiste (°C), mp	Kirjallisuus arvo(°C)
2-Aminomalonamide	191-195	193-194 [11]
3-Hydroksi-2-pyratsiinikarboksylihapo	311-313	315 [11]
3-Hydroksi-2- pyratsiinikarboksamidi(T-1105)	263-268	268[11]

Sulamispisteen määrittäminen käytetään orgaanisen yhdisteen puhtauden tarkistamiseen, tuntemattoman yhdisteen tunnistamiseen ja uuden yhdisteen luonnehtimiseen. Jos syntetisoitu yhdiste on tunnettu, voidaan sulamispistettä verrata kirjallisuusarvoon. Puhtaalla kiteisellä aineella on tietty sulamispiste, toisin sanoen se sulaa eli nesteytyy määrättyssä lämpötilassa.

Sulamispisteiden määrittämisen työssä käytettiin Electrothermal melting point apparatusia (GWB-laitetta).

Kuten taulukosta 4 ilmenee, lääkeaineita mitatut sulamispisteet ja kirjallisuusarvot olivat lähellä toisiaan, ja näin ollen tulokset olivat erittäin hyviä. Mitatut sulamispisteet olivat vahvistaneet tuotteen olevan 2-aminomalonamidia.

Lääkeaine-ehdokkaiden puhtauden selvittäminen tai varmistaminen alkuaineidenpitoisuuksien mukaan, alkuaineanalyysillä.

Tuotteen alkuaineiden pitoisuudet lasketaan ensin prosentteina ja sitten verrataan alkuaineanalyysi-tuloksiin.

EA 1110 Alkuaine-analyysilaitteen toiminta perustuu; Kiinteä aine poltetaan 1000 °C asteessa, Helium kantokaasuvirtauksen ollessa 145ml/min.

Hapetus/pelkistysreaktio.

Kaasut seuraavassa muodossa koloniin $N_2; CO_2; H_2O; SO_3/SO_2$. Kaasut lämmönjohtokykydetektoriin (TCD). Lämmönjohtokykydetektori (TCD); Helium hyvä lämmönjohtokyky; palokaasut huonontavat lämmönjohtokykyä; Detektorissa 4 hehkulankaa, lämpötila nousee = sähkövastus kasvaa. Käyrä mittaa sähkövastuksen ja retentioajan pinta-alaa.

Tietokone laskee prosentuaaliset pitoisuudet vertailemalla pitoisuuksia kalibrointi käyriin.

Alla olevassa taulukoissa 5, 6 ja 7 on esitetty, synteesituotteet analysoitiin alkuaineanalyysillä.

2-Aminomalonamide

Taulukko 5. 2-Aminomalonamidi ($C_3H_7N_3O_2$) alkuaineanalyysitulokset (%) ja laskennalliset tulokset (%)

Alkuaine	Analyysitulokset (%)	Laskennalliset tulokset (%)
Typpi (N)	36,69	35,88
Hiili (C)	30,45	30,77
vety(H ₂)	6,03	6,03
Happi(O ₂)	26,84	27,32

Kuten taulukosta 5 nähdään, että 2-aminomalonamidin laskennallisen alkuainepitoisuudet ja alkuaineanalyysitulokset olivat lähellä toisiaan ja näin ollen tulokset olivat erittäin hyviä. Alkuaineanalyysi vahvisti tuotteen olevan 2-aminomalonamidia.

Taulukko 6. 3-Hydroksi-2-pyratsiinikarboksyylihappo ($C_5H_4N_2O_3$) alkuaineanalyysitulokset(%) ja Laskennalliset tulokset (%)

Alkuaine	Analyysitulokset (%)	Laskennalliset tulokset(%)
Typpi (N)	20,09	20,00
Hiili (C)	41,45	42,87
vety(H ₂)	2,61	2,88
Happi(O ₂)	35,85	34,26

Kuten taulukosta 6 nähdään, että 3-Hydroksi-2-pyratsiinikarboksyylihapon laskennallisen alkuainepitoisuudet ja alkuaineanalyysitulokset olivat lähellä toisiaan ja näin ollen tulokset olivat hyviä. Alkuaineanalyysi vahvisti tuotteen olevan 3-Hydroksi-2-pyratsiinikarboksyylihappoa.

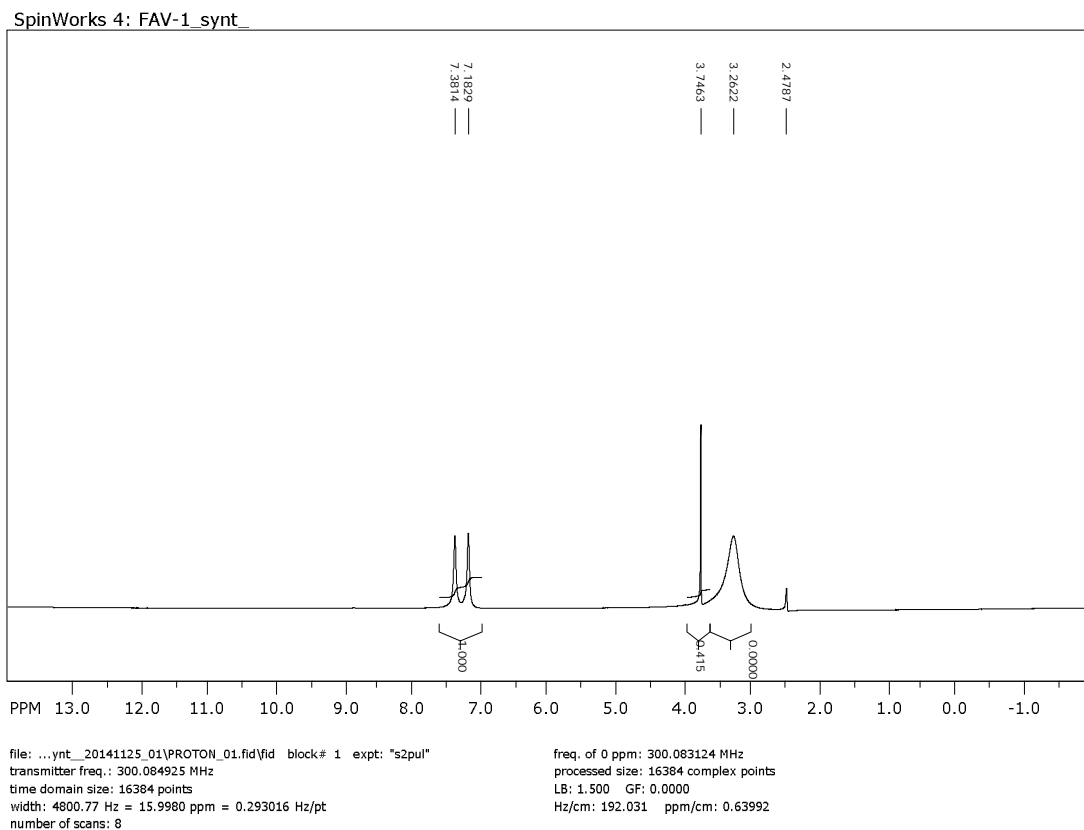
Taulukossa 7 on esitetty alkuaineanalyysi ja sen perusteella 3-Hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidin laskennalliset alkuainepitoisuudet ja alkuaineanalyysitulokset olivat lähellä toisiaan ja näin olleiden tulokset olivat erittäin hyviä. Alkuaineanalyysi vahvisti tuotteen olevan 3-hydroksi-2-pyratsiinkarboksamidi.

Taulukko 7. T-1105; 3-hydroksi-2-pyratsiinkarboksamidi ($C_5H_5N_3O_2$) alkuaineanalyysitulokset (%) ja Laskennalliset tulokset (%)

Alkuaine	Analyysitulokset (massa-%)	Laskennalliset tulokset(%)
Typpi (N)	26,64	26,75
Hiili (C)	38,88	38,52
vety(H ₂)	4,27	4,49
Happi(O ₂)	30,21	30,55

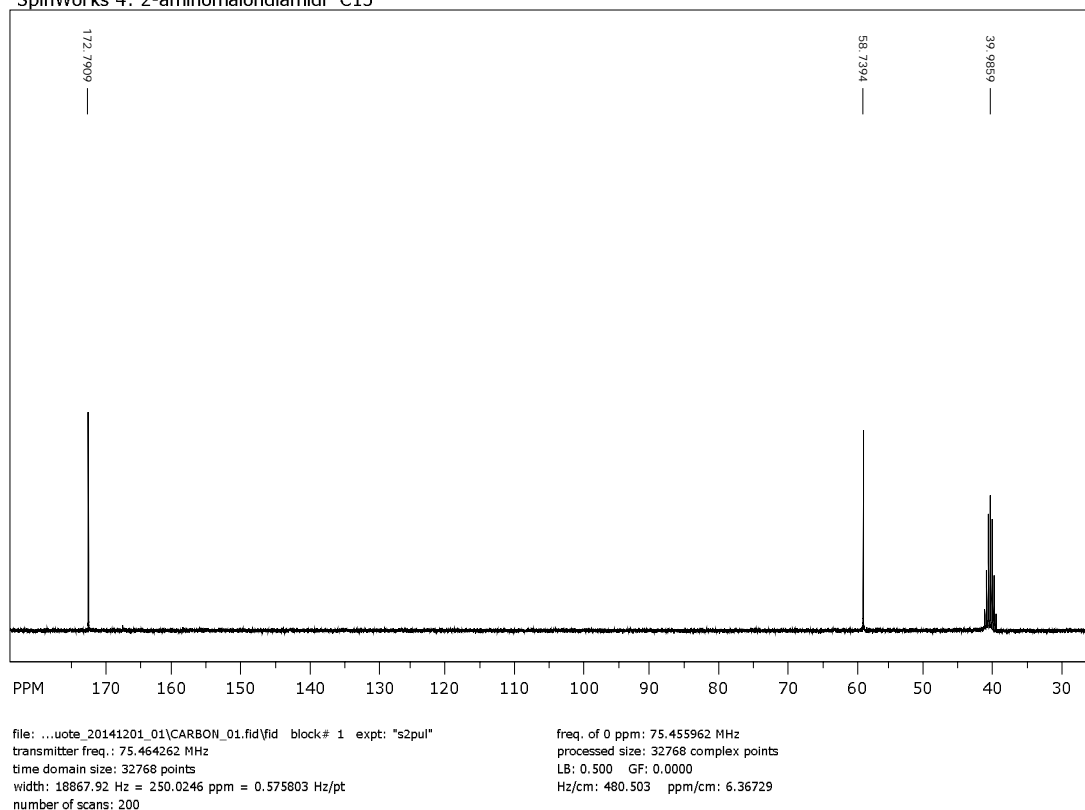
Reaktioiden toimivuutta seurattiin NMR:n avulla, alla olevassa kuvassa on esitetty tuotteet analysoitiin NMR:llä.

2-Aminomalondiamidi ^1H ja ^{13}C -spektrit.



Kuva 14. 2-Aminomalondiamidin ^1H -NMR spektri.
 Kuvassa 14 ilmenee , 2-aminomalondiamidin ^1H -NMR spektri jossa nähdään liuotin (300 MHz, DMSO-d^6) piikkinä δ 2,5 (DMSO-d^6), 3,5 (brs, H_2O), 3,7 (S, 1H) , 7,1-7,5 (S,CONH₂).

SpinWorks 4: 2-aminomalondiamidi C13

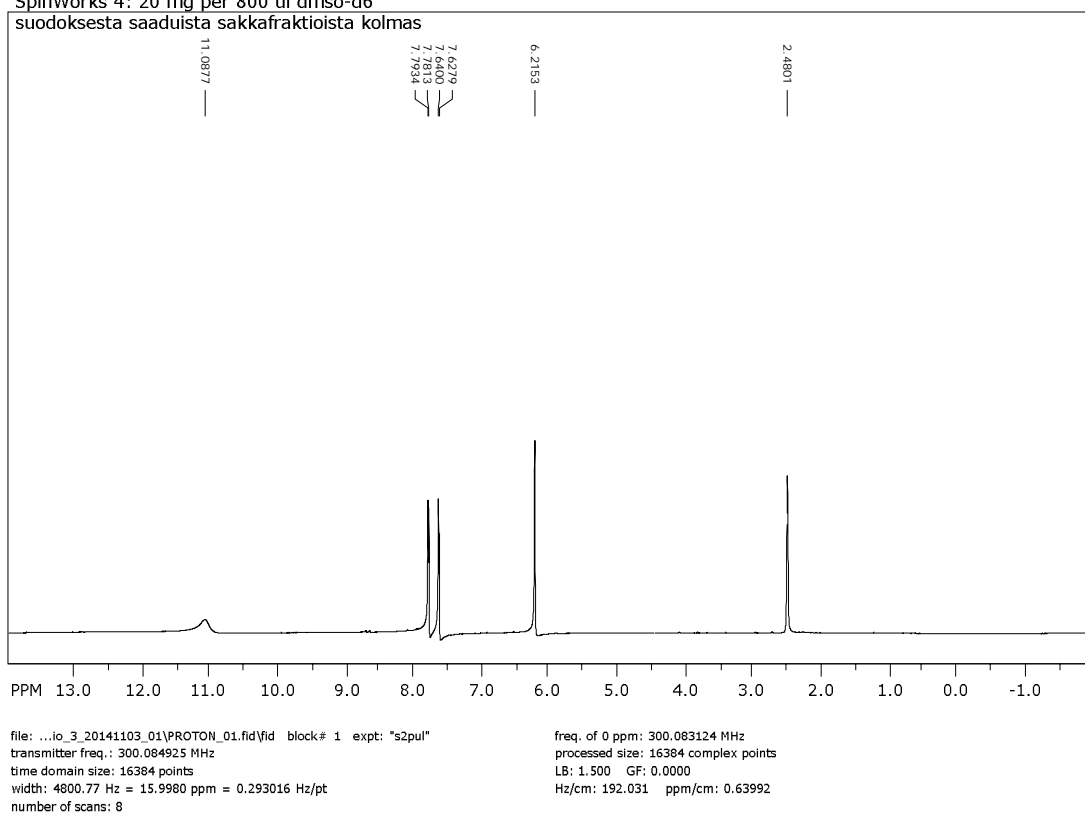


Kuva 15. 2-Aminomalondiamidin ^{13}C – NMR spektri.

Kuvassa 15 ilmenee, 2-aminomalondiamidin ^{13}C -NMR spektri jossa nähdään liuotin DMSO- d_6 piikkinä (75 MHz, DMSO); δ 59.9, 172.7, 172.7.

2-Aminomalondiamidin oli selvästi onnistunut, sillä ^{13}C –NMR spektrissä havaittiin 172,7 ppm:na kaksi ketoryhmiä $\text{C}=\text{O}$ signaalien sekä C-H: signaalin kohdassa 59.9 ppm:na. ^{13}C –NMR spektrissä havaittiin erilaisia hiiliatomeja yhteensä kaksi, kuten pitääkin.

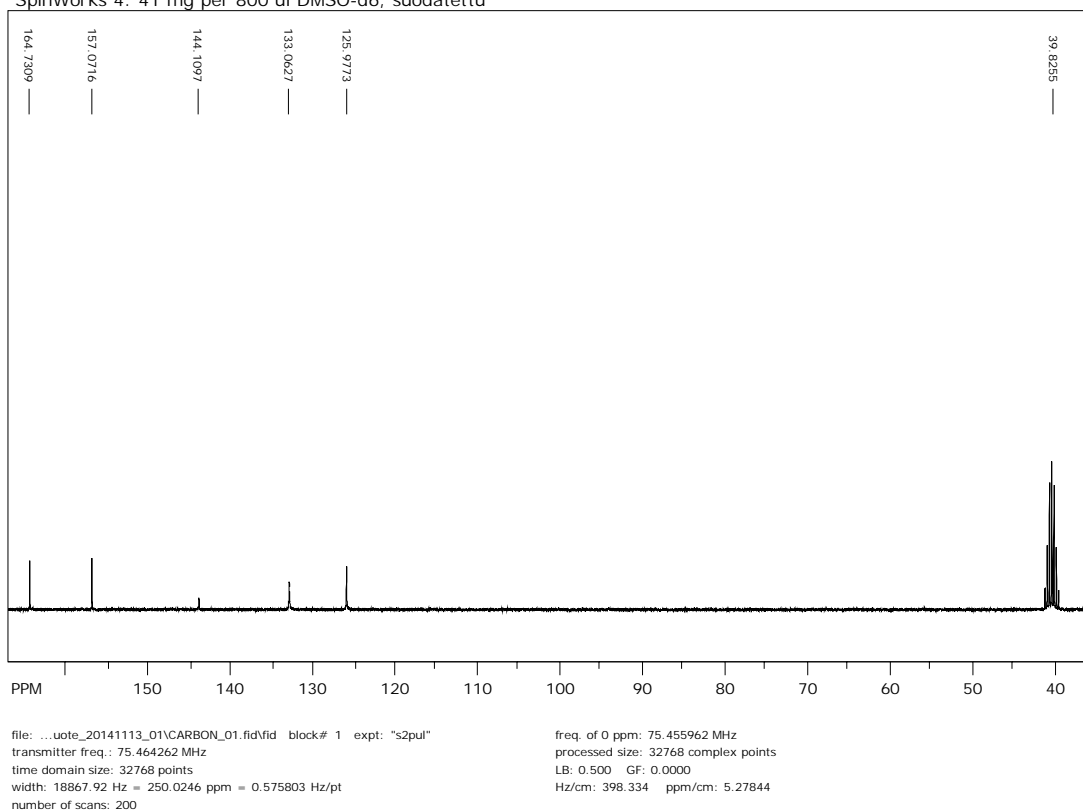
SpinWorks 4: 20 mg per 800 ul dms0-d6
suodoksesta saaduista sakkafraatioista kolmas



Kuva 16. 3-Amino-2-pyratsiinikarboksyylisäaposta ^1H - spektrit

Kuvassa 16 ilmenee, 3-Hydroxy-2-pyratsiinikarboksyylisäaposta ^1H -NMR spektri jossa nähdään liuotin (300 MHz, DMSO-d^6) piikkinä δ 2,5 (DMSO-d^6), 7,63 (d , $J=3,63$ Hz,1H) , 7,85 (d , $J=3,63$ Hz, 1H),6,2 (OH), 11 (OH)

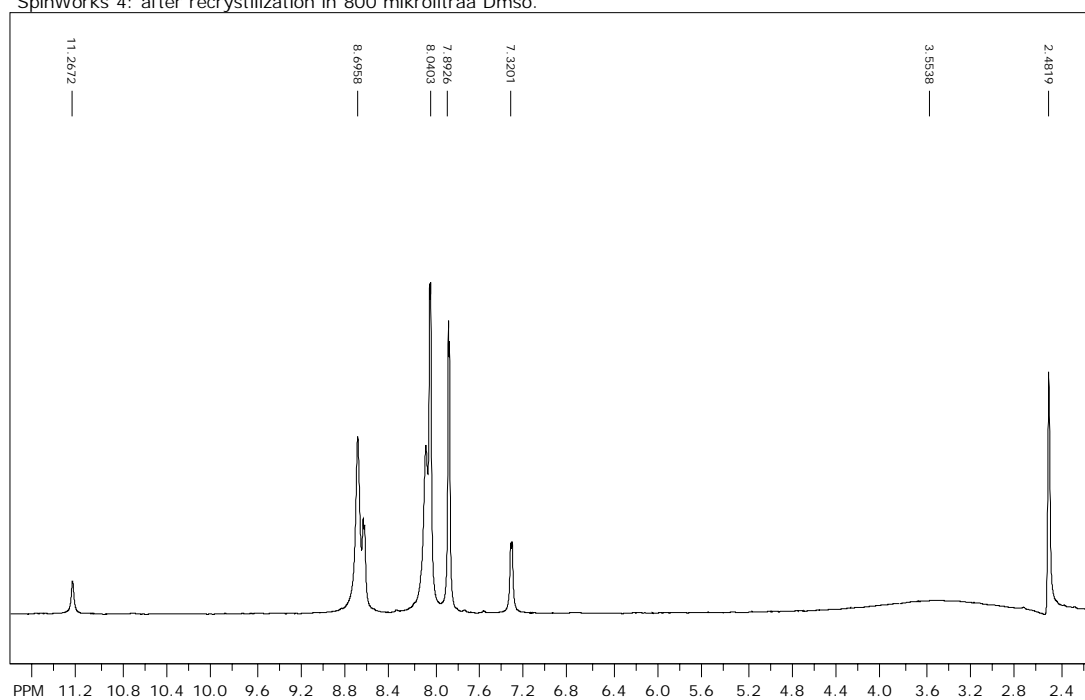
SpinWorks 4: 41 mg per 800 ul DMSO-d6, suodatettu



K 3-Hydroxy-2-pyratsiinikarboksylihapposta ^{13}C -NMR spektri

Kuvassa 17 ilmenee , 3-Hydroxy-2-pyratsiinikarboksylihapposta ^{13}C -NMR spektri jossa nähdään liuotin DMSO-d⁶ piikkinä (75 MHz, DMSO); δ 126,0, 133, 1, 144, 1, 157,1, 164,7.

SpinWorks 4: after recrystallization in 800 mikrolitraa DmsO.



file: ...tion_20150812_01\PROTON_01.fid\fid block# 1 expt: "s2pul"
 transmitter freq.: 300.084925 MHz
 time domain size: 16384 points
 width: 4800.77 Hz = 15.9980 ppm = 0.293016 Hz/pt
 number of scans: 8

freq. of 0 ppm: 300.083124 MHz
 processed size: 16384 complex points
 LB: 1.500 GF: 0.0000
 Hz/cm: 116.804 ppm/cm: 0.38924

3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi ^1H -NMR spektri

Kuvassa 18 ilmenee, 3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi ^1H -NMR spektri jossa nähdään liuotin (300 MHz, DMSO-d_6) piikkinä δ 2,5 (DMSO-d_6), 7,3 H_2O 7,86 (d, $J=2,79$ Hz, 1H), 8,03 (d, $J=2,78$ Hz, 1H), 8,7 CONH_2 , 11,24 OH.

3.3 Johtopäätökset. T-1105:n synteesien vertailu

Työn tavoitteena oli tutkia ja löytää optimaalinen menetelmä, jonka johtaa favipiraviiriin (T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi) synteesin valmistumiseen.

Insinööriytyössä kokeiltiin useilla eri lähtöaineilla, ne jotka johtavat favipiraviiriin ei ollut tarkkaa tietoa varmoista ja toimivista synteesimenemistä. Vain kokeilemalla erilaisia synteesimenetelmiä voitiin todeta, mitkä menetelmistä olivat toimivia ja mitkä eivät.

Insinööriytyössä tutkittiin kahta eri menetelmää, jotka johtivat T-1105 (3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi) valmistumiseen, yksi näistä on käytetty 3-hydroksipyratsiini-2-karboksyylihappoa.

Insinööri työssä on esitetty 3-Hydroksi-2-pyratsiinikarboksyylihaposta favipiraviiriin ja T-1105 synteesien keskeisenä välituotteena 3-Amino-2-pyratsiinikarboksyylihaposta. Sen takia alettiin syntetisoida 3-Hydroksi-2-pyratsiinikarboksyylihappoa ja tehtiin useita eriä. Myöhemmin todettiin että sen valmistaminen vaati paljon kemikaaleja ja oli turvallisuuden kannalta vaikea valmistaa.

Favipiraviiri (T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi) on aiemmin julkaistu synteettinen menetelmä, joka esitetään kuvassa 7, yhdistettävä on syntetisoitu 7-vaiheisella menetelmällä 3-amino-2-pyratsiinikarboksyylihaposta. Menetelmä on kallis, eikä sovellu suuren mittakaavan tuotantoon. Lisäksi saanto on huono.

Sen takia lähdettiin etsimään optimaalisempaa ja turvallisempaa menetelmää, joka johtaa favipiraviiriin verrattuna aikaisemmin julkistettu menetelmä.

T-1105 (3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi) valmistaminen oli kaksivaiheinen prosessi, koska T-1105:n valmistamiseksi piti ensin valmistaa yksi välituotteita.

Insinööriytyössä löydettiin optimaalisempi, turvallisempi ja yksinkertaisempi menetelmä, dieetyyli-2-aminomalonaattihydrokloridista, joka johtaa 3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidin valmistumiseen, myös esitetty kuinka voidaan jälkeä valmistaa favipiraviiriin.

Insinööriytyössä valmistettiin 3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidia(T-1105), joka on favipiraviiriin (T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi) synteesien keskeinen välituote.

Insinööri työn aikana syntetisoitiin viisi kertaa T-1105 dieetyyli-2-aminomalonaattihydrokloridista kaksivaiheisilla synteeseillä sillä menetelmällä, koko ajan yritettiin säätää reaktion olosuhdetta, että ne tulevat optimallisemmaksi. Osa

synteesireaktiosta toimi kuten oli suunniteltu ja osa ei toiminut. T(1105)synteesisarjaan suunnitelluista kolmesta saatiin valmistettua onnistuneesti ja kaksi tuotteet ovat osoittautuneet poikkeajallisesti.

Insinööriyössä esitetty favipiraviirin optimointitapa, kun se syntetisoidaan vain 5-vaiheisessa dietyyli-2-aminomalonaattihydrokloridista verrattuna aikaisemmin julkistettu menetelmä, se on syntetisoitu 7-vaiheiseessa 3-amino-2-pyratsiinikarboksyylilihaposta..

Insinööriyössä löydettiin nopeampi tapa 2-aminomalondiamidi valmistumiseen, jota ei ole julkistettu vielä. Se on tehokkaampi ja taloudellisempi kuin aikaisemmin raportoitu menetelmä.

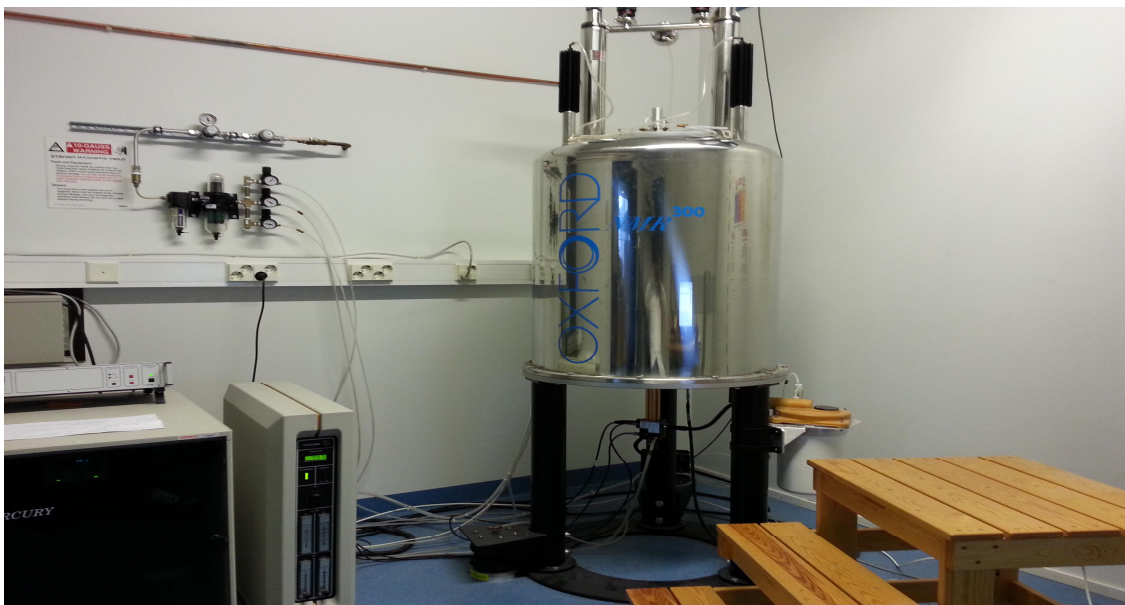
Kuitenkin tutkimustyötä kannata jatkaa, joten saada favipiraviirin (T-705; 6-fluori-3-hydroksi-2-pyratsiinikarboksamidi), koska se on ratkaiseva merkitys ebola sairauksien hoidossa, myös vastaan monenlaisia influenssavirusten, lisäksi se vaikuttaa kaikkein tärkeät viruspatogeeneistä kuten hepatiitti C- virus (HCV), HIV, HSV, CMV ja norovirus.

Kirjallisuusluettelo

- [1] Erik De Clercq, Ebola virus (EBOV) infection: Therapeutic strategies, *Biochemical Pharmacology.*, 93 (2015) 1–10.
- [2] Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. Yousuke Furuta, Brian B. Gowen, Kazumi Takahashi, Kimiyasu Shiraki, Donald F. Smee, Dale L. Barnard.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention. Accessed 27 October 2009. Seasonal influenza: the disease. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. <http://www.cdc.gov/flu/about/disease/index.html>. Luettu 18.04.2015
- [4] <https://www.thl.fi/fi/web/infektiaudit/taudit/mikro-bit/virustaudit/verenvuotokuume/ebola>. Luettu 16.06.2015
- [5] Feldmann H. Ebola – a growing threat? *N Engl J Med* 2014;371:1375–8.
- [6] Lambert, Joseph B; Shurvell, Herbert F; Lighter, David; Cooks, Robert Graham *Organic Structural Spectroscopy* First edition. Prentice Hall, England 1998.
- [7] Claridge, Timothy DW. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Second edition. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier 2009 (1999).
- [8] <http://lucas.lakeheadu.ca/luil/nuclear-magnetic-resonance-nmr-facility/>. Luettu 5.4.2015
- [9] http://cool.conservation-us.org/jaic/articles/jaic33-02-008_4.html. Luettu 4.3.2015
- [10] Erik De Clercq, Dancing with chemical formulae of antivirals: A panoramic view (Part 2), *Biochemical Pharmacology.*, 86 (2013) 1397–1410.
- [11] World Health Organization. Accessed 27 October 2009. Influenza (seasonal). World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/media/Centre/factsheets/fs211/en/>. Luettu 14.06.2015
- [12] Toyama Chemical Co., Ltd., 4-1, Shimookui 2-chome, Toyama 930-8508, Japan. Institute for Antiviral Research and Department of Animal, Dairy and Veterinary Sciences, Utah State University, 5600 Old Main Hill, Logan, UT 84322-5600, USA.
- [13] Botta; De Angelis; Nicoletti; *Journal of Heterocyclic Chemistry*; vol. 16; nb. 1; (1979); p. 193 - 194,.
- [14] Frank L. Muehlmann and Allan R. Day; *Metabolite Analogs. V. Preparation of Some Substituted Pyrazines and Imidazo [b]pyrazines*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78 (1), pp 242–244.

Työssä käytetyt analyttiset instrumentit

NMR-spektrometri

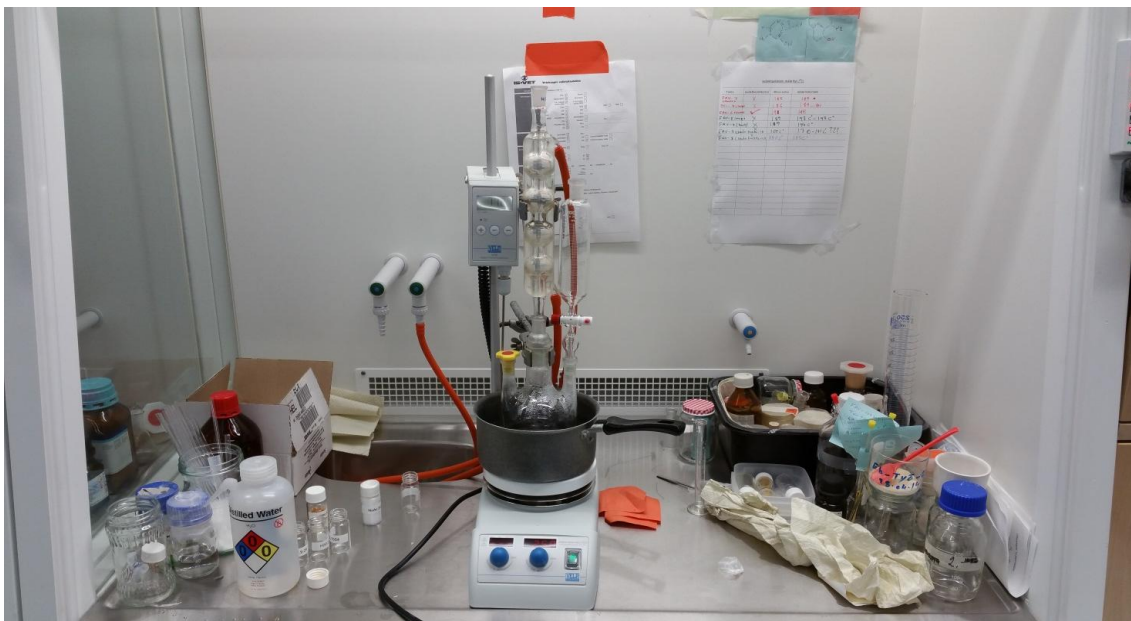


Alkuaineanalysaattori



Työssä käytetyt synteasilaitteisto

Synteesityöskentelyssä käytetty refluksointilaitteisto



Pyöröhaihdutin



Synteesituotteita (T-1105), jonka olen tehnyt yliopiston biokeskuksessa farmaseuttisen biologian osastolla.

