

Nghiên cứu tổng hợp Tenofovir disoproxil fumarate

Nguyễn Văn Tài*, Phan Thị Trang, Nguyễn Thị Hà

Viện Dược liệu

Ngày nhận bài 29.12.2014, ngày chuyển phản biện 6.1.2015, ngày nhận phản biện 26.2.2015, ngày chấp nhận đăng 12.3.2015

Tenofovir disoproxil fumarate (biệt dược Viread®) là thuốc kháng virus tác dụng theo cơ chế ức chế enzyme sao mã ngược - một enzyme quan trọng cho quá trình phát triển của virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) và virus gây viêm gan B. Trong bài báo này, các tác giả trình bày kết quả tổng hợp tenofovir disoproxil fumarate từ adenine qua 5 bước với hiệu suất ở mức khá cao và quy trình đơn giản, có thể áp dụng ở quy mô lớn.

Từ khóa: adenine, HIV, tenofovir disoproxil fumarate, viêm gan B.

Chỉ số phân loại 3.4

STUDY ON SYNTHESIS OF TENOFOVIR DISOPROXIL FUMARATE

Summary

Tenofovir disoproxil fumarate (Viread®) is an antiretroviral agent acting under the inhibition mechanism of reverse transcriptase, an important enzyme for the growth of human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis B virus. In this article, the synthesis of tenofovir disoproxil fumarate from adenine through five steps with a good yield is reported. The synthesis process is simple and applicable on a larger scale.

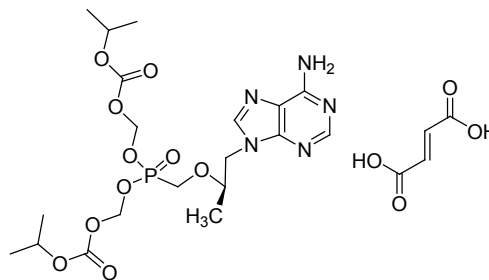
Keywords: adenine, hepatitis B, HIV, tenofovir disoproxil fumarate.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

HIV/AIDS và viêm gan B là hai căn bệnh phổ biến hiện nay. Theo ước tính, toàn thế giới hiện có khoảng 78 triệu người nhiễm HIV và 39 triệu người chết vì các nguyên nhân liên quan đến AIDS. Chỉ riêng năm 2013 đã có khoảng 2,1 triệu người mới bị nhiễm HIV, trong đó có 240.000 người ở độ tuổi dưới 15, và có khoảng 1,5 triệu người chết vì AIDS [1]. Bên cạnh đó, có khoảng 2 tỷ người đã bị nhiễm viêm gan B mạn tính. Hàng năm, có khoảng 1 triệu người chết do bệnh viêm gan B và các biến chứng của nó [2]. Việt Nam là 1 trong 9 quốc gia thuộc vùng tây Thái Bình Dương đang phải đối mặt với đại dịch viêm gan virus vì tỷ lệ nhiễm virus cao.

Tenofovir disoproxil fumarate (tên biệt dược là Viread) là một nucleotid được dùng làm thuốc điều trị HIV/AIDS và viêm gan B mạn tính [3, 4], với liều dùng 300 mg (1 viên/ngày). Tenofovir disoproxil fumarate có công thức cộng là $C_{19}H_{30}N_5O_{10}P.C_4H_4O_4$, tên khoa học là 9-[(R)-2-bis((isopropoxycarbonyl)oxy)-methoxy]phosphinyl]methoxy]propyl]adenin fumarate. Khối lượng phân tử: 635,52 g/mol và công thức cấu tạo như sau:



Hình 1: công thức cấu tạo của tenofovir disoproxil fumarate (TDF)

* Tác giả chính; email: nguyenvantai1111@gmail.com

Hiện nay, trên thế giới có một số phương pháp tổng hợp TDF, tuy nhiên qua nghiên cứu tìm hiểu, chúng tôi nhận thấy quy trình hiệu suất chưa cao, do đó cần cải tiến một số giai đoạn phản ứng để nâng cao được hiệu suất, phù hợp với điều kiện Việt Nam [5, 6]. Mặt khác, hiện trong nước chưa có công trình nghiên cứu nào về hoạt chất này. Với phổ điều trị rất rộng cho cả bệnh nhân viêm gan B và HIV/AIDS nên nhu cầu sử dụng TDF ở trong nước là rất lớn, vì vậy, các tác giả đã bước đầu nghiên cứu tổng hợp TDF ở quy mô phòng thí nghiệm với 5 bước đơn giản có thể áp dụng ở quy mô lớn.

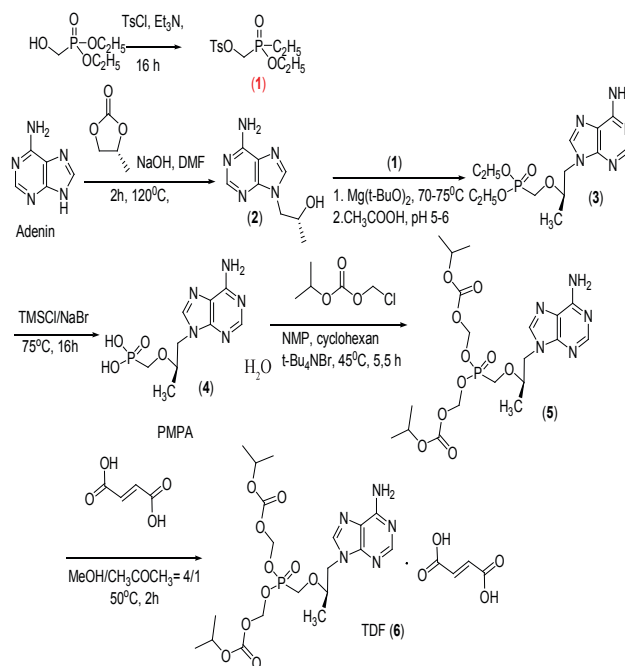
Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất và dụng cụ

Hóa chất được cung cấp bởi các hãng Merck, Fisher, AK Scientific hoặc Trung Quốc và được sử dụng trực tiếp mà không cần tinh chế thêm. Sắc ký lớp mỏng được tiến hành trên bản mỏng silicagel GF₂₅₄ (Merck, 40-63 μ m). Điểm nóng chảy được đo trên máy Stuart SMP 3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR và ¹³C-NMR được đo trên máy Bruker AV500. Phổ hồng ngoại IR được đo trên máy quang phổ hồng ngoại Impact 410 Nicolet. Phổ khối lượng ESI-MS được đo trên máy Agilent 6310 Ion Trap. Phổ HR-MS được đo trên máy AutoSpec Premier USA. Sắc ký lỏng cao áp HPLC được đo trên máy Shimadzu 20A.

Phương pháp nghiên cứu

TDF được nhóm nghiên cứu tổng hợp như mô tả trên hình 2, gồm 5 bước: bước 1 thực hiện phản ứng thế nucleophin giữa adenin và R-propylen carbonat ở môi trường kiềm, thu được sản phẩm (2). Bước 2 thực hiện phản ứng ete hóa sản phẩm (2) với diethyl[(tosyloxy)-methyl]phosphonat (1) sử dụng xúc tác bazơ là magnesium di-tert-butoxide (Mg(t-BuO)₂) trong dung môi là N-methyl-2-pyrrolidon (NMP), thu được sản phẩm (3). Bước 3 là thủy phân 2 nhóm ethyl bằng cách sử dụng NaBr/TMSCl (trimethylsilyl clorid), thu được sản phẩm acid (R)-((adenin-9-yl)propan-2-oxy)methyl]phosphonic (4). Bước 4 là alkyl hóa sản phẩm (4) vừa tạo thành với cloromethyl isopropyl carbonat, thu được sản phẩm tenofovir disoproxil (5). Bước 5 là acid hóa tenofovir disoproxil (5) với acid fumaric, thu được sản phẩm cuối cùng là TDF (6).



Hình 2: sơ đồ tổng hợp TDF

Thực nghiệm

Tổng hợp hydroxypropyl adenin (2)

Hoà tan hỗn hợp adenin (1,00 g; 7,4 mmol; 1 equiv.) và NaOH (0,35 g; 8,75 mmol; 1,2 equiv.) trong DMF và khuấy trong 10 phút ở 25-30°C. Sau đó, thêm R-propylen carbonat (1,1 ml; 8,88 mmol; 1,2 equiv.) trong thời gian từ 10-15 phút ở nhiệt độ này, hỗn hợp được đun nóng tới 120°C trong 2 h. Phản ứng được đưa về 70°C, thêm hỗn hợp MeOH và 2-propanol trong 15-20 phút. Phản ứng được đưa về 15°C trong vòng 1 h. Chất rắn được lọc và rửa bằng hỗn hợp MeOH và 2-propanol lạnh rồi đem sấy chân không ở 40°C, thu được 0,99 g hydroxypropyladenin (2) dạng tinh thể màu trắng. Hiệu suất đạt được là 70%.

T_{nc}: 190-193°C (lit. 190-195°C) [7]

IR (KBr, ν cm⁻¹): ν = 3416 (-OH), 3324 (-NH₂), 3191 (=CH); 2973 (-CH₃), 1654 (C=N), 1606, 1576 (C=C), 1088 (C-OH)

HRMS: [M+H]⁺ = 192

¹H-NMR (500 MHz, MeOD, δ ppm): 8,21 (1H, s, H-2); 8,11 (1H, s, H-8); 4,3 (1H, dd, J = 3; 13,5 Hz, H-2'); 4,14 (2H, m, H-1'); 1,22 (1H, d, J = 6 Hz, H-3'). ¹³C-NMR (125 MHz, MeOD, δ ppm): 157,3 (C-6); 153,6 (C-2); 150,9 (C-5); 143,5 (C-8); 119,9 (C-4); 66,8 (C-2'); 51,8 (C-1'); 20,8 (C-3').

Tổng hợp acid (R)-[(adenin-9-yl)propan-2-oxy] methyl phosphonic (4)

Cho hydroxypropyl adenin (1,00 g; 5,23 mmol; 1equiv.) vào hỗn hợp chứa NMP và $\text{Mg}(\text{t-BuO})_2$ (0,37 g; 15,69 mmol; 3 equiv.) ở 25-30°C, sau đó đun tới 70°C. Thêm diethyl[(tosyloxy)methyl]phosphonat (**1**, 2,5 g; 7,84 mmol; 1,5 equiv.) và khuấy hỗn hợp ở 70-75°C trong vòng 10-15 phút. Hỗn hợp được làm lạnh về 15-20°C, sau đó điều chỉnh pH = 6-7 bằng acid axetic, thêm ethyl acetate vào và khuấy ở 50-60°C, sau đó làm lạnh và lọc muối, rửa bằng ethyl acetate. Dung dịch sau phản ứng được chuyển sang 1 bình cầu và thêm NaBr (1,88 g; 18,3 mmol; 3,5 equiv.), hỗn hợp được làm lạnh ở 0-5°C. Thêm vào trimethylsilyl clorid (2,9 g; 26,8 mmol; 5,3 equiv) trong vòng 10 phút, hỗn hợp phản ứng được đun nóng 75°C trong 16 h. Sau đó được làm lạnh ở 20-25°C, pha loãng bằng nước và chiết 2 lần với ethyl acetate, đưa hỗn hợp phản ứng về pH 2,8-3,2 bằng cách sử dụng dung dịch NaOH 40%. Hỗn hợp được khuấy ở 58°C trong 2 h. Chất rắn được lọc và rửa bằng nước cất ở 5°C, sấy chân không ở 65°C thu được 0,59 g tenofovir (**4**). Hiệu suất đạt được là 39,7%.

T_{nc} : 275-278°C (lit. 277-279°C) [7]

IR (KBr, cm^{-1}), ν = 3407 (-OH); 3224 (-NH₂), 3204 (=CH); 2928 (-CH₃), 1699 (P=O), 1609, 1484 (C=C)

ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 288$, $[\text{M}] = 287$

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ ppm): 8,36 (2H, d, J = 2 Hz, H-8, 2), 4,46 (1H, dd; J = 3,5, 14,7 Hz, H-4'), 4,28 (1H, dd, J = 7; 15 Hz, H-4'); 3,96 (1H, m, H-2'); 3,65 (1H, q; J = 9,5; 13,2 Hz, H-1'); 1,15 (3H, d; J = 6,5 Hz, H-3').

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, δ ppm): 149,6 (C-6); 148,2 (C-5); 145,1 (C-2); 144,1 (C-8); 117,2 (C-4); 75,4 (dd, J=11,75 Hz, C-4'); 63,57 (C-2'); 47,7 (C-1'); 15,5 (C-3').

Tổng hợp tenofovir disoproxil (TD) (5)

Tenofovir (**4**, 1,00 g; 3,4 mmol; 1 equiv.) được cho vào 1 bình cầu đáy tròn. Lần lượt thêm vào 10 ml NMP và 5 ml cyclohexan. Tiếp tục thêm Et₃N (3 ml, 13,6 mmol; 4 equiv.) và *n*-Bu₄NBr (1,18 g; 3,4 mol; 1 equiv.) ở 45°C, chloromethyl isopropyl carbonat (2,64 g; 17 mmol; 5,0 equiv.) được thêm vào và tiếp tục khuấy trong 5,5 h, làm lạnh hỗn hợp về 25-30°C. Hỗn hợp được chiết với ethyl acetate cho đến môi trường trung tính. Pha hữu cơ được làm khan bằng Na₂SO₄ và cất loại dung môi dưới áp suất giảm, thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tiến hành tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột với hệ dung môi *n*-hexan/axeton tăng dần độ phân cực, thu được 0,97 g sản phẩm tinh khiết ở dạng dầu (chất **5**). Hiệu suất đạt

được là 54%.

IR (KBr, v cm^{-1}): 3320 (-NH₂); 2993 (-CH₃); 1756 (C=O); 1611 (C=N); 1476 (C=C); 1105 (C-O-C).

ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 520$, $[\text{M}] = 519$

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8,33 (1H, s, H-2); 7,98 (1H, s, H-8); 6,14 (2H, s, NH₂); 5,66 (3H, m, H-9', 5'); 5,59 (1H, dd, J = 5,5; 12,2 Hz, H-5'); 4,92 (2H, m, H-6', 10'); 4,36 (1H, dd, J = 3; 14,5 Hz, H-4'); 4,15 (1H, dd; J = 7,5; 14,5 Hz, H-4'); 3,94 (2H, m, H-1'); 3,71 (1H, q, J = 9; 14 Hz, H-2'); 1,31 (12 H, d, J = 2,5 Hz, H-8', 7', 11', 12'), 1,23 (3 H, d, J = 6,5 Hz, H-3')

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ ppm): 155,4 (C-5); 153,1 (C-6'); 153,0 (C-10'); 152,5 (C-8); 149,9 (C-4); 141,9 (C-2); 118,9 (C-6); 84,3 (dd, J = 6,1 Hz, C-4') ; 73,5 (C-5', 9'); 63,7 (C-7'); 62,3 (C-11'); 59,0 (C-2'); 48,1 (C-1'); 21,6 (C-8', 7', 12', 13'); 16,3 (C-3').

Tổng hợp TDF (6)

Tenofovir disoproxil (**5**, 1,00 g; 1,92 mmol; 1 equiv.) được hòa tan trong 7,5 ml aceton ở nhiệt độ phòng, làm lạnh hỗn hợp xuống 0-5°C. Sau đó, nhỏ từ từ hỗn hợp acid fumaric (0,29 g; 2,5 mmol; 1,3 equiv.) đã được hòa tan trong 1,8 ml MeOH, khuấy ở 50°C trong 2 h, kết thúc phản ứng, làm lạnh về 5°C để sản phẩm kết tinh. Lọc bỏ phần chất rắn acid fumaric còn dư. Cô cạn dung môi dưới áp suất giảm thu được sản phẩm TDF thô (**6**). Tinh chế sản phẩm thô thu được bằng cách chiết với ethyl acetate, làm khan bằng Na₂SO₄ thu được 1,1 g TDF (**6**) màu trắng, tinh khiết 99% (tính theo diện tích pic trên HPLC). Hiệu suất đạt được là 69,3%.

T_{nc} : 115-117°C (lit. 117-119°C) [7]

IR (KBr, v cm^{-1}): 3236 (-NH₂); 2989 (-CH₃); 1760 (C=O este); 1675 (C=O acid); 1619 (C=N); 1505, 1426 (C=C)

ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 520$, $[\text{M}] = 519$

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 8,11 (1H, s, H-2); 8,02 (1H, s, H-8); 7,16 (2H, s, NH₂); 6,61 (2H, s, H-1', 2'); 5,54 (4H, m, H-9', 5'); 4,82 (2 H, m, H-6', 10'); 4,24 (1H, dd, J = 4; 14,5 Hz, H-4'); 4,15 (1H, dd; J = 6; 14,5 Hz, H-4'); 3,96 (3H, m, H-1', 2'); 1,24 (6 H, d, J = 2,5 Hz, H-8', 7'); 1,23 (6 H, J = 2 Hz, H-11', 12'); 1,1 (3H; d; J = 6 Hz, H-3')

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 165,9 (C=O acid); 155,9 (C-5); 152,5 (C-6'); 152,3 (C-10'); 149,7 (C-4); 141,2 (C-2); 133,9 (C-1', 2'); 118,3 (C-6); 84,2 (dd, J = 6,1 Hz, C-4'); 75,9 (C-5'); 75,8 (C-9'); 72,8 (C-7'); 62,7 (C-11'); 61,4 (C-2'); 46,5 (C-1'); 21,2 (C-8', 7', 12', 13'); 16,6 (C-3').

Kết quả và bàn luận

Theo quy trình trên, việc tổng hợp TDF [8, 9] được tiến hành với nguyên liệu đầu có giá thành hạ là adenin. Bước 1 là thực hiện phản ứng thế nucleophin với R-propylen carbonat, dung môi dimethylformamid (DMF), sử dụng xúc tác NaOH rắn, thực hiện ở 120°C, trong thời gian 1 h, thu được hydroxypropyl adenin (2). Quá trình sử dụng NaOH để thủy phân R-propylen carbonat để tạo thành một carboncation, một phân khí CO₂ được sinh ra trong phản ứng.

Việc tổng hợp acid (R)-[(adenin-9-yl)-propan-2-oxymethyl]phosphonic (4, tenofovir) được thực hiện qua hai bước 2 và 3, trong đó bước 2 là tổng hợp chất trung gian diethyl phosphonat (3), sau đó bước 3 là thủy phân chất (3) tạo (4). Ở bước 2 là phản ứng gắn diethyl[(tosyloxy)methyl]phosphonat (1) với hydroxypropyl adenin (2) bằng cách sử dụng xúc tác kiềm mạnh là Mg(t-BuO)₂ [4]. Ở đây, t-BuO⁻ được sinh ra trong quá trình phản ứng sẽ lấy hydro của nhóm hydroxy để tạo thành cacbanion trước khi phản ứng với diethyl[(tosyloxy)methyl]phosphonat (1) để tạo ra hợp chất trung gian (3) trong dung môi là NMP. Việc sử dụng CH₃COOH để đưa phản ứng về môi trường pH trung tính thuận lợi cho giai đoạn sau thủy phân liên kết este. Chất trung gian (3) được sử dụng tiếp ngay cho bước 3 là bước thủy phân este sử dụng xúc tác là trimethylsilyl clorid (4 equiv.)/NaBr (4 equiv.) trong dung môi NMP [4], việc sử dụng TMSCl để tạo ra hợp chất trung gian bằng việc thay thế hai nhóm ethyl bằng hai nhóm trimethylsilyl. Việc sử dụng NaBr nhằm tăng tốc độ phản ứng thế nucleophin xảy ra nhanh hơn trong dung môi NMP.

Bước 4 là phản ứng alkyl hóa hay thực chất là phản ứng ete hóa giữa chloromethyl isopropylcarbonat vào hai nhóm -OH của tenofovir, phản ứng thế được xảy ra dễ dàng trong dung môi NMP [10], đặc biệt khi sử dụng với dung môi này chất đầu tenofovir được hòa tan hoàn toàn, khí HCl sinh ra trong phản ứng được trung hòa bằng xúc tác bazơ là Et₃N, sử dụng n-Bu₄NBr xúc tác làm tăng tốc độ phản ứng thế S_N2 trong hỗn hợp phản ứng đồng pha.

Bước cuối cùng (bước 5) của quy trình tổng hợp TDF là phản ứng tạo muối giữa tenofovir disoproxil với acid fumaric. Quá trình tạo muối được thực hiện trong hỗn hợp dung môi là CH₃COCH₃/MeOH [9], ở 50°C trong thời gian là 2 h, việc thực hiện trong hệ dung môi CH₃COCH₃/MeOH để có thể hòa tan hoàn toàn được chất đầu tenofovir disoproxil, đồng thời cũng có thể hòa tan hoàn toàn được acid fumaric trong quá trình phản ứng, làm cho phản ứng xảy ra dễ dàng hơn. Kết thúc phản ứng, lọc bỏ phần acid fumaric còn dư, chiết sản phẩm thu được với ethyl acetate nhằm loại bỏ các tạp chất trong sản phẩm, cô cạn dung môi dưới áp suất giảm thu được sản phẩm TDF có độ tinh khiết trên 99% (tính

theo diện tích pic HPLC).

Như vậy, bằng cách sử dụng NaOH rắn cho bước 1, chúng tôi đã tăng được hiệu suất của bước này lên 70%, đồng thời giảm được tạp chất sinh ra trong quá trình phản ứng. Ở bước 5, việc sử dụng hệ dung môi MeOH/CH₃COCH₃ đã tăng hiệu suất của phản ứng, đồng thời sử dụng phương pháp chiết lỏng với ethyl acetate (hầu hết trong các tài liệu, các tác giả đã tinh chế bằng cách kết tinh hoặc chạy sắc ký cột), chúng tôi đã thu được sản phẩm có độ tinh khiết khá cao, không cần phải tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột và phương pháp kết tinh lại, điều này sẽ có ý nghĩa rất lớn khi thực hiện sản xuất ở quy mô lớn tại Việt Nam.

Kết luận

Nhóm tác giả đã thực hiện tổng hợp thành công tenofovir disoproxil fumarate bằng việc đi từ nguyên liệu đầu là adenin, qua 5 bước với hiệu suất của toàn quy trình tổng hợp đạt 10,4%. Quy trình tổng hợp khá đơn giản, hạn chế sử dụng các dung môi độc hại, có thể áp dụng ở quy mô lớn, phù hợp với điều kiện ở Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

- [1] UNAIDS Fact Sheet (2014), <http://www.amfar.org/worldwide-aids-stats>.
- [2] Hepatitis B foundation cause for a cure (2014), <http://www.hepb.org/hepb/statistics.htm>.
- [3] Dale O Kiesewettera, Kathleen Knudsona, Matt Collinsb, Sharat Srinivasulac, Esther Limd and Michele Di Mascioe (2008), "Enantiomeric radiochemical synthesis of R and S-[1-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3-fluoropropan-2-yloxy] methylphosphonic acid", *J Labelled Comp Radiopharm*, **51**(4), pp.187-194.
- [4] Michal Cesnek, Antonin Holy, Milena Masojdjkova, Eva Kmonickova and Zdenek Zidek (2008), "Synthesis of guanidino analogues of PMPDAP and their immuno biological activity", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, pp.965-980.
- [5] Arlen L Jeffery, Jae-Hun Kim and David F Wiemer (2000), "Synthesis of Acyclic Nucleoside and Nucleotide Analogues from Amino Acids: A Convenient Approach to a PMEA -PMPA Hybrid", *Tetrahedron*, **56**(29), pp.5077-5083.
- [6] Holý A, Dvoráková H and Masojdjková M (1995), "Synthesis of enantiomeric N-(2-phosphonomethoxypropyl) derivatives of heterocyclic bases", *Collect. Czech. Chem. Commun*, **60**, pp.1390-1409.
- [7] Jiandong Yuan, Suzhou C.N (2010), "Nucleotide analogue prodrug and the preparation thereof", *US 2010/0216822A1*.
- [8] Lisa M Schultze, Harlan H Chapman, Nathan J.P Dubree (1998), "Practical Synthesis of the anti-HIV Drug, PMPA", *Tetrahedron Letters*, **39**(14), pp.1853-1856.
- [9] Stephen R Houghton, Jack Melton, Joseph Fortunak, David H Brown Ripin, Christopher N Boddy (2010), "Rapid, mild method for phosphonate diester hydrolysis: development of a one-pot synthesis of tenofovir disoproxil fumarate from tenofovir diethyl ester", *Tetrahedron*, **66**(41), pp.8137-8144.
- [10] Dana Hocková, Antonin Holý, Milena Masojdjková, Dianne T Keough, John de Jersey, Luke W Guddat (2009), "Synthesis of branched 9-[2-(2-phosphonoethoxy) - ethyl]purines as a new class of acyclic nucleoside phosphonates which inhibit Plasmodium falciparum hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**(17), pp.6218-6232.