

Tamiflu: Das Versorgungsproblem

Vittorio Farina* und Jack D. Brown*

Stichwörter:

Chinasäure · Inhibitoren · Shikimisäure ·

Synthesemethoden · Virostatika

Die Grippepandemie von 1918 (die Spanische Grippe) tötete weltweit schätzungsweise zwischen 20 und 40 Millionen Menschen^[1] und damit mehr als der vorangegangene Weltkrieg. Die Epidemien von 1957 (Asien) und 1968 (Hongkong) waren zwar weniger verheerend, wiesen aber einige grund-sätzliche Gemeinsamkeiten mit der Spanischen Grippe auf: Auslöser waren von Vögeln stammende rekombinante Viren als Ergebnis eines Genaustauschs (Reassortment) zwischen bekannten menschlichen Viren und/oder Vogelviren. Das erneute Auftreten dieser Ausbrüche lässt keinen Zweifel an dem zu-künftigen Auftreten neuer Influenzastämme, gegen die der Mensch keine Immunität besitzt. Eine Grippepande-mie wird irgendwann erneut auftreten – die entscheidenden Fragen sind, wann sie auftritt und wie wir sie bewältigen.

Die Vogel-H5N1-Influenza, die erstmals 1997 in Hongkong bei Geflügel entdeckt wurde, hat bereits eine Vielzahl von Menschen infiziert und hat eine Sterblichkeitsrate von über 50% zur Folge. Das isolierte Virus stammt aus-schließlich von Vögeln, ist somit kein Reassortant und verbreitet sich nicht von Mensch zu Mensch – allerdings

wächst die Befürchtung, dass eine mutierte Form dieses Virus zu einer neuen Pandemie führen könnte. Weniger wahrgenommen wird vielleicht die Tat-sache, dass trotz ausgedehnter Schutz-impfungen jährlich 20000–40000 Ame-rikaner der Influenza zum Opfer fallen. Die aus Influenza-Erkrankungen re-sultierenden Gesundheitsausgaben und Produktivitätsausfälle kosten die US-Wirtschaft pro Jahr etwa 12 Milliarden Dollar.^[2]

Es wird eine ausgedehnte politische Diskussion darüber geführt, ob wir dar-auf vorbereitet sind, einer möglichen Pandemie in der Art von 1918 zu be-gegnen.^[3] In den letzten hundert Jahren wurden einige Fortschritte beim Kampf gegen die Influenza erzielt, und es wird allgemein angenommen, dass unter der Voraussetzung ausreichender finanzieller Mittel gegenwärtig geeignete Waffen zur Verfü-gung stehen, um den nächsten Grippeausbruch zu bekämpfen oder zumindest seine Auswirkungen zu mil-dern.

Die Viren der Influenza A, B und C sind RNA-Viren. Das Typ-A-Virus wird nach Unterarten klassifiziert, die auf der Struktur der beiden Oberflächenproteine Haemagglutinin (H) und Neurami-nidase (NA) basieren. Das Influenza-A-Virus enthält zusätzlich noch das M2-Protein, einen Protonenkanal, der in Typ-B- und Typ-C-Viren nicht vor-kommt.^[4]

Üblicherweise sind Impfungen eine wirksame Methode zur Bekämpfung von Grippeepidemien. Allerdings be-trägt die Schutzwirkung dieser Impf-stoffe bei gesunden Personen unter 65 Jahren nur 70–90% und ist noch gerin-ger bei älteren Patienten.^[5] Zudem er-fordert die durch die fehleranfällige RNA-Replikation verursachte Anti-gendrift eine ständige Weiterentwick-

lung der Impfstoffe. Zwar bleibt die Schutzimpfung weiterhin eine wichtige Methode zur Vermeidung einer Grippe, niedermolekulare antivirale Wirkstoffe bieten mittlerweile allerdings eine neu-artige Möglichkeit zur wirksamen Grippevorbeugung und -therapie.

Inhibitoren der M2-Protonenpumpe sind bereits seit Jahrzehnten bekannt, eine breite Anwendung der beiden auf dem Markt befindlichen, klinisch wirk-samen Inhibitoren Amantadin und Rimantadin wurde jedoch durch das Auftreten von Arzneistoffresistenzen und toxischen Nebenwirkungen verhin-dert. Eine beträchtliche Einschränkung ist zudem ihre ausschließliche An-wendbarkeit gegen Influenza A.^[6] Da-gegen ist die Neuraminidase bei allen drei Gruppen ein unverzichtbares En-zym für die virale Replikation. Die NA katalysiert die Abspaltung von Sialin-säureresten aus Glycoproteinen, setzt das knospende Virion aus der infizierten Zelle frei und verhindert, dass es in in-fizierten Zellen oder in Atmungssekret-en eingeschlossen wird oder sich zu-sammenlagert. Das Enzym ist ein aus identischen Untereinheiten aufgebau tes Tetramer, dessen Struktur wie auch die Struktur seines Komplexes mit Sialin-säure röntgenkristallographisch aufge-klärt wurden.^[7] Die Tatsache, dass das aktive Zentrum in allen Virenstämmen der Influenza A und B hoch konserviert ist, macht NA zu einem naheliegenden Ziel für die Entwicklung von Breit-bandmittel gegen Grippe. Strukturdaten ermöglichen das rationale Design wirksamer Inhibitoren.^[2] Zwei dieser Inhibitoren wurden auf dem Markt eingeführt: Zanamivir (Relenza von GSK (1)) im Juli 1999 und Oseltamivir-phosphat (Tamiflu von Gilead (2), ebenfalls vertrieben durch Roche) im Oktober 1999.

[*] Dr. V. Farina

Department of Chemical Development
Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals
900 Ridgebury Rd
Ridgefield CT 06877 (USA)

Fax: (+1) 203-791-6130

E-Mail:

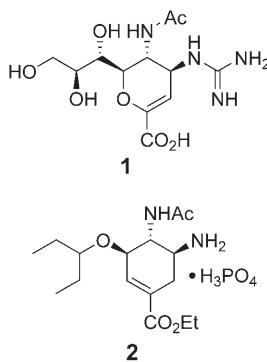
farinav@rdg.boehringer-ingelheim.com

Dr. J. D. Brown

Department of Development
Boehringer Ingelheim Chemicals
2820 North Normandy Drive
Petersburg VA 23805–9372 (USA)

Fax: (+1) 804-698-7214

E-Mail: jbrown@bichem.com

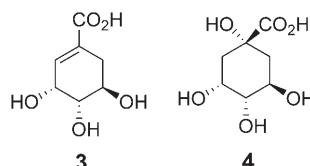


Zanamivir weist eine geringe Bioverfügbarkeit auf und wird durch Inhalation verabreicht, wodurch Probleme bei Patienten mit Atemwegserkrankungen hervorgerufen werden können. Dagegen wird Oseltamivirphosphat in Form von Kapseln verabreicht und hat eine sehr hohe Bioverfügbarkeit. Da seine Esterfunktion in vivo gespalten wird, ist Oseltamivir als ein Prodrug anzusehen. Beide Inhibitoren sind *in vitro* gegen alle bekannten Influenzastämme wirksam, einschließlich des H5N1-Vogelgrippestammes. Da die Aminosäurereste am aktiven Zentrum des Enzyms hoch konserviert sind, besteht die Hoffnung, dass diese Inhibitoren ungeachtet des speziellen Virusstammes gegen eine Influenzapandemie wirksam sind.^[8] Zwar zeigte sich nach mehrfachen Viruspassagen eine Resistenz gegen NA-Inhibitoren *in vitro*, aber alle diese Mutanten sind nach ersten Erkenntnissen entweder wenig stabil oder zeigen eine herabgesetzte Infektiosität in Tiermodellen.^[9]

Besonders Oseltamivirphosphat erwies sich als wirksam zur Vorbeugung einer Grippeinfektion. Gemeinsam mit Zanamivir hat es den Nachteil, dass es Grippepatienten nicht später als 36–48 h nach dem Auftreten der Symptome verabreicht werden darf, um wirksam zu sein.^[10] Dies führte zur öffentlichen Forderung nach einer Bevorratung mit Tamiflu, sowohl als eine angemessene Therapie gegen eine mögliche Grippepandemie wie auch als vorbeugender Wirkstoff in Verbindung mit geeigneten Diagnosesystemen, die sich in der Entwicklung befinden.^[3] Als Reaktion auf die weltweite Nachfrage lockerte Roche zum Abbau der gewaltigen Auftragsrückstände die Patentbeschränkungen für Tamiflu und verpflichtete sich, mit-

hilfe von Partnerfirmen den Ausstoß auf 300 Millionen Behandlungseinheiten pro Jahr zu erhöhen.^[11] Jede Behandlung (75-mg-Kapseln, 5-Tages-Einheit) kostet 80–90 Dollar.

Einer der begrenzenden Faktoren für die großtechnische Herstellung des Wirkstoffs ist die Knappheit der Synthesevorstufen, die aus Pflanzen extrahiert werden. Shikimisäure (**3**) und Chinasäure (**4**) sind Zwischenstufen in

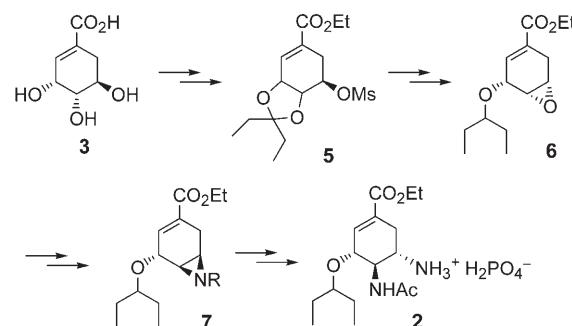


der Biosynthese essentieller aromatischer Aminosäuren. In Pflanzen sind diese Verbindungen ebenfalls Vorstufen für Lignine und Phenole,^[12] und in gewissem Umfang reichern sie sich vorzugsweise in Gymnospermen und dicotylenen Holzgewächsen an. Shikimisäure tritt in Konzentrationen bis zu 0.16 mg g^{-1} Frischgewicht auf, und Chinasäure ist ebenfalls eine weit verbreitete Verbindung.

Die bedeutendste Quelle der Shikimisäure bildet die Pflanzenfamilie *Illicium* (Sternanis). Die Shikimisäure wurde erstmals 1885 aus einem Mitglied dieser Familie (*I. religiosum*) isoliert.^[13] Der in vier Provinzen im Süden Chinas vorkommende Echte Sternanis (*I. verum*) ist eine ergiebige natürliche Quelle für Shikimisäure, wobei 30 kg der getrockneten Pflanze erforderlich sind, um 1 kg Shikimisäure herzustellen.^[14] Um das Vorhaben der US-Regierung zu verwirklichen, 300 Millionen Portionen Tamiflu einzulagern, wären 23 Tonnen des Arzneistoffs nötig (ausgehend von einer 35-proz. Ausbeute des Oseltamivirphosphats aus Shikimisäure und einer Dosis von 75 mg), entsprechend etwa 840 Tonnen Echten Sternanis.^[14] Schon der Bedarf der USA allein erfordert also offensichtlich eine alternative Quelle für Shikimisäure. Mit diesem Problem

beschäftigt sich Frost und Mitarbeiter an der Michigan State University. Es gelang ihnen, *E. coli* genetisch zu modifizieren, sodass es Shikimisäure durch rekombinante mikrobiologische Biokatalyse erzeugte.^[15] Zurzeit deckt das Fermentationsverfahren ungefähr 30% des gegenwärtigen Bedarfs.^[14]

Die steigende Nachfrage nach Oseltamivirphosphat machte es für die Firma Roche und Chemiker im Allgemeinen immer dringlicher, die Versorgung mit Shikimisäure und Chinasäure durch eine verbesserte Isolierung, Fermentation oder Synthese zu steigern und daneben neue Wege zum Wirkstoff zu entwickeln, die nicht von komplexen Naturstoffen, sondern von kostengünstigen und leicht zugänglichen Basischemikalien ausgehen. Das momentane Herstellungsverfahren für **2** zeigt Schema 1. Die Synthese verläuft über die Zwischenstufe **5**, die regioselektiv zum Epoxid **6** umgesetzt wird.^[16] Zur Einführung der Stickstoff-haltigen Substi-



Schema 1. Hauptzwischenstufen für Oseltamivirphosphat aus Shikimisäure. Ms = Methansulfonyl.

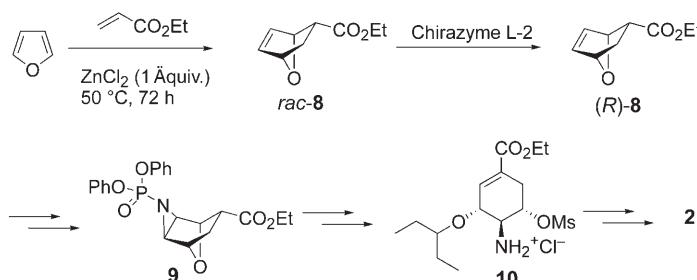
tuenten wurden verschiedene Methoden entwickelt, die zunächst den Einsatz gefährlicher, Azid-haltiger Reagentien mit sich brachten. Aziridine wie **7** waren zwingend erforderliche Zwischenstufen. Die Abhängigkeit von der Azid-Chemie zur Umwandlung des Epoxids **6** in Oseltamivirphosphat wurde als ein Problem der ersten Herstellungsverfahren angesehen.

Bei Roche versuchte man, dieses Problem zu lösen, indem man ausgehend vom Epoxid **6** mehrere Synthesewege zu **2** entwickelte, die ohne Azid-haltige Stickstoffnucleophile auskommen.^[17] Über diese Synthesewege wurde bereits berichtet.^[18] Ein Verzicht auf

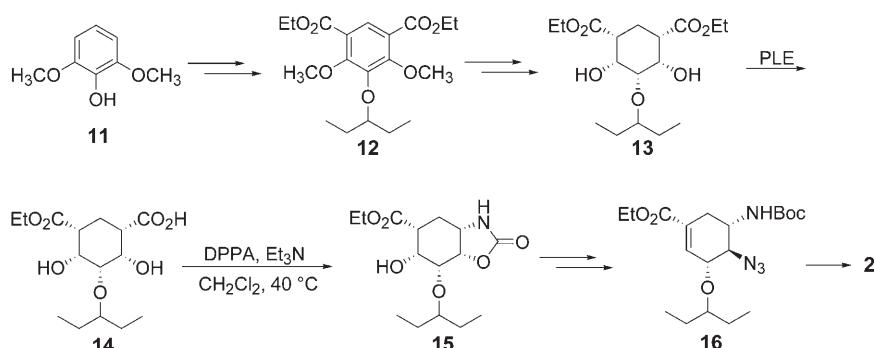
Shikimi- oder Chinasäure als Grundstoff erwies sich als schwieriger; einige entsprechende Versuche sind in der Patentliteratur beschrieben.^[19,20] Ausgangspunkt des ersten (Schema 2) war die Diels-Alder-Reaktion von Furan und Ethylacrylat. Diese Reaktion ergab eine 9:1-Mischung der *exo/endo*-Addukte. Die Racematspaltung des racemischen Addukts **rac-8** gelang mithilfe einer Esterase. Die aus der Cycloaddition hervorgehende Doppelbindung wurde durch ein Phosphorylazid functionalisiert, wodurch zwei regioisomere [3+2]-*exo*-Produkte entstanden. Die beiden *exo*-Triazole wurden thermisch zum Aziridin **9** gespalten, das anschließend durch Umesterung mit Ethanol und basische Eliminierung **10** lieferte, eine Hauptvorstufe für **2**.^[18]

Zwar wurde bei diesem Verfahren der Einsatz von Shikimi- und Chinasäure vermieden, es enthielt allerdings einige unpraktische Stufen, die eine hohe Verdünnung erforderten, was wiederum die Ausbeute ernsthaft beeinträchtigen kann. Zudem ist die Ausbeute der enzymatischen Racematspaltung mit 20 % recht niedrig.

Bei einem anderen Verfahren von Roche findet 1,6-Dimethoxyphenol (**11**) als sehr preiswertes Ausgangsmaterial Verwendung (Schema 3). Inspiriert wurde das Verfahren durch die Erkenntnis, dass **2** eine verborgene C_2 -Symmetrie aufweist. Nach Einführung des 3-Pentylethers lieferten eine Bromierung und eine doppelte Ethoxycarbonylierung den Diester **12**. Eine Rukatalysierte Hydrierung ergab einen all-*cis*-Diether, in dem die Etherfunktionen durch in situ erzeugtes Trimethylsilylid entfernt wurden. Das Produkt dieser Umsetzung war der Dihydroxydiester **13**, der durch preiswerte Schweineleberesterase in hoher Ausbeute (96 %) mit



Schema 2. Der Zugang zu Oseltamivir über eine Diels-Alder-Reaktion mit anschließender enzymatischer Racematspaltung.



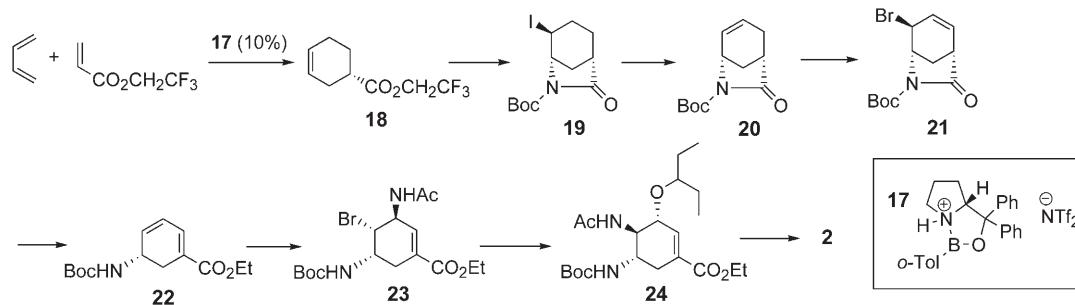
Schema 3. Desymmetrisierungsweg zu Oseltamivir. PLE = Schweineleberesterase, DPPA = Diphenylphosphorylazid, Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl.

hohem Enantiomerenüberschuss (96–98 % ee) zu **14** desymmetriert wurde. Das Intermediat **14** führte über einen Yamada-Curtius-Abbau mithilfe von Diphenylphosphorylazid zum Oxazolidinon **12**. Die nachfolgende Umsetzung mit NaN₃ als Nucleophil ergab schließlich das gewünschte Azid **16** als Zwischenstufe, die in vier weiteren Stufen mit guter Gesamtausbeute (30 %) in **2** umgewandelt wurde.

Dieses Verfahren (Schema 3) kommt ohne Shikimi- und Chinasäure aus und hat Vorteile gegenüber dem Standard-Produktionsverfahren; ein Nachteil bleibt aber der Einsatz von Natriumazid gegen Ende des Prozesses,

was hinsichtlich der Reaktionssicherheit nicht wünschenswert ist.

In letzter Zeit erregte das Versorgungsproblem bei Tamiflu auch die Aufmerksamkeit von Chemikern aus dem Hochschulbereich, von denen nun einige neue Herangehensweisen veröffentlicht wurden. So beschrieben Corey und Mitarbeiter kürzlich eine interessante Methode, bei der 1,3-Butadien und Trifluorethylacrylat als Ausgangsstoffe eingesetzt werden.^[21] Teil dieses Verfahrens ist eine in hoher Ausbeute ablaufende, hoch enantioselektive Cycloaddition, die durch eine katalytische Menge des Oxazaborolidins **17** gefördert wird (Schema 4). Nach der Cyclo-



Schema 4. Das Verfahren von Corey und Mitarbeitern.^[21] Tf = Trifluormethansulfonyl, Tol = Toluol.

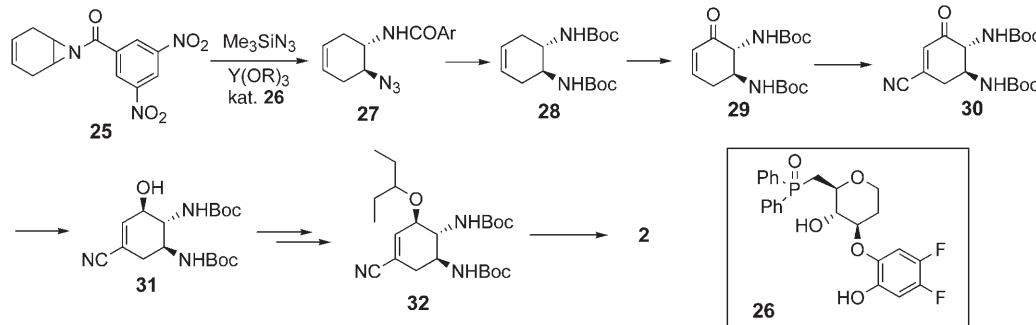
addition führten Amidierung, Iodlactamisierung und Schützen zu **19**, dessen Dehydrohalogenierung und anschließende allylische Bromierung **21** lieferte. Die basenvermittelte Dehydrohalogenierung ergab **22** und dessen nachfolgende regio- und stereoselektive Bromamidierung **23**. Die folgende Dehydrohalogenierung führte zu einer Aziridin-Zwischenstufe, die regioselektiv mit 2-Pentanol zu **24** geöffnet wurde. Entschützen von **24** lieferte Oseltamivirphosphat in 11 Stufen und etwa 30% Gesamtausbeute.

Shibasaki und Mitarbeiter veröffentlichten einen enantioselektiven Weg zu Oseltamivir über das ebenfalls kostengünstige und leicht erhältliche Ausgangsmaterial 1,4-Cyclohexadien (Schema 5).^[22] Dabei lieferte die Öffnung des Acylaziridins **25** mit Trimethylsilylazid unter Katalyse durch Y^{III} und den chiralen Liganden **26** die Verbindung **27** mit 91% ee. Die Enantioselektivität konnte durch Kristallisation weiter erhöht werden. Modifizierungen der funktionellen Gruppen ergaben **28**, das in zwei Schritten mit Selendioxid und Dess-Martin-Periodinan zu **29** (allylisch) oxidiert wurde. Eine Ni-katalysierte Cyanierung lieferte **30**, das stereoselektiv zu **31** reduziert wurde. Die entscheidende Etherbindung wurde durch eine Mitsunobu-Reaktion aufgebaut; Standardreaktionen führten anschließend in 17 Stufen zu Oseltamivirphosphat in 11 Stufen und etwa 30% Gesamtausbeute.

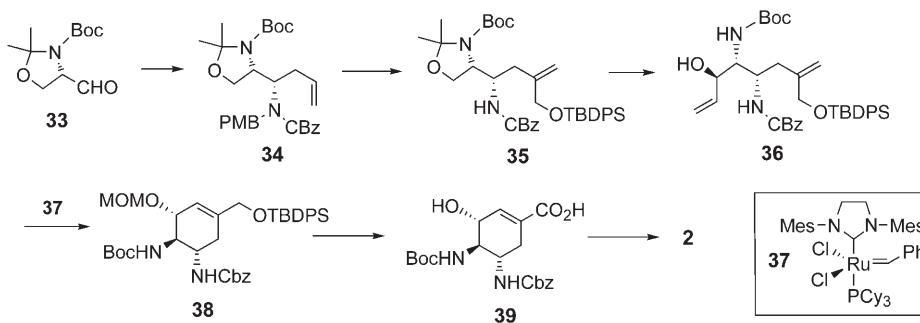
Auch Cong und Yao veröffentlichten eine Synthese des pharmazeutisch wirksamen Bestandteils, wobei sie auf L-Serin als preiswertes und leicht verfügbares Ausgangsmaterial bauten.^[23] Die Synthese (Schema 6) basiert auf einer Ringschlussmetathese, katalysiert durch die Ru-Carben-Spezies der zweiten Generation **37**, die den entscheidenden Cyclohexenkern in **38** hervorbringt. Leider verläuft die Bildung von **36** wenig diastereoselektiv (d.r. 3:1), wodurch die Effizienz der Gesamtsynthese leidet. Schließlich vervollständigten Standardreaktionen die Synthese von **2** in insgesamt 18 Stufen und einer Gesamtausbeute von 16.5% aus der bekannten Zwischenstufe **34**.

Unter den drei neuen Methoden ist die von Corey und Mitarbeitern eindeutig die kürzeste und diejenige mit der höchsten Gesamtausbeute. Ihre Synthese erfordert die wenigsten Stufen, die als ineffizient und überflüssig anzusehen sind, z. B. Schützen/Entschützen oder die Anpassung der Oxidationsstufe funktioneller Gruppen. Nur 2 von 11 Stufen gehören in diese Kategorie. Die anderen beiden Synthesen sind weniger effizient; so enthält die Synthese von Shibasaki und Mitarbeitern 9 dieser Arbeitsschritte bei insgesamt 17 Stufen. Im Umkehrschluss bedeutet dies aber auch, dass das Verfahren noch viele Verbesserungsmöglichkeiten zu seiner Rationalisierung offen lässt und als brauchbarer Weg nicht auszuschließen ist.

Im Allgemeinen ist es sehr schwierig, Synthesen aus dem Hochschulbereich hinsichtlich ihres Potenzials als industrielles Produktionsverfahren zu beurteilen, da sie schlicht nicht zu diesem Zweck entwickelt wurden. So wenden sie typisch akademische Arbeitsschritte an (zu viele Reinigungsschritte sowie der Einsatz von Chromatographie oder von Lösungsmitteln, die in Produktionsanlagen vermieden werden müssen); zudem wurden sie nicht auf ihre Sicherheit geprüft. Der Ansatz von Corey und Mitarbeitern verzichtet auf Azide, weshalb er unter Sicher-



Schema 5. Das Verfahren von Shibasaki und Mitarbeitern.^[22]



Schema 6. Das Verfahren von Cong und Yao.^[23] PMB = *p*-Methoxybenzyl, Cbz = Carbobenzyloxy, TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl, MOM = Methoxy-methyl, Mes = 2,4,6-Trimethylphenyl, Cy = Cyclohexyl.

heitsaspekten zweifellos am aussichtsreichsten ist. Eine sorgfältige Analyse des übrigen Verfahrens könnte aber noch Schwächen aufdecken. Letztlich kann nur die sorgfältige Kostenanalyse eines voll ausgereiften, sicheren industriellen Verfahrens entscheiden, ob diese Methoden zum gegenwärtigen Herstellungsverfahren von Roche konkurrenzfähig sind oder lediglich das Zielmolekül zu annehmbaren Kosten liefern.

Diese aktuellen Fortschritte machen jedoch deutlich, dass der Mangel an China- und Shikimisäure wahrscheinlich kein größeres Hindernis für die großtechnische Herstellung von Oseltamivir ist. Zur Ergänzung von aggressiven Beschaffungsstrategien und Fermentationsmethoden haben drei Arbeitsgruppen Strategien entwickelt, die als Ausgangsmaterialien entweder preiswerte Bausteine des chiralen Pools oder Basischemikalien in Verbindung mit chiralen Katalysatoren nutzen und die beiden von Roche-Chemikern entwickelten Verfahren (dargestellt in Schemata 1 und 2) ergänzen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass diese oder andere einfache enantioselektive Syntheseverfahren innerhalb einiger Jahre (oder auch schneller) zur Reife gebracht werden können und so – vorausgesetzt, es werden entsprechende finanzielle Mittel zur Verfügung gestellt – dabei helfen, den Ausstoß an Oseltamivir zu erhöhen.

Das Versorgungsproblem bei Tamiflu kann aus wissenschaftlicher Sicht auf verschiedenste Weise gelöst werden.

Jeder möglicherweise verhängnisvolle Engpass bei diesem wichtigen Wirkstoff resultiert wahrscheinlich eher aus einer kurzsichtigen Gesundheitspolitik oder juristischen Problemen als aus einem Mangel an praxistauglichen wissenschaftlichen Möglichkeiten.

Online veröffentlicht am 19. Oktober 2006

- R. Belshe, *Clin. Drug Invest.* **2000**, *20*, 447.
[10] A. Graul, P. A. Leeson, J. Castañer, *Drugs Future* **1999**, *24*, 1189.
[11] Siehe zum Beispiel: *Nature* **2006**, *5*, 10 (News and Analysis).
[12] A. Boudet, *Phytochemistry* **1973**, *12*, 363; B. Möller, K. Herrmann, *Phytochemistry* **1983**, *22*, 477.
[13] S. Jiang, G. Singh, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4697; dieser Übersichtsartikel beschreibt ebenfalls den Zugang zu Shikimisäure über Totalsynthesen.
[14] G. Flores, *The Scientist*, online veröffentlicht am 4. Januar **2006**.
[15] K. M. Draths, D. R. Knop, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1603; J. Frost, WO 2005/030949A1, **2005**, und vorhergehende Patente.
[16] M. Federspiel, R. Fischer, M. Hennig, H.-J. Mair, T. Oberhauser, G. Rimmler, T. Albiez, J. Bruhin, H. Estermann, C. Gandert, V. Göckel, S. Götzö, U. Hoffmann, G. Huber, G. Janatsch, S. Lauper, O. Röckel-Stäbler, R. Trussardi, A. G. Zwahlen, *Org. Process Res. Dev.* **1999**, *3*, 266.
[17] M. Karpf, R. Trussardi, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2044; P. J. Harrington, J. D. Brown, T. Foderaro, R. C. Hughes, *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 86.
[18] S. Abrecht, P. Harrington, H. Iding, M. Karpf, R. Trussardi, B. Wirz, U. Zutter, *Chimia* **2004**, *58*, 621.
[19] S. Abrecht, M. Karpf, R. Trussardi, B. Wirz, US Patent 6403824, **2002**.
[20] H. Iding, B. Wirz, U. Zutter, US Patent 6518048, **2003**.
[21] Y.-Y. Yeung, S. Hong, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6310.
[22] Y. Fukuta, T. Mita, N. Fukuda, M. Kanai, M. Shibasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6312.
[23] X. Cong, Z.-J. Yao, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5368.