

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) 028709

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.12.29

(51) Int. Cl. **C07F 9/24 (2006.01)**
A61K 31/661 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(21) Номер заявки
201592101

(22) Дата подачи заявки
2010.05.20

(54) 1-МЕТИЛЭТИЛОВЫЙ СЛОЖНЫЙ ЭФИР N-[(2'R)-2'-ДЕЗОКСИ-2'-ФТОР-2'-МЕТИЛ-Р-ФЕНИЛ-5'-УРИДИЛ]-L-АЛАНИНА И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 61/319,513; 61/179,923

(56) WO-A2-2008121634

(32) 2010.03.31; 2009.05.20

(33) US

(43) 2016.05.31

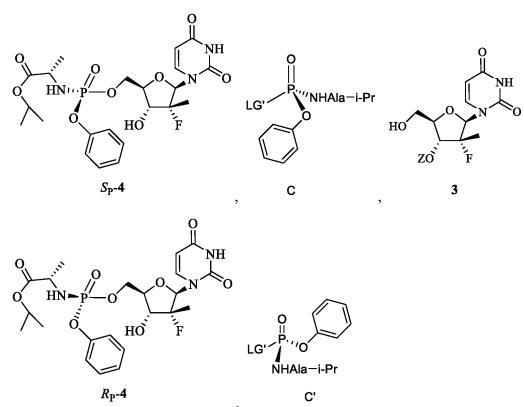
(62) 201370186; 2010.05.20

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖИЛИД ФАРМАССЕТ, ЛЛС (US)

(72) Изобретатель:
**Росс Брюс С., София Майкл Джозеф,
Памулапати Ганапати Редди,
Рачаконда Сугуна, Чжан Хай-жэнь,
Чун Бъён-квон, Ван Пейюань (US)**

(74) Представитель:
Назина Е.Е., Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способам получения нуклеозидных фосфорамидатов, которые применяют в качестве средств для лечения вирусных заболеваний. Способ получения соединения формулы S_p-4 включает взаимодействие соединения С с основным реагентом и соединением 3. Способ получения соединения формулы R_p-4 включает взаимодействие соединения С с основным реагентом и соединением 3.



B1

028709

028709
B1

Область техники

Изобретение относится к способам получения нуклеозидных фосфорамидатов, которые применяют в качестве средств для лечения вирусных заболеваний. Данные соединения являются ингибиторами РНК-зависимой РНК вирусной репликации и являются полезными в качестве ингибиторов NS5B полимеразы вируса гепатита С, в качестве ингибиторов репликации вируса гепатита С (HCV) и для лечения инфекции гепатита С у млекопитающих.

Уровень техники

Инфекция вируса гепатита С является основной проблемой со здоровьем, приводящей к хроническому заболеванию печени, такому как цирроз и печеночно-клеточный рак, у значительного ряда инфицированных особей, по оценкам, составляющем 2-15% от населения Земли. По оценкам, только в Соединенных Штатах проживают 4,5 миллиона инфицированных человек, в соответствии с данным Центра по контролю заболеваний США. В соответствии с данными Всемирной Организации Здравоохранения, в мире проживает более чем 200 миллионов инфицированных особей, где как минимум 3-4 миллиона людей инфицируются каждый год. После инфицирования, у приблизительно 20% людей данный вирус выводится, но остальные являются носителями вируса гепатита С в течение всей их жизни. У 10-20% хронически инфицированных особей со временем развивается разрушающий печень цирроз или рак. Вирусное заболевание передается парентерально с загрязненной кровью и продуктами крови, через загрязненные иглы, или половым путем и по вертикали от инфицированных матерей, или матерей-переносчиков вируса, их потомству. Существующее в настоящее время лечение вируса гепатита С инфекции, ограниченные иммунотерапией рекомбинантным интерфероном- α отдельно или в комбинации с нуклеозидным аналогом рибавирином, имеют ограниченное клиническое преимущество. Дополнительно, отсутствует установленная вакцина для лечения вируса гепатита С. Следовательно, существует острая потребность в улучшенных терапевтических агентах, которые эффективно борются с хронической инфекцией вируса гепатита С.

Вирион вируса гепатита С является оболочечным позитивно-цепочечным вирусом РНК с одной олигорибонуклеотидной геномной последовательностью, состоящей из приблизительно 9600 оснований, которая кодирует полипротеин, состоящий из приблизительно 3,010 аминокислот. Белковые продукты гена вируса гепатита С состоят из структуральных белков С, E1, и E2, и не структуральных белков NS2, NS3, NS4A и NS4B, и NS5A и NS5B. Неструктуральные (HC) белки, как считают, должны обеспечивать каталитический механизм для вирусной репликации. NS3 протеаза высвобождает NS5B, РНК-зависимую РНК полимеразу, из полипротеиновой цепи. NS5B полимераза вируса гепатита С необходима для синтеза двухцепочечной РНК из одноцепочечной вирусной РНК, которая служит темплатой в цикле репликации вируса гепатита С. Поэтому, NS5B полимеразу считают необходимым компонентом в комплексе репликации вируса гепатита С (K. Ishii, et al., *Heptology*, 1999, 29: 1227-1235; V. Lohmann, et al., *Virology*, 1998, 249: 108-118). Ингибирование полимеразы NS5B вируса гепатита С предотвращает образование двухцепочечной РНК вируса гепатита С и поэтому представляет собой привлекательный подход для разработки противовирусной терапии, специфичной к вирусу гепатита С.

Вирус гепатита С относится к гораздо более широкому семейству вирусов, которые имеют много общих признаков.

Флавивирусы

Семейство вирусов Flaviviridae (флавивирусов) содержит как минимум три различных рода: пестивирусы, которые вызывают заболевание у крупного рогатого скота и свиней; флавивирусы, которые являются первичной причиной заболеваний, таких как лихорадка Денге и желтая лихорадка; и гепацивирусы, единственным членом которого является вирус гепатита С. Род флавивирусов включает более чем 68 членов, разделенных на группы на основании серологической связности (Calisher et al., *J. Gen. Virol.*, 1993, 70, 37-43). Клинические симптомы варьируются и включают лихорадку, энцефалит и гемморагическую лихорадку (Fields Virology, Editors: Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1996, Chapter 31, 931-959). Флавивирусы в глобальном масштабе, связанные с человеческими заболеваниями, включают гемморагическую форму лихорадки Денге (ФЛД), вирус желтой лихорадки, шоковый синдром и вирус японского энцефалита (Halstead, S. B., *Rev. Infect. Dis.*, 1984, 6, 251-264; Halstead, S. B., *Science*, 239:476-481, 1988; Monath, T. P., *New Eng. J. Med.*, 1988, 319, 64 1-643).

Род пестивирусов включает вирус диареи крупного рогатого скота (ВДКРС), классический вирус свиной лихорадки (КВСЛ, также называемый вирусом холеры свиней) вирус пограничной болезни (ВПБ) овец (Moennig, V. et al. *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). Пестивирусные инфекции одомашненного скота (крупного рогатого скота, свиней и овец) приводят к значительным экономическим потерям во всем мире. ВДКРС приводит к возникновению вирусной диареи у крупного рогатого скота и имеет значительную важность с экономической точки зрения в промышленном животноводстве (Meyers, G. and Thiel, H.J., *Advances in Vims Research*, 1996, 47, 53-118; Moennig V., et al., *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). Человеческие пестивирусы не были настолько широко охарактеризованы, как животные пестивирусы. Однако серологические исследования указывают на значительное пестивирусное воздействие у людей.

Пестивирусы и гепацивирусы являются близкородственными группами вирусов в семействе Flaviviridae. Другие близкородственные вирусы в данном семействе включают GB вирус A, GB вирус A-

подобные агенты, GB вирус-В и GB вирус -С (который также называют вирусом гепатита G, HGV). Гепацитивирусная группа (вирус гепатита С) состоит из ряда близкородственных, но генотипно различных вирусов, инфицирующих людей. Существует как минимум 6 генотипов вируса гепатита С и более, чем 50 подтипов. Ввиду подобия между пестивирусами и гепацитивирусами, в сочетании с низкой способностью гепацитивирусов к эффективному росту в клеточной культуре, вирус диареи крупного рогатого скота (ВДКРС) часто используют в качестве суррогата для изучения вируса гепатита С.

Генетическая организация пестивирусов и гепацитивирусов очень похожа. Такие вирусы с позитивно-цепочечной РНК обладают одной большой открытой рамкой считывания (ORF), кодирующей вирусные белки, необходимые для вирусной репликации. Такие белки экспрессируются как полипротеин, который обрабатывается одновременно с и после трансляции как клеточными, так и вирус-кодированными протеиназами, с получением зрелых вирусных белков. Вирусные белки, ответственные за репликацию вирусной геномной РНК, расположены внутри приблизительно карбокси-конца. Две трети ORF имеют название неструктуральных (NS) белков. Генетическая организация и белковая обработка неструктуральной белковой части ORF для пестивирусов и гепацитивирусов очень схожа. Как для пестивирусов, так и для гепацитивирусов, зрелые неструктуральные (NS) белки, в последовательном порядке от амино-конца неструктурального белка, кодирующего область к карбокси-концу ORF, состоят из p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, и NS5B.

NS белки пестивирусов и гепацитивирусов имеют общие домены последовательностей, являющиеся характеристичными для специфичных белковых функций. Например, NS3 белки вирусов в обеих группах содержат мотивы аминокислотных последовательностей, характеристичные для сериновых протеиназ и геликаз (Gorbalenya et al., Nature, 1988, 333, 22; Bazan and Fletterick Virology, 1989, 171, 637-639; Gorbalenya et al., Nucleic Acid Res., 1989, 17, 3889-3897). Аналогично, NS5B белки пестивирусов и гепацитивирусов имеют мотивы, характеристичные для РНК-направленных РНК полимераз (Koonin, E.V. and Dolja, V.V., Crir. Rev. Biochem. Molec. Biol. 1993, 28, 375-430).

Действительные роли и функции NS белков пестивирусов и гепацитивирусов в жизненном цикле вирусов непосредственно аналогичны. В обоих случаях, NS3 сериновая протеиназа ответственна за все протеолитические обработки полипротеиновых предшественников ниже ее положения в ORF (Wiskerchen and Collett, Virology, 1991, 184, 341-350; Bartenschlager et al., J. Virol. 1993, 67, 3835-3844; Eckart et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1993, 192, 399-406; Grakoui et al., J. Virol. 1993, 67, 2832-2843; Grakoui et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 10583-10587; Hijikata et al., J. Virol. 1993, 67, 4665-4675; Tome et al., J. Virol. 1993, 67, 4017-4026). NS4A белок, в обоих случаях, действует как кофактор с NS3 сериновой протеазой (Bartenschlager et al., J. Virol. 1994, 68, 5045-5055; Failla et al., J. Virol. 1994, 68, 3753-3760; Xu et al., J. Virol. 1997, 71:53 12-5322). NS3 белок обоих вирусов также функционирует как геликаза (Kim et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1995, 215, 160-166; Jin and Peterson, Arch. Biochem. Biophys., 1995, 323, 47-53; Warrener and Collett, J. Virol. 1995, 69, 1720-1726). Наконец, NS5B белки пестивирусов и гепацитивирусов имеют предсказанную РНК-направленную РНК полимеразную активность (Behrens et al., EMBO, 1996, 15, 12-22; Lechmann et al., J. Virol. 1997, 71, 8416-8428; Yuan et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1997, 232, 231-235; Hagedorn, PCT WO 97/12033; Zhong et al., J. Virol. 1998, 72, 9365-9369).

В настоящее время существует ограниченное количество опций лечения особей, инфицированных вирусом гепатита С. Современной утвержденной терапевтической возможностью является применение иммунотерапии с рекомбинантным интерфероном- α отдельно или в комбинации с нуклеозидным аналогом рибавирином. Данная терапия ограничена клинической эффективностью и только 50% пролеченных пациентов откликаются на терапию. Поэтому, существует значительная потребность в более эффективных и новых терапиях для обеспечения неудовлетворенной медицинской потребности, которую представляет инфекция вирусов гепатита С.

В настоящее время был идентифицирован ряд потенциальных молекулярных мишней для разработки лекарственных средств, противовирусных препаратов, непосредственно воздействия, таких как терапевтические средства против вируса гепатита С, включая, но не ограничиваясь приведенным, NS2-NS3 аутопротеазу, N3 протеазу, N3 геликазу и NS5B полимеразу. РНК-зависимая РНК полимераза является абсолютно незаменимой для репликации одноцепочечного, положительно направленного, РНК генома, и данный фермент вызвал значительный интерес среди медиков-химиков.

Были рассмотрены ингибиторы вируса гепатита С NS5B в качестве потенциальных терапий против инфекций вируса гепатита С: Tan, S.-L., et al., Nature Rev. Drug Discov., 2002, 1, 867-881; Walker, M.P. et al., Exp. Opin. Investigational Drugs, 2003, 12, 1269-1280; Ni, Z-J., et al., Current Opinion in Drug Discovery and Development, 2004, 7, 446-459; Beaulieu, P. L., et al., Current Opinion in Investigational Drugs, 2004, 5, 838-850; Wu, J., et al., Current Drug Targets-Infectious Disorders, 2003, 3, 207-219; Griffith, R.C., et al., Annual Reports in Medicinal Chemistry, 2004, 39, 223-237; Carroll, S., et al., Infectious Disorders-Drug Targets, 2006, 6, 17-29. Возможность создания резистентных штаммов вируса гепатита С и необходимость в идентификации агентов с широким генотипным охватом поддерживает необходимость в непрерывных попытках идентификации новых и более эффективных нуклеозидов в качестве ингибиторов вируса гепатита С NS5B.

Нуклеозидные ингибиторы NS5B полимеры могут действовать либо в качестве неструктурального

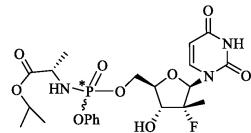
субстрата, что приводит к обрыванию цепи, или в качестве конкурентного ингибитора, который конкурирует с нуклеотидом за связывание полимеразы. Для функционирования в качестве агента, обрывающего цепь, нуклеозидный аналог должен быть поглощен клеткой и превращен *in vivo* в трифосфат для конкуренции за полимеразный нуклеотидный сайт связывания. Такое превращение в трифосфат обычно опосредовано клеточными киназами, которые придают дополнительные структуральные требования потенциальному нуклеозидному ингибитору полимераз. К сожалению, это ограничивает непосредственную оценку нуклеозидов в качестве ингибиторов репликации вируса гепатита С для клеточных анализов, способных к фосфорилированию *in situ*.

В некоторых случаях, биологическая активность нуклеозида затруднена ввиду его плохих характеристик как субстрата для одной или более киназ, необходимых для его превращения в активную трифосфатную форму. Образованиеmonoфосфата при помощи нуклеозид киназы в общем рассмотрено как лимитирующая стадия в трех случаях фосфорилирования. Для того, чтобы устранить потребность в первоначальной стадии фосфорилирования в метаболизме нуклеозида в активный трифосфатный аналог, было сообщено о получении приемлемых фосфатных пролекарств. Нуклеозидные фосфорамидатные пролекарства, как было показано, являются предшественниками активного нуклеозидного трифосфата и ингибируют вирусную репликацию при введении в цельный клетки, инфицированные (McGuigan, C., et al., J. Med. Chem., 1996, 39, 1748-1753; Valette, G., et al., J. Med. Chem., 1996, 39, 1981-1990; Balzarini, J., et al., Proc. National Acad Sci USA, 1996, 93, 7295-7299; Siddiqui, A. Q., et al., J. Med Chem., 1999, 42, 4122-4128; Eisenberg, E. J., et al., Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2001, 20, 1091-1098; Lee, W.A., et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49, 1898); US 2006/0241064; и WO 2007/095269.

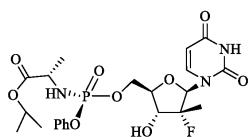
Также полезность нуклеозидов в качестве жизнеспособных терапевтических агентов ограничена их иногда плохими физико-химическими и фармакокинетическими свойствами. Такие плохие свойства могут ограничивать абсорбцию агента в кишечнике и ограничивать поглощение в ткани или клетки-мишени. Для улучшения их свойств были применены нуклеозидные пролекарства. Было продемонстрировано, что получение нуклеозидных фосфорамидатов улучшает системное поглощение нуклеозида и дополнительно, фосфорамидатный фрагмент таких "пронуклеотидов" замаскирован нейтральными липофильными группами с получением приемлемого коэффициента распределения для оптимизации и транспорта в клетку, резко усиливая внутриклеточную концентрацию нуклеозидного monoфосфатного аналога по сравнению с введением родительского нуклеозида отдельно. Ферментно-опосредованный гидролиз фосфатного сложноэфирного фрагмента приводит к получению нуклеозидного monoфосфата, в котором изначальное фосфорилирование, ограничивающее скорость, является необязательным. Для этого, в патентной заявке США № 12/053,015, которая соответствует WO 2008/121634 и US 2010/0016251, описан ряд фосфорамидатных нуклеозидных пролекарств, многие из которых проявляют активность в анализе вируса гепатита С. Некоторые соединения, описанные в US 2010/0016251, были проанализированы в качестве потенциальных клинических кандидатов для утверждения Управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами.

Краткое описание изобретения

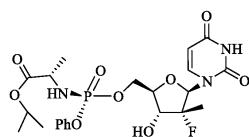
В данной заявке описано соединение, представленное формулой 4 и его соответствующие фосфор-содержащие диастереомеры, представленные формулами S_p-4 и R_p-4,



4

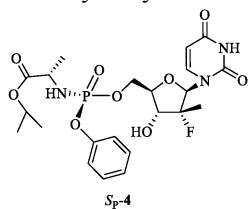


Sp-4



Rp-4

Настоящее изобретение относится к способу получения соединения формулы Sp-4:

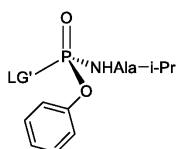


Sp-4

,

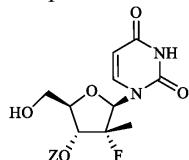
включающему:

i) взаимодействие соединения С:



C

где LG' представляет собой п-нитрофеноксид, п-хлорфеноксид, о-хлорфеноксид, 2,4-динитрофеноксид или пентафтторфеноксид, с основным реагентом и соединением 3:

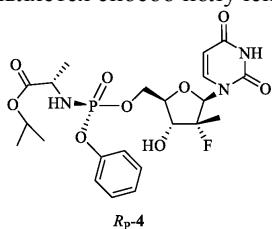


3

где Z представляет собой водород, для получения $S_p\text{-}4$; или ii) взаимодействие соединения С с основным реагентом и соединением 3, где Z выбран из бензоила, ацетила, фенилзамещенного бензоила, тетрагидропирина, тритила, 4,4'-диметокситритила, 4-монометокситритила, trimetokситритила, трет-бутилдиметилсилила, трет-бутилдифенилсилила, $-\text{Si}(^i\text{Pr})_2\text{OSi}(^i\text{Pr})_2\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ и $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{Ph}$, и снятие защитной группы для получения $S_p\text{-}4$.

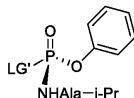
В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения LG' представляет собой п-нитрофеноксид или пентафтторфеноксид.

Ещё одним объектом изобретения является способ получения соединения формулы $R_p\text{-}4$:

 $R_p\text{-}4$

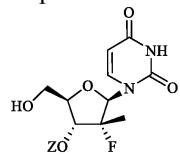
включающий:

i) взаимодействие соединения С:



C'

где LG' представляет собой п-нитрофеноксид, п-хлорфеноксид, о-хлорфеноксид, 2,4-динитрофеноксид или пентафтторфеноксид, с основным реагентом и соединением 3:



3

где Z представляет собой водород, для получения $R_p\text{-}4$, или ii) взаимодействие соединения С с основным реагентом и соединением 3, где Z выбран из бензоила, ацетила, фенилзамещенного бензоила, тетрагидропирина, тритила, 4,4'-диметокситритила, 4-монометокситритила, trimetokситритила, трет-бутилдиметилсилила, трет-бутилдифенилсилила, $-\text{Si}(^i\text{Pr})_2\text{OSi}(^i\text{Pr})_2\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ и $-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{Ph}$, и снятие защитной группы для получения $R_p\text{-}4$.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения LG' представляет собой п-нитрофеноксид или пентафтторфеноксид.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - дифрактограма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения 4;

фиг. 2 - дифрактограма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения $R_p\text{-}4$;

фиг. 3 - дифрактограма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения $S_p\text{-}4$ (форма 1);

фиг. 4 - дифрактограма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения $S_p\text{-}4$ (форма 1);

фиг. 5 - дифрактограма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения $S_p\text{-}4\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (форма 2);

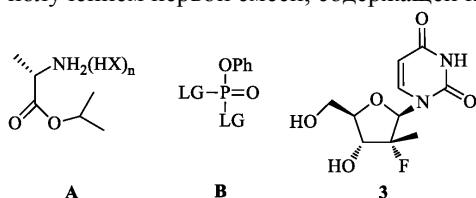
фиг. 6 - дифрактограма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения $S_p\text{-}4\cdot\text{CHCl}_3$ (форма 3);

фиг. 7 - дифрактограма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения S_p-4 (форма 4);
 фиг. 8 - дифрактограма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения S_p-4 (форма 5);
 фиг. 9 - дифрактограма дифракционного рентгеновского анализа высокого разрешения S_p-4 (аморфное);
 фиг. 10 - рентгеновская кристаллическая структура для S_p-4 (форма 1);
 фиг. 11 - рентгеновская кристаллическая (изотропная) структура для S_p-4·CH₂Cl₂ (форма 2);
 Фиг. 12 - рентгеновская кристаллическая (анизотропная) структура для S_p-4·CH₂Cl₂ (форма 2);
 фиг. 13 - рентгеновская кристаллическая структура для S_p-4·CHCl₃ (форма 3);
 фиг. 14 - фурье-ИК спектр 4;
 фиг. 15 - фурье-ИК спектр R_p-4;
 фиг. 16 - фурье-ИК спектр S_p-4;
 фиг. 17 - термогравиметрический анализ и анализ дифференциальной сканирующей калориметрии 4;
 фиг. 18 - термогравиметрический анализ и анализ дифференциальной сканирующей калориметрии R_p-4;
 фиг. 19 - термогравиметрический анализ и анализ дифференциальной сканирующей калориметрии S_p-4;
 фиг. 20А - рентгеновская кристаллическая структура для 8 (S_p-изомер) (молекула № 1 асимметричного элемента).
 фиг. 20В - рентгеновская кристаллическая структура для 8 (S_p-изомер) (молекула № 2 асимметричного элемента).

Подробное описание изобретения

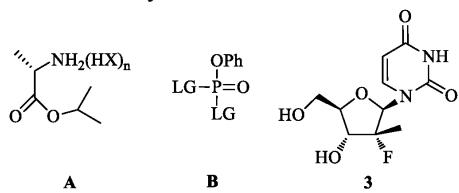
Получение

В данном описании раскрыты способы получения любого из соединений 4, R_p-4, или S_p-4, включающий: а) реакцию изопропил-аланата, А, ди-LG-фенилfosфата, В, 2'-дезокси-2'-фтор-2'-С-метилуридуина, 3, и основания, с получением первой смеси, содержащей как минимум один из S_p-4 и R_p-4



где X представляет собой конъюгированное основание кислоты, n представляет собой 0 или 1, и LG представляет собой отходящую группу; б) реакцию первой смеси с защитным соединением с получением второй смеси, содержащей как минимум одно из защищенного S_p-4 и защищенного R_p-4; и с) необязательно подвергание второй смеси кристаллизации, хроматографии или экстракции с получением 4, S_p-4, или R_p-4. Изопропил алантонат присутствует в виде его соли соляной кислоты, которая, преимущественно, существенно безводная. Основанием является Н-метилимидазол. Молярное соотношение А-к-В-к-3 составляет приблизительно 1,6---1,3-к-1. Защитное соединение представляет собой трет-бутил-диметилсилил-хлорид.

В настоящем описании раскрыт способ получения S_p-4 или R_p-4, включающий: а) реакцию изопропил-аланата, А, ди-LG-фенилфосфата, В, 2'-дезокси-2'-фтор-2'-С-метилуридуина, 3, и основания, с получением первой смеси, содержащей как минимум один из S_p-4 и R_p-4



где X представляет собой конъюгированное основание кислоты, n представляет собой 0 или 1, и LG представляет собой отходящую группу; и б) необязательно подвергание второй смеси кристаллизацией, хроматографии или экстракции с получением очищенного S_p-4 или R_p-4.

Данный способ получения R_p-4 дополнительно включает дополнительную очистку второй смеси или очищенного R_p-4 путем растворения или суспензирования второй смеси или очищенного R_p-4 смеси в растворителе; необязательно с последующим высеванием кристаллического R_p-4; и добавление достаточного количества анти-растворителя с получением кристаллического R_p-4.

Данный способ получения S_p-4 дополнительно включает дополнительную очистку второй смеси или очищенного S_p-4 путем d) растворения или суспензирования второй смеси или очищенного S_p-4 в растворителе с последующим высеванием кристаллического S_p-4 при приблизительно комнатной температуре; сбор первого твердого вещества, большая часть которого содержит S_p-4; растворение первого твердого вещества в растворителе при его температуре дефлегмации; и охлаждение либо добавление ан-

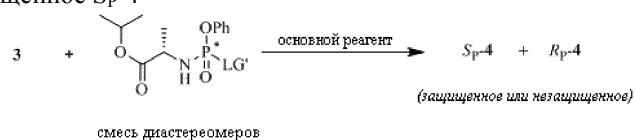
ти-растворителя с получением второго твердого вещества.

Данный способ получения Sp-4, дополнительно включает дополнительную очистку Sp-4 путем d) растворения или супензирования второй смеси или очищенной Sp-4 смеси в первом растворителе с последующим добавлением анти-растворителя таким образом, чтобы получить первую композицию, в которой остаточный растворитель/антирастворитель удален декантацией с получением остатка; обработки остатка раствором, содержащим первый растворитель и анти-растворитель с получением второй композиции, при этом после уменьшения давления получают первое твердое вещество; растворения или супензирования первого твердого вещества с использованием второго растворителя таким образом, чтобы получить третью композицию; добавления высеченных кристаллов Sp-4 в третью композицию; сбор второго твердого вещества; растворения или супензирования второго твердого вещества в третьем растворителе, необязательно нагретого до температуры дефлгмации третьего растворителя с получением четвертой композиции, и, при необходимости, охлаждения четвертой композиции с получением третьего твердого вещества, содержащего Sp-4, которое собирают путем фильтрования.

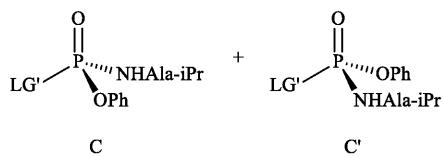
Sp-4, Sp-4 дополнительно очищают при помощи второй смеси либо очищают Sp-4 путем d) добавления силикагеля ко второй смеси или очищают Sp-4 с последующим испарением растворителя с получением сухой суспензии; перемешивания сухой суспензии в первой комбинации растворитель/антирастворитель с получением первой влажной суспензии; декантации первой комбинации растворитель/ антирастворитель из первой влажной суспензии с получением второй влажной суспензии и первой композиции; добавления ко второй влажной суспензии второй комбинации растворитель/антирастворитель с последующим перемешиванием; декантации второй комбинации растворитель/антирастворитель из второй влажной суспензии с получением третьей влажной суспензии и второй композиции; необязательно повторение стадий g)-h) на третьей влажной суспензии или дополнительных влажных суспензиях; испарения растворителя из второй композиции, и необязательно любой дополнительной композиции, полученной на необязательной стадии i) получения первого твердого вещества; растворения или суспендирования первого твердого вещества в растворе, содержащем третий растворитель и необязательно четвертый растворитель с получением третьей композиции; необязательно добавляя высеченные кристаллы Sp-4 к третьей композиции; получение из третьей композиции второго твердого вещества, содержащего Sp-4; и необязательно повторную кристаллизацию второго твердого вещества с использованием третьего растворителя с получением третьего твердого вещества, содержащего Sp-4.

Средний специалист оценит, что соединения могут быть разделены путем традиционной экстракции, традиционной кристаллизации или традиционных хроматографических методов. Традиционные хроматографические методы включают, не ограничиваясь приведенным, хроматографию на силикагеле (с применением, например, 3-5% метанола в ДХМ или 4-6% изопропанола в ДХМ) с получением повышенных уровней одного изомера (50-100%) и затем его кристаллизацию. Альтернативно, можно использовать хроматографию с обращенной фазой (с применением, например, 1-30% ацетонитрильно-водной подвижной фазы). Дополнительно, соединения могут быть выделены при помощи сверхкритической флюидной хроматографии с диоксидом углерода в качестве основного растворителя и спиртов, таких, как метанол, в качестве модификатора, преимущественно, с использованием соответствующих хиальных сред, например, Daicel Chiralpack IA. Альтернативно, может быть использована хроматография на псевдоподвижном слое с соответствующими хиальными средами, например, Daicel ChiralPack IA, с использованием смеси растворителей, таких, как гексан/изопропанол, или растворителей по отдельности, например, этилацетата.

Описан способ получения Sp-4, который включает: а) реакцию изопропил-аланил-фосфорамида с 3'-О-защищенным или незащищенным 3, и основным реагентом с получением композиции, содержащей защищенное или незащищенное Sp-4



где изопропил-аланил-фосфорамидат состоит из смеси диастереомеров, представленных следующими структурами:



где соотношение C:C' составляет приблизительно 1:1.

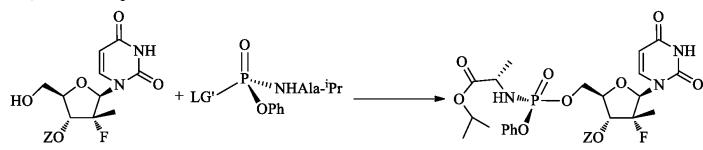
Основной реагент представляет собой трет-бутилмагний хлорид и соотношение С:С' превышает или равно приблизительно 1:1.

В другом варианте основной реагент представляет собой трет-бутилмагний хлорид и соотношение С:С' превышает приблизительно 1:1.

В другом варианте основной реагент представляет собой трет-бутилмагний хлорид и соотношение С:С' составляет как минимум приблизительно 1,5:1, приблизительно 2,3:1, приблизительно 4:1, приблизительно 5,7:1, приблизительно 9:1, приблизительно 19:1, приблизительно 32,3:1, приблизительно 49:1 или приблизительно 99:1,

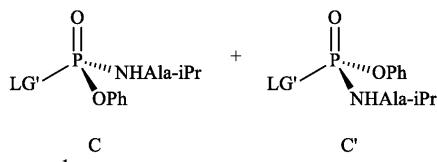
LG' представляет собой п-нитрофеноксид, основной реагент представляет собой трет-бутилмагний хлорид, и соотношение С:С' составляет как минимум приблизительно 1,5:1, приблизительно 2,3:1, приблизительно 4:1, приблизительно 5,7:1, приблизительно 9:1, приблизительно 19:1, приблизительно 32,3:1, приблизительно 49:1 или приблизительно 99:1,

Описан способ получения S_p-4, включает: а) реакцию изопропил-аланил-фосфорамидата (С) с 3'-О-защищенным или незащищенным 3, и основным реагентом с получением композиции, содержащей защищенное или незащищенное S_p-4



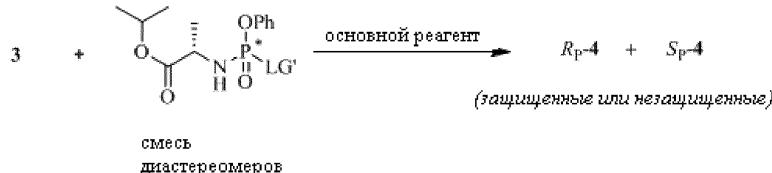
где Z является защитной группой или водородом; LG' представляет собой отходящую группу; и b) необязательно подвергание полученного защищенного или незащищенного S_p-4 хроматографии, экстракции, или кристаллизации с получением очищенного защищенного или незащищенного S_p-4. В подварианте исполнения, LG' представляет собой тозилат, камфоросульфонат, или арилоксид, замещенный как минимум одной электроноакцепторной группой; более преимущественно, LG' выбирают из п-нитрофеноксида, 2,4-динитрофеноксида, и пентафторфеноксида. В дополнительном подварианте исполнения, если S_p-4 защищен, т.е., Z не является водородом, способ в соответствии с девятым вариантом исполнения дополнительно направлен на снятие защитных групп с S_p-4. В дополнительном подварианте исполнения, реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком, как, например, тетрагидрофуран или другой эфирный растворитель, отдельно по одному или в комбинации друг с другом или с C₂-C₇ нитрилом, например, ацетонитрилом.

Данный способ дополнительно включает 1) реакцию (LG')P(O)(LG)₂, где LG, независимо от LG', представляет собой отходящую группу, с (i) изопропил-аланатом и первым основанием, с получением (LG')P(O)(LG)(Ala-iPr) с последующей реакцией (LG')P(O)(LG)(Ala-iPr) с фенолом и вторым основанием с получением смеси, содержащей С и С', (ii) фенолом и первым основанием с получением (LG')P(O)(LG)(OPH) с последующей реакцией (LG')P(O)(LM)(OPH) с изопропил-аланатом и вторым основанием с получением смеси, содержащей С и С', или (iii) комбинирования изопропил-аланата, фенола, и как минимум одним основанием с получением смеси, содержащей С и С'; или 2) реакции (PhO)P(O)(LG)₂, где LG, независимо от LG', представляет собой отходящую группу, с (i) изопропил-аланатом и первым основанием с получением (PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr) с последующей реакцией (PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr) с предшественником отходящей группы и вторым основанием с получением смеси, содержащей С и С',

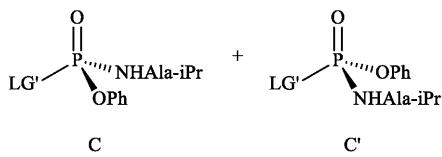


и подвергание смеси хроматографии или кристаллизации смеси с получением С. Изопропил аланин может присутствовать в виде его соли соляной кислоты, которая, преимущественно, существенно безводная.

Описан способ получения R_p-4, который включает: а) реакцию изопропил-аланил-фосфорамидата с 3'-О-защищенным или незащищенным 3, и основным реагентом с получением композиции, содержащей защищенное или незащищенное R_p-4



где изопропил-аланил-фосфорамидат состоит из смеси диастереомеров. Представленных следующими структурами:



где соотношение C':C составляет приблизительно 1:1.

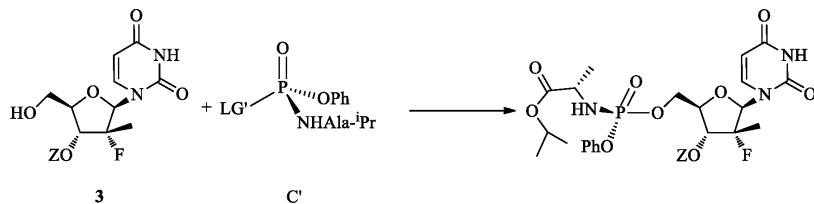
В первом варианте способа основной реагент представляет собой трет-бутилмагний хлорид и соотношение C':C превышает или равно приблизительно 1:1.

Во втором варианте способа основной реагент представляет собой трет-бутилмагний хлорид и соотношение C':C; превышает приблизительно 1:1.

В третьем варианте способа основной реагент представляет собой трет-бутилмагний хлорид и соотношение C':C составляет как минимум приблизительно 1,5:1, приблизительно 2,3:1, приблизительно 4:1, приблизительно 5,7:1, приблизительно 9:1, приблизительно 19:1, приблизительно 32,3:1, приблизительно 49:1, или приблизительно 99:1.

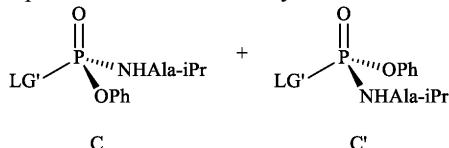
В четвертом варианте способа LG' представляет собой п-нитрофеноксид, основной реагент представляет собой трет-бутилмагний хлорид, и соотношение C':C составляет как минимум приблизительно 1,5:1, приблизительно 2,3:1, приблизительно 4:1, приблизительно 5,7:1, приблизительно 9:1, приблизительно 19:1, приблизительно 32,3:1, приблизительно 49:1, или приблизительно 99:1.

Описан способ получения R_p-4, включает: а) реакцию изопропил-аланил-фосфорамидата (C) с 3'-О-защищенным или незащищенным 3, и основным реагентом с получением композиции, содержащей защищенное или незащищенное R_p-4



где Z является защитной группой или водородом; LG' представляет собой отходящую группу; и б) необязательно подвергание полученного защищенного или незащищенного R_p-4 хроматографии, экстракции, или кристаллизации с получением очищенного защищенного или незащищенного R_p-4. В подвариантне исполнения, LG' представляет собой тозилат, камфоросульфонат, или арилоксид, замещенный как минимум одной электроноакцепторной группой; более преимущественно, LG' выбирают из п-нитрофеноксида, 2,4-динитрофеноксида, и пентафторфеноксида. В дополнительном подвариантне исполнения, если R_p-4 защищено, т.е. Z не является водородом, способ в соответствии с девятым вариантом исполнения дополнительно направлен на снятие защитных групп с защищенного R_p-4. В дополнительном подвариантне исполнения реакцию проводят в полярном аprotонном растворителе, таком как, например, тетрагидрофуран или другой эфирный растворитель, по одному отдельно или в комбинации друг с другом или с C₂-C₇ нитрилом, например, ацетонитрилом.

Способ дополнительно включает 1) реакцию (LG')P(O)(LG)₂, где LG, независимо от LG', представляет собой отходящую группу, с (i) изопропил-аланатом и первым основанием с получением (LG')P(O)(LG)(Ala-iPr) с последующей реакцией (LG')P(O)(LG)(Ala-iPr) с фенолом и вторым основанием с получением смеси, содержащей С и С, (ii) фенолом и первым основанием с получением (LG')P(O)(LG)(OPH) с последующей реакцией (LG')P(O)(LG)(OPH) с изопропил-аланатом и вторым основанием с получением смеси, содержащей С и С, или (iii) комбинирование изопропил-аланата, фенола, и как минимум одного основания с получением смеси, содержащей С и С; или 2) реакцию (PhO)P(O)(LG)₂, где LG, независимо от LG, представляет собой отходящую группу, с (i) изопропил-аланатом и первым основанием с получением (PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr) с последующей реакцией (PhO)P(O)(LG)(Ala-iPr) с предшественником отходящей группы и вторым основанием с получением смеси, содержащей С и С,



и подвергание смеси хроматографии или кристаллизацию смеси с получением C'. В одном аспекте способа изопропил аланат присутствует в виде его соли соляной кислоты, которая, преимущественно, существенно безводная.

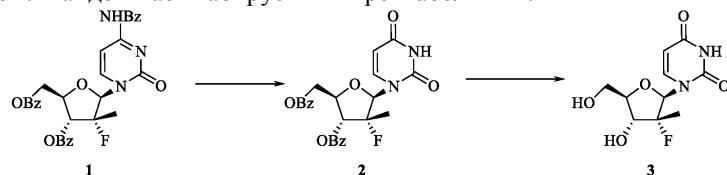
Примеры

Следующие примеры служат для того, чтобы способствовать лучшему пониманию данного описания.

Синтетические аспекты

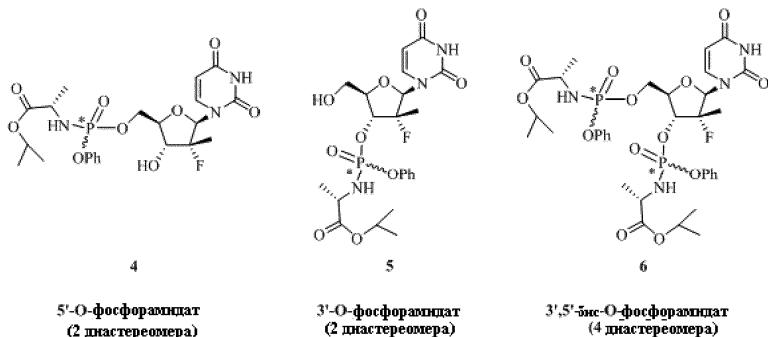
Для получения уридинового нуклеозида можно использовать преимущество усовершенствованного

трибензоилированного цитидинового промежуточного вещества в синтезе определенных 3',5'-диацилированных аналогов 3 (см. ниже), уже эффективно полученных на опытной установке (см. WO 2006/031725 или US 2006/0122146, обе из которых включены полностью в данную заявку путем ссылки). Следующий способ был найден масштабируемым и рентабельным.



3',5'-O-дibenzoил-2'-дезокси-2'-фтор-2'-С-метил-N⁴-бензоилцитидин (1) получали способом, описанным в WO 2006/031725 и WO 2008/045419, обе из которых полностью включены этим в данную заявку путем ссылки. 1 обрабатывали 70% водной уксусной кислотой с образованием 3',5'-O-дibenzoил-2'-дезокси-2'-фтор-2'-С-метил-уридина (2). Бензоильные сложные эфиры могут быть подвергнуты гидролизу при помощи ряда способов, а также, например, алcoxидами в спиртовом растворителе, например, метоксидом натрия в метаноле, карбонатом калия в метаноле, или аналогами этанола, алкиламинами, например, метиламином в метаноле, бутиламином и т.д. Метанольный аммоний был выбран ввиду большего масштаба. Уридиновый продукт (3) может быть очищен кристаллизацией с получением 70% выхода из трибензоилированного цитидина (1).

В многочисленной литературе подробно описаны различные маршруты и условия получения фосфорамидатов при помощи нескольких кратных эквивалентов реагентов. См., например, McGuigan et al. J. Med. Chem. 2005, 48, 3504-3515 и McGuigan et al. J. Med. Chem. 2006, 49, 7215. Для масштабирования процесса, в настоящее время существует только один известный пример, описанный в Lehsten et al., Org. Process Res. Dev. 2002, 6, 819-822 ("Lehsten"). В данной ссылке, авторы вводят концепцию "одностадийной процедуры", в которой гидрохлоридная соль аминокислоты и фенилдихлорфосфат реагируют вместе с N-метилимидазолом в дихлорметане. Далее добавляют нуклеозид с образованием целевого 5'-О-фосфорамиданого продукта, который в данном случае может приводить к получению соединения, представленного формулой 4. К сожалению, процедура Lehsten имеет недостатки. Например, процедура Lehsten использует гораздо больший избыток реагентов, чем это требуется, что добавляет затраты и трудности при хроматографической очистке. Дополнительно, Lehsten предложил, что можно контролировать селективность реакции при 5'-гидроксиле, а не при 3'-гидроксиле по сравнению с литературной ссылкой, посредством использования более низких температур и медленного добавления нуклеозида.



Используя процедуру Lehsten для соединения, описанного в данной заявке, обеспечено от приблизительно 1-5% монозамещенных 3'-O-фосфорамидатных диастереомеров (5) до приблизительно 10-30% бис-замещенного продукта (6). Поскольку полярность 3'- диастереомеров была очень похожа с полярностью целевых 5'-диастереомеров (4), хроматографическое разделение было крайне проблематичным. Масштабирование процесса было практически невозможным без отбрасывания существенной части менее полярных 5'-диастереомеров (4) или принимая более высокий уровень загрязнения 3'-диастереомеров (5). В изначальном 50 говом масштабировании, полученный в результате продукт содержал загрязнение 3'-диастереомера (5), составляющее приблизительно 3%, которое совместно элюировало с менее полярным 5'-диастереомером (4).

В данной заявке описаны условия реакции, использующие меньшие количества реагентов, и способ селективного устранения примеси 3'-O-фосфорамидатных диастереомеров (5) с более легким хроматографическим разделением, таким образом, получая целевые 5'-O-фосфорамидатные диастереомеры с гораздо более высокой степенью чистоты (4).

Для стехиометрии реагентов, было проведено исследование, в котором стехиометрия реагентов была систематически изменена и результаты контролировали при помощи ЯМР на ядрах фосфора неочищенной реакционной смеси, как было сообщено Lehsten. В более успешных реализациях, сравнивали выход выделенного продукта и чистоту целевого продукта. Наблюдали, что первичный 5'-гидроксил реагирует с более высокой скоростью, чем вторичный 3'-гидроксил. Это создает конкурирующую ситуацию между ходом реакции с расходованием всего исходного нуклеозида и превращения 5'- и 3'-моно-

замещенных продуктов (4 и 5) в 5',3'-бис замещенные продукты (6). 3'-монозамещенный продукт превращается в бис-продукт при более высокой скорости, чем 5'-монозамещенный продукт, так что возможно уменьшить уровень загрязнения 3'-диастереомером путем подталкивания реакции в образованию большего количества бис-замещенных продуктов. Однако, при эффективном способе удаления 3'-диастереомеров, реакция может быть оптимизирована для получения большего количества целевого 5'-диастереомера, без потребности в потере того количества 5'-диастереомера. Который превращается в бис-замещенный (6). Также наблюдали, что гидрохлорид аминокислоты является крайне гигроскопичным. Поскольку любая присутствующая вода будет загрязнять эквивалентное количество фенилдихлорфосфатного реагента, необходимо уделить внимание тому, чтобы аминокислота была существенно безводной, либо ее нужно сделать существенно безводной перед применением. Кратко, Lehsten сообщил, что оптимальное соотношение аминокислоты и фенилдихлорфосфата и нуклеозида составляет 3,5:2,5:1, соответственно. Было найдено, что оптимальное соотношение аминокислоты и фенилдихлорфосфата и нуклеозида, составляющее приблизительно 1,6 к приблизительно 1,3 к приблизительно 1, является оптимальным в условиях, в которых 3'-диастереомер может быть эффективно удален, и в которых гидрохлорид аминокислоты является существенно безводным. Путем применения меньшего количества реагентов, достигают экономии средств наряду с упрощением хроматографического разделения целевого продукта от побочных продуктов реагента и от уменьшенного уровня бис-диастереомеров.

В одной альтернативной процедуре, 3'-гидроксиблокированное производное 3 получали с использованием трет-бутилдиметилсилил блокирующей группы, в две стадии. Затем его превращали в его 5'-фосфорамидатное производное. Целью являлось, чтобы сильная группа могла быть затем удалена и не существовало 3' изомеров (5) или 3',5'-бис-фосфорамидатов (6). Аналогичный подход был продемонстрирован Borch and Fries (патент США 5,233,031) с низким общим выходом алкилфосфорамидата.

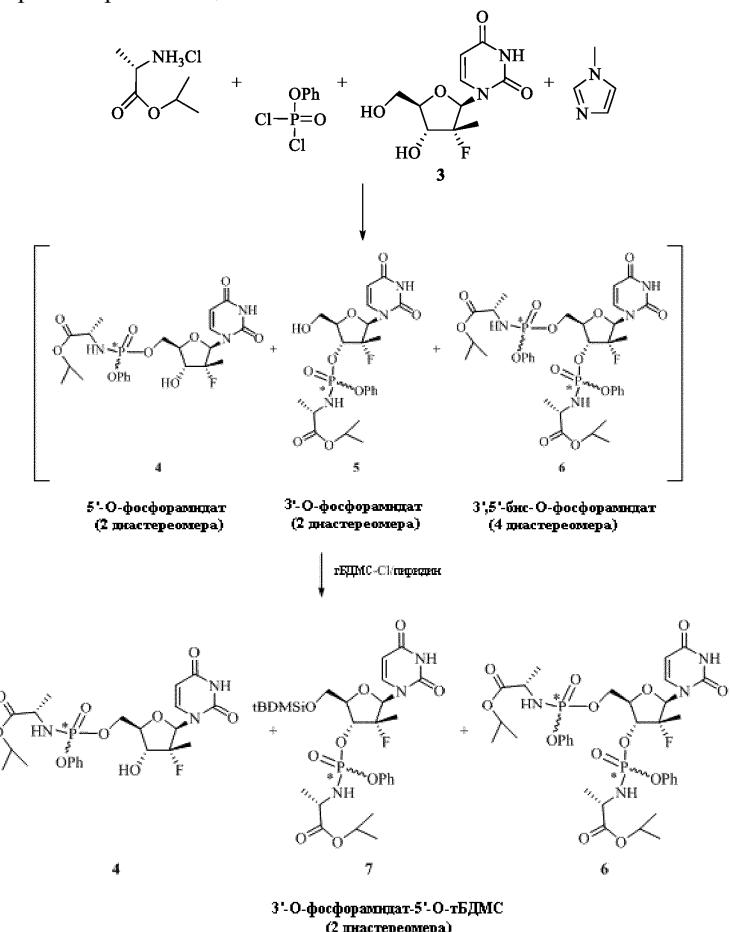
Другим альтернативным подходом было использование прямого синтеза и затем химии для того, чтобы способствовать дифференциации 3'-диастереомерных примесей 5 от целевых 5'-диастереомеров 4 для того, чтобы способствовать разделению. Целевой являлась группа, которая могла селективно реагировать со свободным первичным гидроксилом 3'-О-фосфорамидатной примеси 5 по сравнению с вторичным гидроксилом целевого 5'-О-фосфорамидата 4. Также было желательным, чтобы блокирующая группа значительно изменяла полярность полученного в результате 5'-О-блокированного 3'-О-фосфорамидатного продукта от целевого 5'-О-фосфорамидата 4. Отсутствовала дополнительная стадия, необходимая для удаления блокирующей группы, поскольку целевые 5'-диастереомеры 4 не были изменены. Химически измененные 3'-диастереомеры затем могли позволить более легкое хроматографическое разделение или разделение при помощи специальных улавливающих подложек или экстракций.

Конкретно, блокирующая группа - трет-бутилдиметилсилил (тБДМС)-соответствует данным критериям и была первой. Которую продемонстрировали и затем использовали в многокилоговом масштабе. В определенных условиях, например в пиридине в качестве растворителя и основания, тБДМС группа реагирует с высокой селективностью в первичном гидроксильном положении по сравнению с 3' вторичным гидроксильным положением. Фосфорамидатная реакция использует N-метилимидазо (NMН) в качестве основания. В присутствии NMН, силирование является менее селективным. Преимущественно, количество NMН должно быть уменьшено. Этого можно легко достичь после фосфорамидатной реакции путем промывания реакционного раствора 1N соляной кислотой. NMН и оставшийся исходный нуклеозид удаляют, оставляя неочищенную смесь моно и бис замещенных продуктов и побочных продуктов реагентов. Ее затем растворяют в пиридине и обрабатывают трет-бутилдиметилсилил хлоридом. 3'-монозамещенный продукт 5 превращают за несколько ч или менее в 5'-О-тБДМС-3'-О-фосфорамидат 7. Ход реакции можно контролировать при помощи ВЭЖХ. Полярность такого силированного продукта 7 является меньшей, чем у бис-фосфорамидата 6 и его легко удалять при помощи хроматографии. При помощи данного способа, было возможным уменьшить уровень 3'-монофосфорамидата 5 до менее, чем 0,1% 5'-продукта 4 по сравнению с 1-3% без сильной обработки. Аналогично, обработка диметокситиофенилметилхлоридом (ДМТ-С1) при аналогичных условиях была такой же успешной. Также было легче идентифицировать продукт ДМТ реакции при помощи ТСХ, поскольку ДМТ, содержащий молекулы, окрашивает в ярко-оранжевый при нагревании или воздействии кислоты. Можно также предположить многие другие блокирующие группы, как отмечено выше.

Как условия реакции, так и удаление 3'-примеси, являются общими способами и могут быть применены к большинству нуклеозидных фосфорамидатов со свободным 3' гидроксилом. Фосфорамидатный фрагмент может быть любой комбинацией сложного эфира аминокислоты и ароматического спирта. Нуклеозидным фрагментом может быть любой нуклеозид, в котором 5' фосфорамидат может привести к 5'-монофосфату и может дополнительно метаболизировать в 5'-трифосфатную форму.

Следующая схема является основной схемой реакции, проиллюстрированной для получения изопропил L-аланатфенилфосфорамидата 2'-дезокси-2'-фтор-2'-С-метилуридуна с основным продуктом, в виде целевого 5'-О-фосфорамидата (4, два диастереомера) и побочного продукта, в виде 3'-О-фосфорамидата (5, два диастереомера) и 3',5'-бис-О-фосфорамидат (6, четыре диастереомера). Реагент добавляют в стехиометрических соотношениях, как описано в разделе "Способ получения". Реакции позволяли проходить до того, как осталось приблизительно 5% исходного материала, по данным УФ визуализа-

ции тонкослойной хроматографии (ТСХ). Также СЭЖХ/MS показало, что было образовано приблизительно 10% 3',5'-бис-фосфорамидата 6 по сравнению с целевым 5'-продуктом. После гашения и обработки водным кислым раствором, неочищенный остаток из органического слоя получали для силилирования. В описанных условиях реакции, сильная группа преимущественно реагировала со свободным 5'-гидроксилом 3'-О-фосфорамидатом с образованием 7. Реакцию продолжали, пока 3'-О-фосфорамидат больше не был детектирован при помощи СЭЖХ/MS.



После выделения из реакции силилирования, целевой продукт подвергают хроматографии на силикагеле и элюируют с градиентом метанола в дихлорметане (1-4%). Целевой 5'-монофосфорамидат 4 элюирует последним.

Способ получения

Пример 1. Получение 2'-дезокси-2'-фтор-2'-С-метилуридина (3).

В 10-литровую колбу, добавляли 3', 5'-О-дибензоил-2'-дезокси-2'-фтор-2'-С-метил- N^4 -бензоилцитидина (500 г, 0,874 моль) и 70% водную уксусную кислоту (7,5 л). Раствор нагревали до возврата флегмы (110°C) в течение 20 ч. ТСХ указывала на завершение реакции (фактор ретенции 0,6 в 5% метаноле в дихлорметане (ДХМ)). Смесь охлаждали до температуры окружающей среды и разбавляли водой (2 л). После перемешивания в течение 2 ч, полученный в результате осадок собирали путем фильтрования и твердое вещество промывали водой (5 л) и сушили на открытом воздухе при температуре окружающей среды в течение 12 ч с получением 360 г (88%). Данное дибензоилуридиноное промежуточное вещество использовали непосредственно в следующей стадии путем добавления его всего к свежеполученному метанольному аммонию (5,4 л, прибл. 25%) при 0°C. Данную температуру поддерживали в течение 3 ч и затем позволяли нагреваться до 15°C в течение 24 ч. ТСХ указывала на завершение реакции (фактор ретенции 0,4 в 10% метаноле в ДХМ). Реакционную смесь фильтровали через целинную подложку и концентрировали при сниженном давлении с получением неочищенного продукта (216 г). Неочищенный продукт перемешивали с этилацетатом (325 мл) в течение 3 ч при температуре окружающей среды. Полученное в результате собирали путем фильтрования и промывали этилацетатом (216 мл). Твердое вещество высушивали в вакууме при температуре окружающей среды в течение 4 ч с получением 160 г (78%) целевого продукта с 98,7% ВЭЖХ чистоты. ^1H -ЯМР (DMSO-d_6) δ 11,44 (br s, 1H, NH), 7,95 (d, 1H, C-6H), 5,97 (d, 1H, C-1'H), 5,64 (d, 1H, C-5H), 3,84-3,77 (m, 3H, C-5'-Na, C-3'H, C-4'H), 3,63-3,60 (m, 1H, C5'-Hb), 1,23 (d, 3H, C-2'-CH₃). ES-MS (масс-спектрометрия с электрораспылением) M-1 259,

Пример 2. Получение изопропильного эфира (S)-2-{{[(1R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2Н-пиrimидин-1-ил)-4-(R)-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-илметокси]фенокси}фосфорилами-

но} пропионовой кислоты (4).

Синоним: диастереоизомерная смесь 5'-O-(изопропил-L-аланат, фенил фосфорамидил)-2'-дезокси-2'-фтор-2'-C-метилуридуина.

3-х горную колбу на 5 л оснащали механической мешалкой, солевой ледяной баней, внутренним термометром, и атмосферой азота. В колбу загружали гидрохлорид L-аланин изопропиловый сложный эфир (82,0 г, 0,490 моль) и безводный дихлорметан (0,80 л). При перемешивании, фенил дихлорфосфат (85,0 г, 0,40 моль) добавляли одной партией и перемешивали. При поддержании внутренней температуры от -5 до 5°C, раствор N-метилимидазола (NMH, 250 г, 3,07 моль) в дихлорметане (250 мл) добавляли в течение периода, составляющего полчаса. Раствору позволяли перемешиваться в течение 1 ч в данном температурном диапазоне. 2'-Дезокси-2'-фтор-2'-C-метилуридин (3, 80,0 г, 0,307 моль) добавляли при 0°C одной порцией, а затем реакционную колбу медленно нагревали на солевой бане. Через 1 ч, внутреннюю температуру поднимали до -2°C. TCX (5% метанола в ДХМ) через 1 ч показало, что было израсходовано более, чем 50% нуклеозида. Баню удаляли и реакционная колба достигала температуры окружающей среды через еще 1 ч. TCX через 3 ч и через 5 ч в общем показали, что было израсходовано 95% исходного нуклеозида. Реакционную смесь гасили путем добавления метанола (100 мл) и перемешивания реакционной смеси в течение 5 мин.

Реакционную смесь промывали 1N HCl (2×500 мл) с последующим промыванием насыщенным раствором бикарбоната натрия (2×500 мл). Отделенный органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия (50 г) и фильтровали. Раствор испаряли при сниженном давлении и затем в высоком вакууме до сухого остатка с получением неочищенного продукта в виде вязкого масла (170 г). Регистрировали ЯМР спектры неочищенного продукта (^{31}P и ^1H). ^{31}P -ЯМР указывал на то, что приблизительно 1% общей интеграции фосфора происходило из-за присутствия 3' изомера 5.

К неочищенному продукту добавляли безводный пиридин (1700 мл). Растворитель испаряли при сниженном давлении и затем в высоком вакууме для уменьшения содержания воды неочищенной смеси посредством совместного испарения. Полученное в результате масло повторно растворяли в безводном пиридине (500 мл) и затем добавляли избыток трет-бутилдиметилсилил хлорида (9,0 г, 60 мМ). Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Ход реакции контролировали при помощи СЭЖХ/MS. Через 3 ч, 3' примесь 5 не могла быть более детектирована и реакцию гасили путем добавления метанола (50 мл).

Реакционную смесь испаряли при сниженном давлении до масла. Остаток растворяли в этилацетате (1,5 л) и промывали 1N HCl (2×500 мл), с последующим промыванием насыщенным раствором бикарбоната натрия (2×500 мл). Органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия (50 г), фильтровали и испаряли при сниженном давлении с получением неочищенного продукта в виде бледно-желтого масла.

Неочищенное масло разбавляли тем же самым объемом дихлорметана и загружали на 2,5 кг силикагелевый картридж при радиальном модуле компрессии 100 psi давления воздуха. При помощи градиентного насоса при 60 psi и скорости потока 400 мл/мин, картридж промывали метиленхлоридом (4 л) с последующим градиентом 1-4% метанола в метиленхлориде (48 л). Большую часть основных примесей (ди-(изопропилаланил)фенил фосфат, 3',5'-бис фосфорамидат (6), 3'-фосфорамидат-5'-трет-бутилдиметилсилильный аддукт (7)) элюировали с ~3% градиентом. Целевой продукт элюировали 3-4% метанолом. Продукт, содержащий фракции, сортировали на две партии. Первая содержала небольшие количества высших примесей, а вторая представляла собой чистый продукт. Первый набор фракций содержал небольшие количества менее полярных примесей (высшие примеси), таких, как 3',5'-бис фосфорамидат и ди-аланилфенил фосфат и главным образом R_p диастереомер, и требовала второй колоночной очистки. (Относительная терминология, высший по сравнению с низшим, относится к элюированию нормальнофазной силикагелевой хроматографией, где "высший изомер" означает первый элюирующий изомер.) Второй набор фракций не содержал значительного количества примесей - только остаток R_p и главным образом S_p диастереомеры. Его позднее снова соединяли с дважды разделенными на колонке фракциями. Растворитель испаряли при сниженном давлении и полученную в результате белую пену подвергали дополнительной сушке (0,20 мм Hg) в течение 1 ч с получением 42 г партии примесей (4:1 высшего изомера относительно низшего, исходя из ^{31}P -ЯМР) и 38 г партии чистого продукта (1:3 высшего изомера относительно низшего). Партию примесей снова пропускали через колонку аналогичным образом с получением 3,8 г 97% чистого высшего изомера (отбросив фракцию) и 36 г чистого продукта в соотношении 4:1. Две основные партии растворяли в ДХМ, соединяли, испаряли при сниженному давлению и сушили (50°C, 0,2 мм Hg, 24 ч) с получением 74 г (45,7%) чистого продукта 4 с соотношением диастереомеров 48: 51, в виде белой пены, температура плавления приблизительно 75-85°C.

Для получения аморфного твердого вещества диастереомерной смеси, 74 г белой пены перемешивали с трет-бутилметиловым простым эфиром (750 мл), с получением в результате частичного раствора и смолистого твердого остатка. При перемешивании, медленно добавляли гептан (750 мл) и суспензию механически перемешивали в течение 1 ч до превращения большей части смолы в белое твердое вещество. Твердое вещество соскребали шпателем и полученную в результате суспензию фильтровали. Твердое

вещество промывали гептаном (4×50 мл) и сушили в вакууме (50°C , $0,2$ мм Hg, 24 ч) с получением белого аморфного порошка (64 г) с широким интервалом температур плавления, составляющим прибл. 70 - 80°C . ^1H и ^{31}P ЯМР подтвердили структуру и ВЭЖХ показал чистоту, составляющую 99,8% с диастереомерным соотношением 46:54 (также подтверждено при помощи ^{31}P ЯМР).

Альтернативный способ получения твердой смеси 4. После хроматографии, остаток совместно испаряли дихлорметаном дважды (5 мл/г) и сушили в течение 24 ч при 35 - 40°C при 35 - 45 мТорр. Пенный остаток просеивали через 250 микронный экран и подвергали дополнительной осушке при аналогичных условиях пока содержание остаточного дихлорметана не падало ниже 400 ppm согласно измерениям при помощи парофазной газовой хроматографии. Полученный в результате мелкодисперсный сероватобелый и белый аморфный порошок имел диапазон температур стеклования, составляющий $53,7$ - $63,5^\circ\text{C}$.

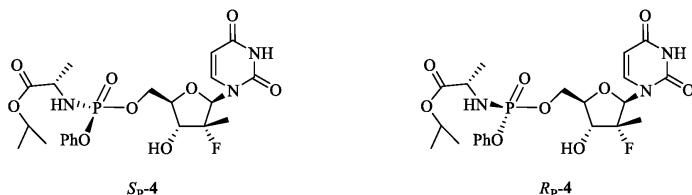
Характеристика смеси изомеров (4): ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 10,05 (br s, 1H, NH, S_p), 10,00 (br s, 1H, NH, R_p), 7,49 (d, 1H, C6-H, S_p), 7,36 (m, 5H, C6-H, R_p , ароматика), 7,23-7,14 (m, 6H, R_p/S_p , ароматика), 6,18 (br d, 2H, C1'-H, R_p/S_p), 5,63 (d, 1H, C5-H, S_p), 5,58 (d, 1H, C5-H, R_p), 5,01 (m, 2H, CH-(CH₃)₂, R_p/S_p), 4,46-4,33 (m, 8H, C-5'-H₂, ala-NH, C3'-OH, R_p/S_p), 4,12 (m, 2 H, ala-CH-CH₃, R_p/S_p), 4,01-3,85 (m, 4H, C3'-H, C4'-H, R_p/S_p), 1,39-1,22 (m, 12H, все CH₃, R_p/S_p).

^{31}P -ЯМР (CDCl_3) δ 3,60 (R_p), 3,20 S_p относительно трифенилfosфата при $-17,80$ ppm. ES-MS M+1 530,2. Элементный анализ: Рассчитано% (включая 0,29% воды, как найдено при помощи анализа по Карлу Фишеру) C, 49,75; H, 5,54; N, 7,90, F, 3,58, P, 5,84, Найдено%: C, 49,50; H, 5,44; N, 7,85; F, 3,62; P, 6,05.

Обсуждение разделения изомеров

Соединение 4 ввиду хиральности на атоме фосфора состоит из двух диастереомеров, обозначенных как S_p -4 и R_p -4. Стереохимическое распределение выполняли, исходя из монокристаллического рентгеноструктурного анализа S_p -4. Как R_p -4, так и S_p -4 давали кристаллический продукт.

Процедуры кристаллизации описаны ниже.



Пример 3. Кристаллизация R_p -4 изомера.

Подвергнутую хроматографии фракцию, содержащую первое элюирование, менее полярный R_p -4 изомер (3,8 г, 97% чистоты) растворяли в изопропаноле (36 г) и разбавляли гептаном до помутнения (72 г). В раствор вводили затравку и перемешивали при температуре окружающей среды в течение 5 ч. Полученное в результате собирали путем фильтрования в вакууме, промывали гептаном (2×20 мл) и сушили (50°C , $0,2$ мм, 24 ч) до получения 2,3 г очень мелких белых игл с температурой плавления $136,2$ - $137,8^\circ\text{C}$. ВЭЖХ чистота полученного в результате вещества, как было найдено, составляла 99,02%.

R_p -4: ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 9,10 (br s, 1H, NH), 7,36 (m, 2H, о-ароматика), 7,26-7,16 (m, 4 H, C6-H, м,п-ароматика), 6,16 (br d, 1H, C1'-H), 5,58 (d, 1H, C5-H), 5,01 (sept, 1H, CH-(CH₃)₂), 4,52-4,47 (m, 2H, C-5'-H₂), 4,10 (d, 1H, C3'-H), 4,02-3,76 (m, 4H, ala-NH, C3'-OH, C4'-H, ala-CH-CH₃), 1,37-1,20 (m, 12H, все CH₃).

Пример 4. Получение и кристаллизация S_p -4.

Способ 1. Непосредственное осаждение из неочищенного 4.

В перемешанный раствор гидрохлорида L-аланин изопропилового сложного эфира (10,5 г, 61,5 ммоль, азеотропно высущенный, дважды, 50 мл толуола каждый раз) в дихлорметане (100 мл) добавляли фенидихлорфосфат (7,5 мл, 50 ммоль) при комнатной температуре. Смесь охлаждали до -10°C и затем добавляли раствор NMН (30,5 мл, 384,3ммоль) в 30 мл дихлорметана в течение периода, составляющего 30 мин. После завершения добавления, смесь перемешивали при от -10 до -15°C в течение 1 ч. К указанной выше смеси добавляли 2'-дезокси-2'-фтор-2'-C-метилуридин (3) (10 г, 38,4ммоль) одной партией и смесь перемешивали при менее -10°C в течение 3 ч и затем медленно позволяли нагреваться до 20°C (6 ч). Смесь перемешивали при данной температуре всю ночь(15 ч) и затем гасили 10 мл метанола. Растворитель испаряли и остаток повторно растворяли в EtOAc (200 мл). EtOAc слой промывали водой (100 мл), 1N HCl (3×75 мл), 2% водным раствором NaHCO₃ (50 мл) и солевым раствором (50 мл). Органический слой высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток высушивали в высоком вакууме в течение 2 ч с получением белой пены (22 г).

Указанную выше пену растворяли в 33 мл ДХМ и затем добавляли 65 мл ИПЭ (изопропилового простого эфира) с получением насыщенного раствора. Раствор фильтровали через небольшой слой целита и фильтрат перемешивали с S_p -4 затравкой в течение 72 ч при температуре окружающей среды (приблизительно 22°C - отметьте, что охлаждение суспензии до 0°C приводило до замасливания неочищенного продукта). Белое твердое вещество фильтровали, промывали ИПЭ (20 мл) и сушили с получением 4,58 г (~85:15 смесь S_p -4: R_p -4 соответственно как определено при помощи ^{31}P ЯМР) белого порошка. Указанное выше твердое вещество суспендировали в 23 мл ДХМ и затем кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры и перемешивали в течение 15 ч.

Белое твердое вещество фильтровали, промывали 4,5 мл холодного ДХМ и сушили в высоком вакууме при 45°C с получением неочищенного Sp-4, температура плавления 93,9-104,7°C, ВЭЖХ чистоты 99,74% (3,11 г, 15,2% из уридинового нуклеозида).

Sp-4 ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 8,63 (br s, 1H, NH), 7,47 (d, 1H, C6-H), 7,30 (m, 2H, о-ароматика), 7,26-7,18 (m, 3H, м,п-ароматика), 6,18 (br d, 1H, C1'-H), 5,70 (d, 1H, C5-H), 5,02 (sept, CH-(CH₃)₂), 4,53 (m, 2H, C-5'-H₂), 4,11 (d, 1H, C3'-H), 3,97 (m, 3H, C3'-ОН, C4'-H, ala-CH-CH₃), 3,77 (br s, 1H, ala-NH), 1,39 (d, 3H, C2'-CH₃), 1,37 (d, 3H, ala-CH₃), 1,24 (d, 6H, CH-(CH₃)₂).

Способ 2. Вымасливание из неочищенного 4.

В перемешанный раствор гидрохлорида L-аланин изопропилового сложного эфира (20,6г, 123 ммоль, азеотропно высущенный, дважды, 75 мл толуола каждый раз) в дихлорметане (200 мл) добавляли фенидихлорфосфат (14,9 мл, 100 ммоль) при комнатной температуре. Смесь охлаждали до -10°C и затем добавляли раствор NMН (61,3 мл, 769 ммоль) в 60 мл дихлорметана в течение периода, составляющего 30 мин. После завершения добавления, смесь перемешивали при от -10°C до -15°C в течение 1 ч. К указанной выше смеси добавляли 2'-дезокси-2'-фтор-2'-С-метилуридин (3) (20 г, 76,9 ммоль) одной партией и смесь перемешивали при менее -10°C в течение 3 ч и затем медленно позволяли нагреваться до 20°C (6 ч). Смесь перемешивали при данной температуре всю ночь (15 ч) и затем гасили 10 мл метанола. Растворитель испаряли и остаток повторно растворяли в EtOAc (400 мл). EtOAc слой промывали водой (200мл), 1N HCl (3×100 мл), 2% водным раствором NaHCO₃ (100 мл) и солевым раствором (50мл). Органический слой высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток высушивали в высоком вакууме в течение 2 ч с получением белой пены (43 г). Указанную выше пену растворяли в 86 мл EtOAc в двухгорлой круглодонной колбе, оснащенной механической мешалкой. При перемешивании, медленно добавляли 100 мл гептана и перемешивали суспензию в течение 1 ч. Верхний слой деканттировали и остаток снова перемешивали с 50 мл 2:3 EtOAc/гептанового растворов в течение 10 мин и затем деканттировали. Остаток высушивали в высоком вакууме с получением белой пены (31 г).

Указанную выше пену растворяли в 46 мл ДХМ и затем добавляли 95 мл ИПЭ с получением насыщенного раствора. Раствор фильтровали через небольшой слой целита и фильтрат перемешивали с затравкой Sp-4 в течение 72 ч при температуре окружающей среды. Белое твердое вещество фильтровали, промывали ИПЭ (30 мл) и сушили с получением 7,33 г (~85:15 смесь Sp-4 : R_p-4 соответственно, как определено при помощи ^{31}P ЯМР) белого порошка. Указанное выше твердое вещество суспендировали в 36 мл ДХМ и затем кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры и перемешивали в течение 15 ч.

Белое твердое вещество фильтровали, промывали 7,5 мл холодного ДХМ и сушили в высоком вакууме при 45°C с получением >99% чистого Sp-4, (4,78 г, 11,6% из уридинового нуклеозида).

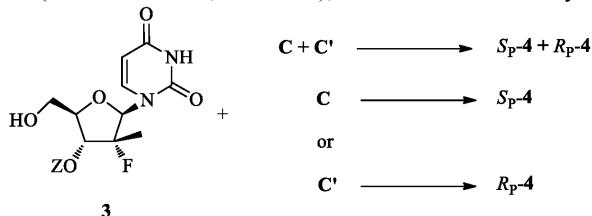
Способ 3. Загрузка силикагеля в неочищенный 4.

5,0 г неочищенного 4 получали аналогично смеси диастереомеров непосредственно перед стадией колоночной хроматографии, начиная с приблизительно 2,5 г 2'-дезокси-2'-фтор-2'-С-метилуридина (3). Неочищенный продукт растворяли в 10 мл ДХМ и в раствор добавляли 10 г силикагеля. Растворитель испаряли с получением сухой суспензии. Суспензию перемешивали с 40 мл 50% EtOAc/гексана в течение 15 мин и затем фильтровали. Силикагель промывали дополнительно 10 мл 50% EtOAc/гексана. Силикагель затем промывали 15% MeOH/ДХМ (100 мл) и собирали по отдельности. Растворитель испаряли и сушили в высоком вакууме с получением 4,0 г остатка (пены). Остаток растворяли в ДХМ (6 мл) и затем добавляли ~9мл ИПЭ с получением насыщенного раствора. Смесь затем осторожно перемешивали всю ночь с Sp-4 затравкой при температуре окружающей среды. Белое твердое вещество фильтровали и промывали ИПЭ (5 мл) с получением 1,28 г продукта. ^{31}P ЯМР выявил, что указанный выше продукт содержал 77:23 смесь Sp-4 : R_p-4 соответственно. Ее повторно кристаллизовали из 20 мл ДХМ с получением 0,75 г >99% чистого Sp-4 (приблизительно 12% из уридинового нуклеозида). Такое получение Sp-4 не требует стадии силилирования, которое производили для смеси, так что выше показана вся реакционная процедура. Аспекты для монокристаллической и полиморфной форм Sp-4 представлены ниже.

Способ 4. 40,0 г 1:1 смеси 4 растворяли в 90 мл дихлорметана. Диизопропиловый простой эфир (70 мл) добавляли в указанный выше раствор с получением насыщенного раствора, (количество диизопропилового простого эфира может варьироваться в зависимости от чистоты продукта.) В раствор вводили затравку неочищенного Sp-4 (>99%) и смесь осторожно перемешивали мешалкой при комнатной температуре в течение 20 ч (образование твердого вещества наблюдали через 2 ч). Твердое вещество фильтровали, промывали 40 мл смеси диизопропилового простого эфира/дихлорметана (1:1) и сушили с получением белого твердого вещества (16,6 г, 89,35% чистого Sp-4 по данным ЯМР). Данное твердое вещество суспендировали в 83 мл дихлорметана и кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч. Суспензию охлаждали до комнатной температуры и перемешивали всю ночь. Твердое вещество фильтровали и промывали 10мл холодного ДХМ. Твердое вещество высушивали в вакууме с получением Sp-4 (13,1 г, 99,48% чистоты по данным ВЭЖХ). 11 г данного твердого вещества повторно растворяли в 330 мл ДХМ в горячих условиях. Раствор охлаждали до комнатной температуры и оставляли при данной температуре всю ночь. Кристаллический продукт фильтровали и сушили с получением 10,5 г Sp-4 (99,74% по данным

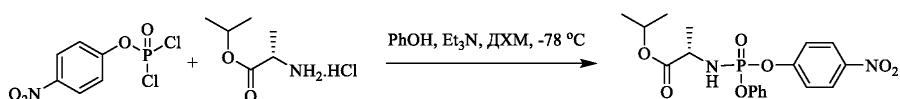
ВЭЖХ).

Соединения $S_p\text{-}4$ и $R_p\text{-}4$ могут быть получены альтернативно, в соответствии с девятым или десятым вариантом воплощения, путем реакции нуклеозида (защищенного или незащищенным) 3 с изопропил-аланил-фосфорамидатом (смесь C and C', C или C'), как показано в следующем уравнении.



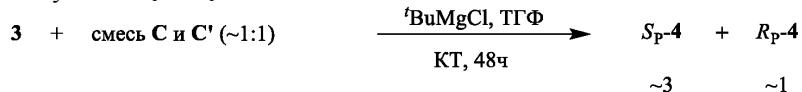
P.D. Howes et al. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 2003, Vol. 22, Nos. 5-8, pp. 687-689 ("Howes") описывает 2'- и 5'-фосфорамиидаты, полученные реакцией с трет-бутилмагний хлоридом. В данной статье, Howes описывает, что если 3'-дезокси-цитидиновый нуклеозид реагирует с метиловым эфиром (S)-2-[хлор-фенокси-фосфориламино] пропионовой кислотой в присутствии 1,2 эквивалентов трет-бутилмагний хлорида, происходит селективное фосфорилирование в 2'-положении, но с дополнительными эквивалентами трет-бутилмагний хлорида происходит селективное фосфорилирование в 5'-положении. Данное описание должно противоречить с тем, что описано в схеме 1,

Пример 5-1. Получение изопропилового эфира (S)-2-[(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино] пропионовой кислоты



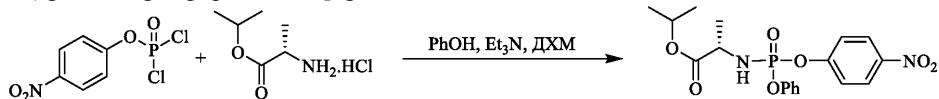
В перемешанный раствор 4-нитрофенил фосфордихлорида (12,8 г, 50 ммоль) в дихлорметане (100 мл) добавляли раствор фенола и треэтиламина (7,7 мл, 55 ммоль) в дихлорметане (100 мл) при -78°C в течение периода, составляющего 20 мин. Смесь перемешивали при данной температуре в течение 30 мин и затем переносили в другую круглодонную колбу, содержащую гидрохлорид L-аланин изопропилового сложного эфира (8,38 г, 50 ммоль) в дихлорметане (100 мл) при 0°C. В смесь добавляли вторую порцию триэтиламина (14,6 мл, 105 ммоль) в течение периода, составляющего 15 мин. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и затем растворитель испаряли. Остаток растирали в порошок с этилацетатом (150 мл) и белое твердое вещество отфильтровывали. Фильтрат концентрировали при сниженном давлении с получением бледно-желтого масла. Неочищенное масло хроматографировали при помощи 0-20% этил ацетат/гексановым градиентом с получением продукта (17 г, 83% выход) в виде смеси диастереомеров в соотношении приблизительно 1:1. ³¹P ЯМР (162 МГц, DMSO-d₆): δ -0,31, -0,47; ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 8,31-8,27 (m, 2H), 7,51-7,37(m, 4H), 7,27-7,19(m, 3H), 6,70-6,63(m, 1H), 4,85-4,78(m, 1H), 3,97-3,86(m, 1H), 1,21-1,19(m, 3H), 1,11-1,09 (m, 6H); Масс-спектрометрия (электроспрей ионизация) m/z 407 (M-1)⁺ ³¹P ЯМР (162 МГц, CDCl₃): δ -2,05,-2,10; ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 8,22 (d, J = 9,2Гц, 2H), 7,41-7,33(m, 4H), 7,26-7,18 (m, 3H), 5,05-4,96 (m, 1H), 4,14-4,05 (m, 1H), 3,93-3,88(m, 1H), 1,38(d, J = 6,8Гц, 3H), 1,22 (dd, J = 6,2 & 3,0Гц, 6H); Масс-спектрометрия (электроспрей ионизация) m/z 407 (M-1)⁺.

Пример 5-2. Получение $S_p\text{-}4/R_p\text{-}4$



В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидро-фуран-2-ил)-1 Н-пиримидин-2,4-диона (130 мг, 0,5 ммоль) в сухом ТГФ (1,5мл) добавляли 1,0М раствор трет-бутилмагний хлорида (1,05 мл, 1,05 ммоль, 2,1 эквив.) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 5 мин. Через 30 мин раствор изопропилового эфира (S)-2-[(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино] пропионовой кислоты (1:1 смесь изомеров, 408 мг, 1 ммоль) в ТГФ (1,5мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 5 мин. Смеси позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 48 ч и затем гасили насыщенным водным раствором NH₄Cl (20 мл). Смесь разделяли на фракции между этилацетатом (50 мл) и водой (20 мл). Соединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при сниженном давлении с получением бледно-желтого остатка. Колоночная хроматография остатка при помощи 0-2% MeOH/дихлорметанового градиента приводила к получению белого пенного твердого вещества (125 мг, 47% выход, смесь $S_p\text{-}4/R_p\text{-}4$ в соотношении приблизительно 3,05:1,0).

Пример 6. Получение и нехроматографическое выделение изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты



Гидрохлорид L-аланин изопропилового сложного эфира (330 г, 1,97 моль) предварительно высушивали путем совместного испарения с толуолом (2×400 мл) при сниженном давлении и затем высушивали в вакуумной печи (50°C , 0,2 мм Hg, 17 ч). В перемешанный раствор 4-нитрофенил фосфордихлоридата (500,0 г, 1,953 моль) в безводном дихлорметане (3,0 л) добавляли раствор фенола (183,8 г, 1,953 моль) и триэтиламина (300 мл, 2,15 моль) в дихлорметане (900 мл) при -60°C внутренней температуре в течение периода, составляющего 3 ч. Смесь перемешивали при данной температуре в течение еще 30 мин и затем позволяли нагреваться до -5°C в течение 2,5 ч. Предварительно высушенный эфир аминокислоты добавляли при $-5\sim0^{\circ}\text{C}$ в атмосфере азота в течение 10 мин. Остаток соли аминоэфира в дополнительной колбе переносили в реакционную смесь посредством вымывания дихлорметаном (2×100 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 40 мин и вторую порцию триэтиламина (571 мл, 4,10 моль) добавляли в течение периода, составляющего 40 мин при 0°C . Смесь перемешивали при $0\sim10^{\circ}\text{C}$ в течение 3 ч и затем белое твердое вещество (триэтиламин гидрохлорид) отфильтровывали и промывали дихлорметаном (3×300 мл). Фильтрат концентрировали при сниженном давлении и остаток растирали в порошок метил трет-бутиловым простым эфиром (МТБЭ, 4 л). Дополнительную твердую соль, полученную таким образом, отфильтровывали и промывали МТБЭ (3×150 мл). Фильтрат концентрировали при сниженному давлению с получением прозрачного светло-коричневого масла. Остаток совместно испаряли с гексаном (2×140 мл) для удаления любого остаточного МТБЭ и подвергали дополнительной осушке в вакууме при 40°C в течение 2 ч. Сухой остаток смешивали с дизопропиловым простым эфиром (ИПЭ, 1,1 л) и перемешивали при 5°C на водно-ледяной бане. Небольшое количество кристаллической затравки целевого S_P -изомерного продукта добавляли к раствору и смесь перемешивали при 5°C в течение более 22 ч с образованием средне-густой суспензии. Ей позволяли отстаиваться в камере замораживания (-10°C) в течение 44 ч. Осажденный продукт собирали посредством фильтрования и промывали предварительно охлажденной смесью растворителей ИПЭ и гексана (1:1, 3×190 мл). Твердое вещество высушивали в вакууме (0,5 мм Hg) при температуре окружающей среды до достижения постоянной массы с получением 227,23 г (выход: 28,5%) в виде белого порошкообразного твердого вещества. Соотношение двух диастереомеров $S_P:R_P$ составляло 9,65/1, исходя из данных ^{31}P ЯМР (162 МГц, ДМСО- d_6 , δ -0,31 (S_P), -0,47). Продукт повторно кристаллизовали путем растворения в ИПЭ (840 мл) при нагревании в 60°C бане. Указанный выше раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем добавляли небольшое количество кристаллической затравки S_P изомера. Белое порошкообразное твердое вещество образовалось в течение 2 ч и колбу хранили в камере замораживания (-10°C) в течение 16 ч. Полученное белое и мелкодисперсное кристаллическое вещество фильтровали, промывали предварительно охлажденным ИПЭ (3×50 мл) и сушили в вакууме (температура окружающей среды, 0,5 мм Hg) до постоянной массы с получением белого рыхлого твердого вещества (177,7 г, 22% общий выход или 44% общий выход, исходя из теоретического выхода S_P изомера) при соотношении диастереомеров 48/1, исходя из данных Р-ЯМР. Температура плавления $62\sim66^{\circ}\text{C}$.

^{31}P ЯМР (162 МГц, ДМСО- d_6): δ -0,31; ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,49(d, $J=8,8\text{ Гц}$, 2H), 7,41-7,37(m, 2H), 7,23-7,19 (m, 3H), 6,66 (dd, $J=13,6, 10,0\text{ Гц}$, 1H), 4,86-4,78 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,19 (d, $J=7,2\text{ Гц}$, 3H), 1,10 (d, $J=6,4\text{ Гц}$, 6H);

^{31}P ЯМР (162 МГц, CDCl_3): δ -2,05; (162 МГц, ДМСО- d_6): δ -0,31; ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 8,22 (d, $J=9,2\text{ Гц}$, 2H), 7,41-7,33(m, 4H), 7,26-7,18(m, 3H), 5,05-4,96(m, 1H), 4,14-4,05(m, 1H), 3,93-3,88(m, 1H), 1,38(d, $J=6,8\text{ Гц}$, 3H), 1,22 (dd, $J=6,2 \& 3,0\text{ Гц}$, 6H); ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,49(d, $J=8,8\text{ Гц}$, 2H), 7,41-7,37(m, 2H), 7,23-7,19 (m, 3H), 6,66 (dd, $J=13,6, 10,0\text{ Гц}$, 1H), 4,86-4,78 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,19 (d, $J=7,2\text{ Гц}$, 3H), 1,10(d, $J=6,4\text{ Гц}$, 6H). MS (электроспрей ионизация) m/z 407 ($M-1$)⁺.

Стереохимия 8 (S_P -изомера) была подтверждена рентгеновской кристаллографией монокристалла, см. подробное описание, представленное ниже.

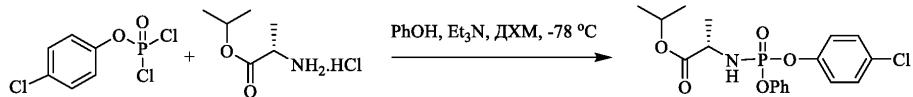
Пример 7. Разделение диастереоизомерной смеси изопропилового эфира (S)-2-[(4-нитрофенокси)фенокси-фосфориламино]пропионовой кислоты при сверхкритической флюидной хроматографии.

Пробу смеси диастереомеров (4,8 г), обогащенную R_P -изомером, подвергали сверхкритической флюидной хроматографии при помощи ChiralPak AD-H (2×15 см) колонку и элюировали 35% изопропанолом в диоксиде углерода при 100 бар. Использовали инъекционную загрузку 4 мл пробу при концентрации 17 мг/мл метанола. Первым элюировали R_P -изомер изопропилового эфира [(S)-2-[(R)-(4-нитрофенокси)фенокси-фосфориламино]пропионовой кислоты. Соответствующие фракции многократных пропусканий соединяли и концентрировали при сниженному давлении с получением 2,9 г R_P -изомера изопропилового эфира [(S)-2-[(R)-(4-нитрофенокси)фенокси-фосфориламино]пропионовой кислоты в виде светло-желтого вязкого масла и 1,9 г S_P -изомера изопропилового эфира [(S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)фенокси-фосфориламино]пропионовой кислоты в виде твердого белого вещества. Аналитические данные R_P -изомера аналогичны продукту, выделенному описанным выше способом кристаллизации.

Аналитические данные для изопропилового эфира (S)-2-[(R)-(4-нитрофенокси)фенокси-фосфориламино]пропионовой кислоты (8, R_P -изомер): ^{31}P ЯМР (162 МГц, ДМСО- d_6): δ -0,47; ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 8,30-8,27 (m, 2H), 7,46-7,38 (m, 4H), 7,27-7,20 (m, 3H), 6,68 (dd, $J=13,8, 10,2\text{ Гц}$, 1H), 4,86-4,77

(m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 1,20 (d, J=7,2Гц, 3H), 1,10(dd, J=6,2, 2,2Гц, 6H); MS (электроспрей ионизация) m/z 407 (M-1)⁺.

Пример 8-1. Получение рацемического изопропилового эфира 2-[[(4-хлор-фенокси)-фенокси-фосфориламино]пропионовой кислоты (±):

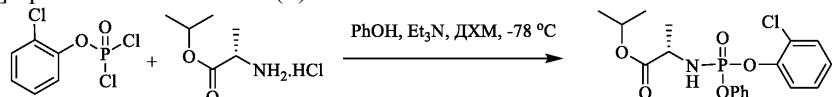


В перемешанный раствор 4-хлор-фенил фосфордихлоридата (2,45г, 10,0 ммоль) в дихлорметане (20 мл) добавляли раствор фенола (0,94 г, 10 ммоль) и третиатамина (1,56 мл, 11 ммоль) в дихлорметане (20мл) при -78°C в течение периода, составляющего 20 мин. Смесь перемешивали при данной температуре в течение 30 мин и затем переносили в другую круглодонную колбу, содержащую гидрохлорида L-аланин изопропилового сложного эфира (1,67 г, 10 ммоль) в дихлорметане (50 мл) при 0°C. В смесь добавляли вторую партию триэтиламина (2,92 мл, 21 ммоль) в течение периода, составляющего 15 мин. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и затем растворитель испаряли. Остаток растирали в порошок с этилацетатом (30 мл) и белое твердое вещество отфильтровывали. Фильтрат концентрировали при сниженнем давлении с получением бледно-желтого масла. Неочищенное масло хроматографировали при помощи 10-20% этил ацетат/гексанового градиента с получением продукта (2,0 г, 50% выход) в виде смеси диастереомеров в соотношении приблизительно 1:1. ³¹P ЯМР (162 МГц, CDCl₃): δ -1,58, -1,62; ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 7,06-7,51 (m, 8H), 7,15-7,28 (m, 2H), 7,29-7,47(m, 2H), 4,0-4,10(m, 1H), 3,82-3,88 (m, 3H), 1,35-1,36 (dd, 6H); 1,19-1,22 (m, 3H). MS (электроспрей ионизация) m/z 398 (M-1)⁺. Полученный в результате продукт очищали путем экстракции, кристаллизации или хроматографии, как отмечено выше.

Пример 8-2. Получение (S)-изопропил 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфориламино)пропаноата (4).

В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метил-тетрагидрофуран-2-ил)-1Н-пиримидин-2,4-диона (3, 2,6 г, 10 ммоль) в сухом ТГФ (50 мл) добавляли 1,7 М раствор трет-бутилмагний хлорида (12,4 мл, 21 ммоль, 2,1 эквив.) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 15 мин. Через 30 мин, раствор рацемического изопропилового эфира (2-[(4-хлор-фенокси)-фенокси-фосфориламино]пропионовой кислоты (4,08 г, 10 ммоль) в ТГФ (15 мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 10 мин. Смеси позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 72 ч, совместные пятна ТСХ с аутентичным продуктом показывали, что приблизительно 5% целевого продукта были образованы, по сравнению с исходным нуклеозидом.

Пример 9-1. Получение рацемического изопропилового эфира 2-[(2-хлор-фенокси)фенокси-фосфориламино]пропионовой кислоты (±).



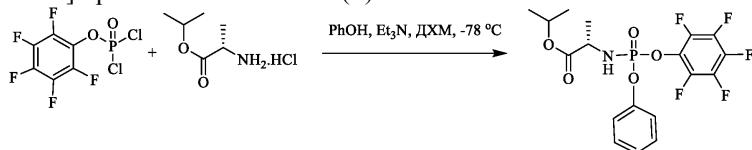
В перемешанный раствор 2-хлор-фенил фосфордихлоридата (9,8 г, 40 ммоль) в дихлорметане (80 мл) добавляли раствор фенола (3,76 г, 40 ммоль) и триэтиламина (6,16 мл, 44 ммоль) в дихлорметане (80 мл) при -78°C в течение периода, составляющего 20 мин. Смесь перемешивали при данной температуре в течение 30 мин и затем переносили в другую круглодонную колбу, содержащую гидрохлорид L-аланин изопропилового сложного эфира (6,7 г, 40 ммоль) в дихлорметане (150 мл) при 0°C. В смесь добавляли вторую порцию триэтиламина (11,6 мл, 84 ммоль) в течение периода, составляющего 15 мин. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и затем растворитель испаряли. Остаток растирали в порошок с этилацетатом (100 мл) и белое твердое вещество отфильтровывали. Фильтрат концентрировали при сниженнем давлении с получением бледно-желтого масла. Неочищенное масло хроматографировали при помощи 10-20% этил ацетат/гексанового градиента с получением продукта (11,3 г, 72% выход) в виде смеси диастереомеров в соотношении приблизительно 1:1. ³¹P ЯМР (162 МГц, CDCl₃): δ -1,58, -1,61; ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 7,06-7,51 (m, 8H), 5,02-5,94 (m, 1H), 4,10-4,16(m, 1H), 3,31-3,94(m, 1H), 1,18-1,35(m, 3H), 1,38-1,40 (dd, 6H); MS (электроспрей ионизация) m/z 398 (M-1)⁺. Полученный в результате продукт очищенный экстракцией, кристаллизацией, или хроматографией, как отмечено выше.

Пример 9-2. Получение (S)-изопропил 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфориламино)пропаноата.

В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метил-тетрагидрофуран-2-ил)-1Н-пиримидин-2,4-диона (3, 2,6 г, 10 ммоль) в сухом ТГФ (50 мл) добавляли 1,7 М раствор трет-бутилмагний хлорида (12,4 мл, 21 ммоль, 2,1 эквив.) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 15 мин. Через 30 мин, раствор изопропилового эфира (2-[(2-хлор-фенокси)-фенокси-фосфориламино]пропионовой кислоты (рацемический, 4,08 г, 10 ммоль) in ТГФ (15мл) добавля-

ли по каплям в течение периода, составляющего 10 мин. Смеси позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 72 ч. Совместные пятна ТСХ с аутентичным продуктом показывали, что приблизительно 5-10% целевого продукта были образованы, по сравнению с исходным нуклеозидом.

Пример 10-1. Получение рацемического изопропилового эфира 2-[(2,3,4,5,6-пентафтор-фенокси)-фенокси-фосфориламино] пропионовой кислоты (\pm).

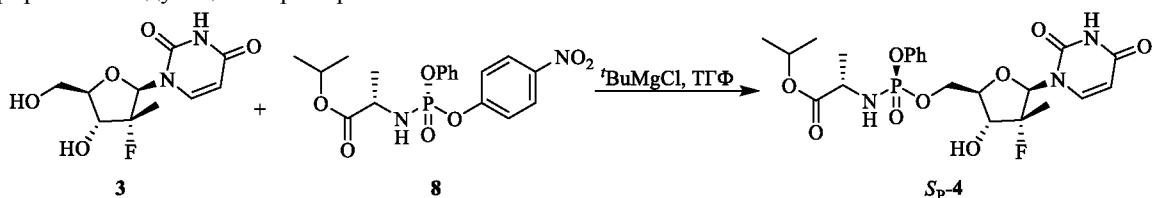


В перемешанный раствор пентафторфенил фосфордихлоридата (6,0 г, 20 ммоль) в дихлорметане (40 мл) добавляли раствор фенола и триэтиламина (3,08 мл, 22 ммоль) в дихлорметане (40 мл) при -78°C в течение периода, составляющего 20 мин. Смесь перемешивали при данной температуре в течение 30 мин и затем переносили в другую круглодонную колбу, содержащую гидрохлорид L-аланин изопропилового сложного эфира (3,35 г, 20 ммоль) в дихлорметане (100 мл) при 0°C . В смесь добавляли вторую партию триэтиламина (5,84 мл, 42 ммоль) в течение периода, составляющего 15 мин. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и затем растворитель испаряли. Остаток растирали в порошок с этилацетатом (60 мл) и белое твердое вещество отфильтровывали. Фильтрат концентрировали при сниженном давлении с получением бледно-желтого масла в виде смеси диастереомеров в соотношении приблизительно 1:1. ^{31}P ЯМР (162 МГц, CDCl_3): δ -0,49, -0,58, Полученный в результате продукт очищенный экстракцией, кристаллизацией, или хроматографией, как отмечено выше.

Пример 10-2. Получение (S)-изопропил 2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиrimидин-1(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)-фосфориламино) пропанаата.

В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метил-тетрагидро-фuran-2-ил)-1Н-пиридин-2,4-диона (3, 2,6 г, 10 ммоль) в сухом ТГФ (50 мл) добавляли 1,7М раствора трет-бутилмагний хлорида (12,4 мл, 21ммоль, 2,1 эквив.) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 15 мин. Через 30 мин, раствор неочищенного рацемического изопропилового эфира (2-[(2,3,4,5,6-пентафторфенокси)фенокси-фосфориламино]пропионовой кислоты (4,08 г, 10 ммоль) в ТГФ (15мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 10мин. Смеси позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 72 ч. Совместные пятна ТСХ с аутентичным продуктом показывали, что приблизительно 40-50% целевого продукта были образованы, по сравнению с исходным нуклеозидом.

Получение и очистка С или С' обеспечивает непосредственный доступ к S_p -4 или R_p -4, что проиллюстрировано следующими примерами.



Пример 11. Получение S_p -4 (32 мг-шкала): В перемешанный раствор 1-((2R, 3R,4R, 5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1Н-пиридин-2,4-диона 3 (32 мг, 0,12 ммоль) в сухом ТГФ (1мл) добавляли а 1М раствор трет-бутилмагний хлорида (0,26 мл, 0,26 ммоль, 2,1 эквив.) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 3 минуты. Через 30 мин, раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)фенокси-фосфориламино]пропионовой кислоты (8, S_p -изомер) в ТГФ (0,5мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 3 мин. Смеси позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 42 ч и затем гасили насыщенным водным раствором NH_4Cl (10 мл). Смесь разделяли на фракции между этилацетатом и водой. Соединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Остаток хроматографировали при помощи 0-4% метанол/дихлорметанового градиента с получением S_p -4 в виде пенного твердого вещества (29 мг, 44,5% выход). ^1H и ^{31}P ЯМР подтверждают то, что описано в данной заявке.

Пример 12. Получение S_p -4 (2,6 г-шкала, без хроматографии).

В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метил-тетрагидрофуран-2-ил)-1Н-пиридин-2,4-диона (2,6 г, 10 ммоль) в сухом ТГФ (50 мл) добавляли 1,7 М раствор трет-бутилмагний хлорида (12,4 мл, 21 ммоль, 2,1 эквив.) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 15 мин. Через 30 мин, раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)фенокси-фосфориламино]пропионовой кислоты (8, S_p -изомер, 4,08 г, 10 ммоль) в ТГФ (15 мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 10 мин. Смеси позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 60 ч и затем гасили насыщенным водным раствором NH_4Cl (20 мл). Смесь разделяли на фракции между этилацетатом (150 мл) и последовательно, 10% водным раствором

Na_2CO_3 (3×20 мл) и водой (20 мл). Соединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при сниженном давлении с получением бледно-желтого остатка (3,8 г). Остаток растворяли в дихлорметане (7,6 мл) и затем перемешивали в течение 20 ч при комнатной температуре. Белое твердое вещество фильтровали, промывали 1:1 ИПЭ/дихлорметаном (5 мл) и сушили в вакууме с получением неочищенного продукта в виде белого твердого вещества (1,85 г, 35% выход).

Пример 13. Получение S_p -4 при помощи NaNH МДС: В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метил-тетрагидро-фуран-2-ил)-1Н-пиридин-2,4-диона (71 мг, 0,27 ммоль) в сухом ТГФ (2,0 мл) добавляли 2,0 М раствор натрий бис(триметилсиландиамид) (NaNH МДС) в ТГФ (270 мкЛ, 0,54 ммоль) при -78°C в течение периода, составляющего 2 мин. Через 30 мин, в смесь добавляли раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (8, S_p -изомер, 111 мг, 0,27 ммоль) в ТГФ (1 мл). Реакционной смеси позволяли перемешиваться при данной температуре в течение 2 ч и затем нагревали до -20°C при такой температуре ее перемешивали в течение еще 20 ч. ТСХ указывала на ~30% непрореагировавшего нуклеозидного исходного вещества. Затем, в реакционную смесь добавляли дополнительные 0,5 эквивалентов реагента (55 мг, 0,14 ммоль) в ТГФ (0,5 мл) и перемешивали еще 6 ч. Реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором хлорида аммония и затем фракционировали между этилацетатом и водой. Соединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением светло-коричневого остатка. Колоночная хроматография неочищенного продукта при помощи 0-5% метanol/дихлорметанового градиента привела к получению S_p -4 (22 мг, 15% выход), 3'-фосфорамидата (5, S_p -изомер, 11,5 мг, 16% выход) и бис фосфорамидата (6, S_p , S_p -изомер, 12,6 мг).

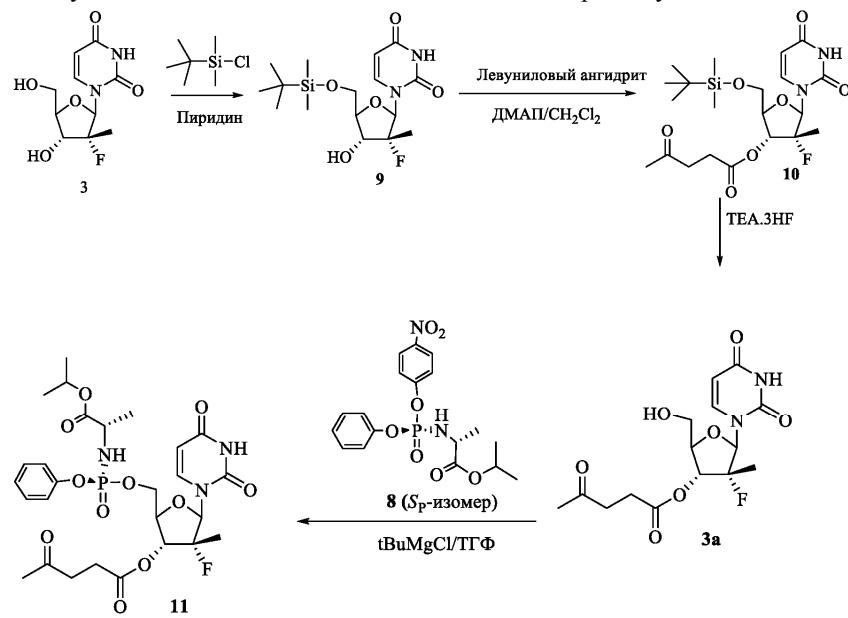
Пример 14. Получение R_p -4 (260 мг-шкала).

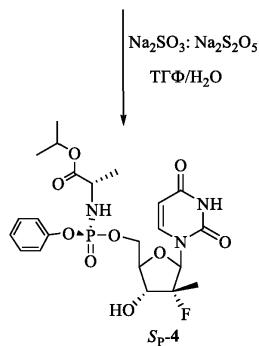
В перемешанный раствор 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидро-фуран-2-ил)-1Н-пиридин-2,4-диона (260 мг, 1 ммоль) в сухом ТГФ (6 мл) добавляли 1,7 М раствор трет-бутилмагний хлорида (1,23 мл, 2,1 ммоль, 2,1 эквив.) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 5 мин.

Через 30 мин раствор изопропилового эфира (S)-2-[(R)-(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (8, R_p -изомер) в ТГФ (3 мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 3 мин. Смеси позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 96 ч и затем гасили насыщенным водным раствором NH_4Cl (10 мл). Смесь разделяли на фракции между этилацетатом (50 мл) и водой (2×20 мл). Соединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при сниженном давлении с получением бледно-желтого остатка (490 мг). Остаток хроматографировали при помощи 0-5% метанол/дихлорметанового градиента с получением продукта в виде белого твердого вещества (160 мг, 30% выход).

Получение S_p -4 или R_p -4 может быть также реализовано путем реакции 3'-защищенного 3 с соответствующим реагентом С или С' или смеси, содержащей С и С', как проиллюстрировано в следующих примерах.

Пример 15. Получение S_p -4 с 3а в качестве синтетического промежуточного вещества





Пример 15-1. Синтез 5'-О-трет-бутилдиметилсилил-2'-дезокси-2'-фтор-2'-С-метилуридуна (9).

В перемешанный раствор 2'-дезокси-2'-фтор-2'-С-метилуридуна (3, 81,1 г, 312 ммоль) в сухом пиридине (750 мл) добавляли по каплям раствор трет-бутилдиметилсилил Cl (103,19 г, 685,6 ммоль) в сухом пиридине (500 мл) в течение периода, составляющего 45 мин при температуре окружающей среды. Реакционной смеси позволяли перемешиваться при температуре окружающей среды в течение 24 ч. Метанол (85 мл) добавляли в реакционную смесь и ей позволяли перемешиваться в течение 10 мин и затем растворители отгоняли при сниженном давлении. Горячую воду (45°C) (1 л) добавляли в реакционную массу и смесь экстрагировали этилацетатом (2×500 мл), промывали водой (1×500 мл). Органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия. Этил ацетат отгоняли и полученный остаток совместно испаряли с толуолом (2×500 мл) с получением неочищенного 9 в виде белой пены. Выход = 116,9 г (количественный). ¹H ЯМР (CDCl₃, 300 МГц): δ 0,1 (s, 6H), 0,91 (s, 9H), 1,22 (d, 3H, J = 21 Гц), 2,50 (s, 2H), 3,75-4,05 (m, 4H), 5,54 (d, 1H, J = 9 Гц), 5,73 (s, 1H), 6,0 (d, 1H, J = 18 Гц), 7,81 (d, 1H, J = 9 Гц), 8,57 (br, s, 1H), 11,1 (s, 1H).

Пример 15-2. Синтез 5'-О-(трет-бутилдиметилсилил)-3'-О-левулинил-2'-дезокси-2'-фтор 2'-С-метилуридуна (10).

В перемешанный раствор нуклеозида 9 (116,9 г, 312,1 ммоль) в ДХМ (1л) добавляли ДМАП (30,5 г, 249,7 ммоль) и позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 20 мин. Раствор левулинилового ангидрида (133,6 г, 642,3 ммоль) в ДХМ (200 мл) добавляли к смеси и позволяли перемешиваться в течение 24 ч. ТСХ смеси указывало на завершение реакции. Добавляли холодную воду (500 мл) и смесь перемешивали в течение 20 мин. Слои разделяли и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (2×250 мл), высушивали над безводным сульфатом натрия и затем растворитель отгоняли при сниженному давлении с получением желтого масла. Выход неочищенного продукта: 197,6 г (135%). Вещество использовали для следующей стадии без дальнейшей очистки. ¹H ЯМР (CDCl₃, 300 МГц) δ 0,11 (s, 6H), 0,94 (s, 9H), 1,34 (d, 3H, J = 21 Гц), 2,22 (s, 3H), 2,6-2,89 (m, 4H), 3,72 (m, 1H), 4,01 (d, 1H, J = 12 Гц), 4,23 (d, 1H, J = 9 Гц), 5,33 (dd, 1H, J = 15 Гц), 5,73 (d, 1H, J = 6 Гц), 6,26 (d, 1H, J = 15 Гц), 8,12 (d, 1H, J = 12 Гц), 8,72 (br, s, 1H).

Пример 15-3. Синтез 3'-О-левулинил-2'-дезокси-2'-фтор 2'-С-метилуридуна (3а).

Неочищенный 10 (197,6 г, ~312,1 ммоль) растворяли в ДХМ (1 л), в который добавляли ТЭА·3HF (50,3 г, 312,1 ммоль) и позволяли перемешиваться всю ночь при температуре окружающей среды. ТСХ смеси указывало на приблизительно 50% завершение реакции. Добавляли еще один эквивалент ТЭА·3HF (50,3 г, 312,1 ммоль) и реакционной смеси позволяли перемешиваться в течение 6 ч. ТСХ в данный момент указывала на приблизительно 10% непрореагированного исходного материала. Добавляли еще один эквивалент 0,25 ТЭА·3HF (12,5 г, 78,0 ммоль) и реакционной смеси позволяли перемешиваться всю ночь. Реакционную смесь концентрировали до сухого остатка с получением желтого масла. Неочищенный продукт из всех партий очищали при помощи колоночной хроматографии на силикагеле (0-2% MeOH в ДХМ) с получением 124,1 г 3'-левулината в виде белого пенного твердого вещества (90% выход очищенного продукта в течение трех стадий из 2'-дезокси-2'-фтор-2'-С-метилуридуна). ¹H ЯМР: (CDCl₃, 400 МГц) δ 1,55 (d, 3H, CH₃, J = 20 Гц), 2,36 (s, 3H, CH₃), 2,8-3,03 (m, 5H, CH₂CH₃), 3,91-3,96 (dd, 1H, CH"), 4,2-4,25 (m, 1H, CH'), 4,34 (dd, 1H, CH, J = 8 Гц), 5,25 (dd, 1H, J = 16 Гц), 5,93 (d, 1H, J = 8 Гц), 8,20 (d, 1H, J = 8 Гц), 9,18 (s, 1H).

Пример 15-4. Стереоселективный синтез (S)-изопропилового эфира (S)-2-[(1R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2Н-пиримидин-1-ил)-4-(R)-фтор-3-(4-октеноатоил)-4-метилтетрагидрофуран-2-ил-метокси]феноксифосфориламино}пропионовой кислоты (11).

В раствор нуклеозида (3а, 1,00 ммоль, 358 мг) в 5 мл безводного ТГФ, который охлаждали до 0°C, добавляли tBuMgCl (1,7 М в ТГФ, 2 экв.) и позволяли нагреваться до температуры окружающей среды, и перемешивали в течение получаса. В данную смесь добавляли реагент (прибл. 97% хиральной чистоты) изопропиловый эфир (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино] пропионовой кислоты (8, S_p-изомер) (408 мг, 1,00 ммоль, 1,00 экв.) одной партией и позволяли перемешиваться при комнатной температуре. Через 16 ч, оставалось ~30% исходного материала. Реакционную смесь гасили насыщенным раствором NH₄Cl 10 мл, и водную фазу экстрагировали этилацетатом (3×25 мл). Соединенный органиче-

ский слой промывали солевым раствором и сушили над безводным сульфатом натрия и испаряли до сухого остатка с получением бледно-желтой пены (500 мг). Ее очищали при помощи хроматографии на силикагеле с использованием 2-5% метанола в метиленхлориде с получением продукта в виде белой пены (275 мг) при приблизительно 97% Р хиральной чистоты и непрореагировавшего исходного материала (162 мг). Исходя из израсходованного исходного материала, выход составлял 76%. ^{31}P ЯМР (CDCl_3 , 162 МГц): 3,7 ppm; ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 1,22 (dd, 6H, $J = 6,4 \text{ Гц}$), 1,37 (s, 3H), 1,58 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,63-2,9 (m, 4H), 4,0 (d, 1H, $J = 8 \text{ Гц}$), 4,2-4,33 (m, 1H), 4,57 (d, 1H, $J = 8\text{Гц}$), 4,96-5,00 (sept, 1H), 5,2 (dd, 1H, $J = 9 \text{ Гц}$), 5,42 (d, 1H, $J = 8\text{Гц}$), 6,19 (d, 1H, $J = 18\text{Гц}$), 7,15-7,35 (m, 5H), 7,5 (d, 1H, $J = 5,6 \text{ Гц}$), 8,2 (br, s, 1H).

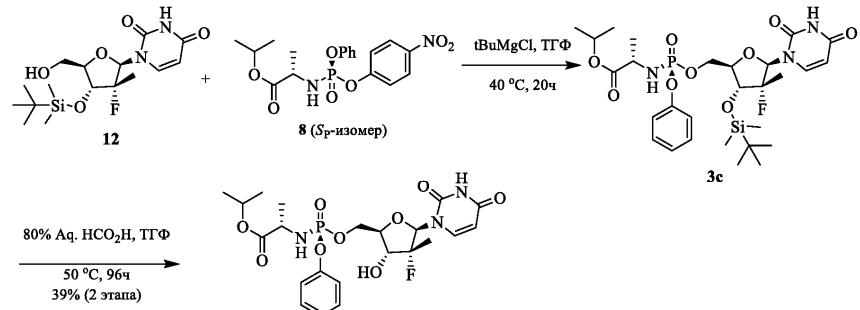
Пример 15-5. Синтез (S)-изопропилового эфира (S_p -4) (S)-2-{{[(1R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2Н-пиrimидин-1-ил)-4-(R)-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-илметокс]феноксифосфорил-амино}пропионовой кислоты.

Раствор сульфита натрия получали путем добавления $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1,51 г) та $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (0,57 г) в воде (25 мл). В раствор левулината (11, 250 мг, 0,40 ммоль) в безводном ТГФ (2,5 мл) добавляли 1,0 мл раствора сульфита натрия. Раствору позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь выливали в воду (15 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×25 мл), высушивали и испаряли с количественным получением белого твердого продукта с приблизительно 97% Р хиральной чистоты, что соответствовало физическим и спектральным свойствам S_p -4, полученного непосредственно из непрореагировавшего нуклеозида.

Пример 16. Альтернативная процедура получения S_p -4 из 3а.

В перемешанный раствор эфира 4-оксопентаноевой кислоты ($2\text{R},3\text{R},4\text{R},5\text{R}$)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2Н-пиrimидин-1-ил)-4-фтор-2-гидроксиметил-4-метил-тетрагидро-фуран-3-ила (3а, 210 мг, 0,59 ммоль) в сухом ТГФ (1,5 мл) добавляли 1,7 М раствор трет-бутилмагний хлорида (1,07 мл, 1,82 ммоль) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 2 мин. Изначально, наблюдали белый осадок и через 10 мин реакционная смесь превращалась в темно-желтый раствор. Через 30 мин, раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (8 (S_p -изомер), 382 мг, 0,94 ммоль) в ТГФ (1,5 мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 3 мин. Смесь нагревали при 40°C в течение 5 ч, в это время ТСХ и ^1H ЯМР указывали на наличие менее, чем 2% непрореагировавшего исходного материала. Реакцию гасили насыщенным водным раствором хлорида аммония и затем фракционировали между этилацетатом и водой. Соединенный органический слой промывали 10% водным раствором Na_2CO_3 (3×10 мл), а затем водой. Органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением коричневого остатка (410 мг). Непочищенный продукт растворяли в тетрагидрофуране (1,0 мл) и затем добавляли водный раствор смеси сульфита натрия (37 мг, 0,295 ммоль) и натрий метабисульфита (224 мг, 1,18 ммоль) в 1 мл воды. Смесь нагревали при 45°C в течение 20 ч, на данной стадии происходило только приблизительно 10% превращения согласно ТСХ, затем добавляли дополнительный сульфит натрия (74 мг) и метабисульфит натрия (448 мг) и нагревание продолжали в течение еще 52 ч. В это время, приблизительно 40% превращения наблюдали при помощи ТСХ. Реакционную смесь разделяли на фракции между водой и этилацетатом. Соединенный органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением коричневого остатка (210 мг). Колоночная хроматография остатка при помощи 0-5% MeOH/DHM градиента приводила к получению непрореагировавшего исходного материала (89 мг) и S_p -4 (57 мг, 18% выход, 24% исходя из восстановленного исходного материала).

Пример 17. Получение S_p -4 с 3с в качестве синтетического промежуточного вещества



Пример 17-1. Получение 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(трет-бутилдиметилсиланилокси)-3-фтор-5-гидрокси-метил-3-метилтетрагидрофуран-2-yl]-1Н-пиrimидин-2,4-диона, 12.

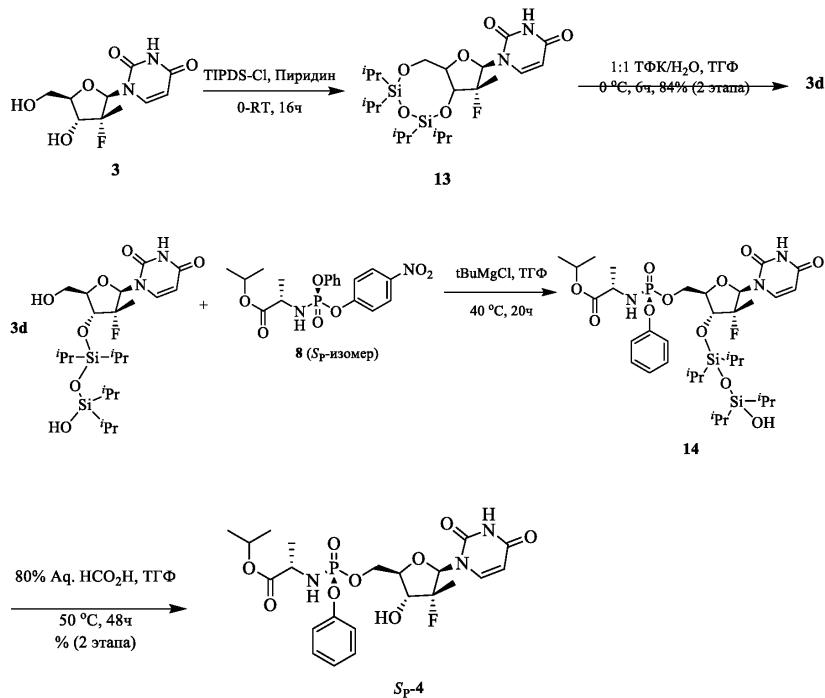
В раствор 3 (10,0 г, 38,43 ммоль) в пиридине (50 мл) добавляли дихлорметан (50 мл). Раствор охлаждали до 0°C . В раствор добавляли 4,4'-диметокситритил хлорид (14,32 г, 42,27 ммоль) раствор перемешивали при 0°C в течение 5 ч. Метанол (5 мл) добавляли для погашения реакции. Раствор концентрировали до сухого остатка при сниженном давлении и остаток разделяли на фракции между этилацетатом

(500 мл) и водой (50 мл). Органический раствор промывали солевым раствором (50 мл) и сушили (сульфат натрия 4 г). Растворитель удаляли при сниженном давлении и остаток растворяли в дихлорметане (100 мл). В раствор добавляли имидазол (7,83 г, 115 ммоль) и трет-бутилдиметилсилил хлорид (8,68 г, 57,6 ммоль). Раствор перемешивали при температуре окружающей среды в течение 16 ч. Метанол добавляли для того, чтобы погасить реакцию (5 мл) и растворитель удаляли при сниженном давлении, и остаток разделяли на фракции между этилацетатом (500 мл) и водой (50 мл). Органический раствор высушивали (сульфат натрия, 4 г) и испаряли при сниженном давлении. Остаток очищали при помощи колоночной хроматографии (10-40% EtOAc в гексане) с получением 5'-О-ДМТ-3'-О-т БДМС продукта промежуточного вещества. Его в свою очередь обрабатывали 1% трифтормукусной кислотой в дихлорметане (200 мл). Раствор перемешивали при температуре окружающей среды в течение 1 ч. Добавляли воду (20 мл) и раствор перемешивали в условиях окружающей среды еще 1 ч. Медленно добавляли метанол (5 мл) и раствор перемешивали в условиях окружающей среды еще 1 ч. Добавляли гидроксид аммония для регулирования pH раствора до 7. Органический раствор отделяли, высушивали (сульфат натрия, 4 г) и испаряли до сухого остатка при сниженном давлении. Остаток очищали при помощи колоночной хроматографии на силикагеле (1-5% метанол в дихлорметане) с получением 12 в виде белого твердого вещества 7,5 г с 50% выходом в течение трех стадий. ^1H ЯМР (DMCO-d_6) δ (ppm) 11,48 (br s, 1H, NH), 7,94 (d, 1H, H-6), 6,00 (d, 1H, H-1'), 5,69 (d, 1H, H-5), 4,06 (dd, 1H, 3'-H), 3,85 (m, 2H, H-5'a, H-4'), 3,58 (br d, 1H, H-5'b), 1,27 (d, 3H, 2-CH₃), 0,89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0,12 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

Пример 17-2. Получение S_p-4 при помощи 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(трет-бутилдиметилсиланилокси)-3-фтор-5-гидроксиметил-3-метил-тетрагидро-фуран-2-yl]-1Н-пиrimидин-2,4-диона (3c).

В перемешанный раствор 1-[(2R,3R,4R,5R)-4-(трет-бутилдиметилсиланилокси)-3-фтор-5-гидроксиметил-3-метилтетрагидрофуран-2-ил]-1Н-пиrimидин-2,4-диона (12, 374 мг, 1 ммоль) в сухом ТГФ (3 мл) добавляли 1,7 М раствор трет-бутилмагний хлорида (1,8 мл, 3,1 ммоль) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 2 мин. Изначально, наблюдали белый осадок и через 10 мин реакционную смесь превращали в темно-желтый раствор. Через 30 мин раствор изопропилового эфира (S)-2-[(S)-(4-нитрофенокси)-фенокси-фосфориламино]-пропионовой кислоты (8, S_p-изомер, 653 мг, 1,6 ммоль) в ТГФ (2,5 мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 3 мин. Смесь нагревали при 40°C в течение 20 ч, в это время ТСХ и ^1H ЯМР указывали на менее, чем 5% непрореагировавшего исходного материала. Реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором хлорида аммония и затем фракционировали между этилацетатом и водой. Органический слой промывали 10% водным раствором Na₂CO₃ (3×10 мл), в затем водой (20 мл). Органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением коричневого остатка, содержащего 3c (850 мг). Неочищенный продукт растворяли в тетрагидрофуране (2 мл) и добавляли 0,8 мл 80% водной муравьиной кислоты при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали при 50°C в течение 96 ч. Приблизительно 70% превращение наблюдали при помощи ТСХ. Реакционную смесь выливали в холодный насыщенный водный раствор бикарбоната натрия и затем фракционировали между этилацетатом и водой. Соединенный органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением коричневого остатка (220 мг). Колоночная хроматография остатка при помощи 0-5% MeOH/DXM градиента привела к получению непрореагировавшего исходного материала (21 мг) и S_p-4 (77 мг, 35% выход, 39% выход, исходя из восстановленного исходного материала).

Пример 18. Получение S_p-4 с 3d в качестве синтетического промежуточного вещества



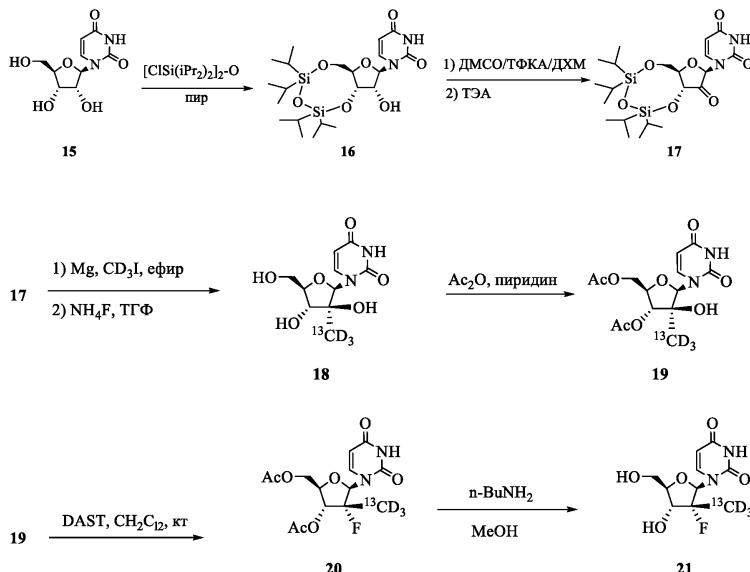
Пример 18-1. Получение 3d.

В перемешанный раствор 3 в пиридине (20 мл) при 0°C добавляли TIPDS-Cl по каплям в течение периода, составляющего 15 мин. Смеси медленно позволяли нагреваться до комнатной температуры при такой температуре ее перемешивали в течение 16 ч. Пиридин испаряли и остаток совместно испаряли с толуолом (50 мл). Остаток затем растирали в порошок с гексаном и белый осадок отфильтровывали, используя целинную подложку. Фильтрат концентрировали при сниженном давлении с получением пенного твердого вещества (12,97 г). Неочищенный продукт (13) повторно растворяли в тетрагидрофуране (75 мл) и добавляли водный раствор ТФК (75 мл, 1:1 ТФК/вода) при 0°C в течение периода, составляющего 20 мин. Смесь перемешивали при данной температуре в течение 6 ч. TCX указывала на ~5% исходного вещества. Реакционную смесь гасили насыщенным водным NaHCO₃ до достижения значения pH 8 и затем экстрагировали этилацетатом. Соединенный органический экстракт промывали водой, высушивали и концентрировали с получением белого кристаллического твердого вещества. Дополнительное растворение в порошок твердого вещества с гексаном (30 мл) приводило к получению твердого белого вещества, которое фильтровали и сушили в высоком вакууме с получением 3d (10,1 га, 84% выход в течение 2 стадий). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 8,83 (bs, 1H), 7,94 (bd, J=6,0 Гц, 1H), 6,10 (bd, J=18,4 Гц, 1H), 5,71 (d, J=8,2 Гц, 1H), 4,43 (bs, 1H), 4,36 (dd, J=22,6, 9,0 Гц, 1H), 4,27 (bs, 1H), 4,10 (d, J=13,2 Гц, 1H), 4,03 (d, J=9,2 Гц, 1H), 3,92 (d, J=13,2 Гц, 1H), 1,39 (d, J=22,0 Гц, 3H), 1,11-0,92 (m, 28H).

Пример 18-2. Получение Sp-4.

В перемешанный раствор 3d (520 мг, 1 ммоль) в сухом ТГФ (5 мл) добавляли 1,7М раствор трет-бутилмагний хлорида (1,8 мл, 3,1 ммоль, 3,1 эквив.) при комнатной температуре в течение периода, составляющего 15 мин. Через 30 мин, раствор изопропилового эфира (S)-2-[{(S)-(4-нитрофенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты (8, Sp-изомер, 653 мг, 1,6 ммоль) в ТГФ (1 мл) добавляли по каплям в течение периода, составляющего 3 мин. Смеси позволяли перемешиваться при комнатной температуре в течение 60 ч. ¹H и ³¹P ЯМР неочищенной пробы указывали на смесь диастереомеров в соотношении приблизительно 1:0,76. Реакционную смесь гасили насыщенным водным NH₄Cl (20 мл). Смесь разделяли на фракции между этилацетатом (150 мл) и последовательно, 10% водным Na₂CO₃ (3×20 мл) и водой (20 мл). Соединенный органический экстракт высушивали над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при сниженном давлении с получением бледно-желтого остатка (14, 878 мг). Указанное выше соединение, 14, повторно растворяли в тетрагидрофуран (3 мл) и затем добавляли 80% водную муравьиную кислоту. Смесь нагревали при 55°C в течение 20 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0°C, и затем гасили насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (pH 7,0). Реакционную смесь затем фракционировали между этилацетатом и водой. Соединенный органический слой высушивали над сульфатом натрия и концентрировали с получением 560 мг остатка. Остаток хроматографировали при помощи 0-5% метанол/дихлорметанового градиента с получением непрореагированного исходного материала (14, 242 мг) и Sp-4 (80 мг, 15% выход) в виде белого твердого вещества.

Пример 19. Получение изотопно меченого Sp-4



Пример 19-1. Получение 1-((6aR,8R,9R,9aS)-9-гидрокси-2,2,4,4-тетраизопропилтетрагидро-6Н-фуро[3,2-f][1,3,5,2,4]триоксадисилоцин-8-ил)пириimidин-2,4(1Н,3Н)-диона, 16.

Уридин (15, 100,0 г, 409,5 ммоль) совместно испаряли до сухого остатка с безводным пиридином (600 мл) и повторно суспендировали в безводном пиридине (700 мл). К данной перемешанной мелкодисперсной суспензии добавляли 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропилдисиоксан (135,7 г, 482,5 ммоль) в течение 60 мин при температуре окружающей среды. После перемешивания мелкодисперсной суспензии в течение 17 ч при температуре окружающей среды, реакцию гасили путем добавления метанола (20 мл) и затем концентрировали при сниженном давлении. Остаток разделяли на фракции между этилацетатом (1,5 л) и водой (2 л). Органический слой дополнительно промывали 5% соляной кислотой (2×1 л), солевым раствором (500 мл), высушивали над твердым сульфатом натрия (50 г), фильтровали и концентрировали при сниженнем давлении до неочищенного продукта, прибл. 250 г. Остаток подвергали фильтрации на фильтровальной колонке с использованием силикагеля (1,75 кг) и градиента этилацетата в гексане 20-65%. Фракции чистого продукта оценивали при помощи гомогенной TCX (фактор ретенции 0,55 в 1:1 гексан-этилацетате) и соединяли и концентрировали при сниженнем давлении и сушили (40°C , 0,2 мм Hg, 24 часа) с получением 145,5 г (76%) 16 в виде белого пенного твердого вещества. Также собирали дополнительную фракцию (35 г) слегка загрязненного 16. ^1H ЯМР ($\text{ДМСО}-d_6$) δ (ppm) 11,35 (s, 1H, NH), 7,66 (d, 1H, $J=7,6$ Гц, H-6), 5,57 (d, 1H, $J=4,8$ Гц, 2'-ОН), 5,50-5,49 (m, 2H, 1'-Н и H-5), 4,14-4,18 (m, 3H, 2', 3', 4'-Н), 3,97-3,87 (m, 2H, 5'-На и Hb), 1,02-0,95 (m, 28H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

Пример 19-2. Получение 1-((6aR,8R,9aR)-2,2,4,4-тетраизопропил-9-окотетрагидро-6Н-фуро[3,2-f][1,3,5,2,4]триоксадисилоцин-8-ил)пириimidин-2,4(1Н,3Н)-диона, 17.

В сухую трехгорлую круглодонную колбу добавляли безводный DXM (600 мл) и ДМСО (30,82 г, 394,5 ммоль). Раствор охлаждали до -78°C на бане сухой лед/ацетон в атмосфере азота. Ангидрид трифтормукусной кислоты (чистый, 77,7 г, 369,8 ммоль) добавляли при помощи цилиндра в течение 40 мин и получали мутную смесь. В смесь раствора добавляли по каплям производное уридина 16 в DXM (600 мл) в течение 75 мин при -78°C при помощи дополнительной воронки. Гетерогенную смесь перемешивали в течение 2 ч при $-78\sim-65^\circ\text{C}$ и затем быстро добавляли безводный триэтиламин (92 мл) при помощи шприца с образованием прозрачного светло-желтого раствора. Через 1 ч при низкой температуре, реакция была завершена, как показано при помощи TCX (30% EtOAc в гексане). Охлаждающую баню удаляли и реакционную смесь медленно нагревали до температуры окружающей среды в течение 1 ч. Реакцию гасили путем добавления насыщенного водного раствора NH_4Cl (180 мл). Добавляли воду (200 мл) и отделяли органический слой. Водный слой экстрагировали снова DXM (300 мл). Соединенный органический слой промывали водой (3×400 мл), солевым раствором (150 мл), и сушили над Na_2SO_4 . Удаление растворителя приводило к получению клейкого коричневого остатка.

Остаток в виде неочищенного масла (содержал следы DXM) хранили всю ночь в камере замораживания. После этого, наблюдали некоторое количество кристаллического твердого вещества в масле. Масло растворяли в 500 мл гексана при температуре окружающей среды. Раствор хранили в камере замораживания в течение 24 ч и образовалось большее количество твердого вещества. Твердое вещество собирали посредством фильтрования и промывали холодным 10% DXM в гексане (1 л) для удаления большей части оранжевого цвета. Твердое вещество (17) высушивали в вакууме в течение 2 ч и затем высушивали на воздухе в течение 24 ч. Твердое вещество имело массу 21 г после высушивания при 50°C в вакууме. Фильтрат концентрировали и остаток очищали при помощи колоночной хроматографии (10-70% этилацетата в гексане) с получением дополнительных 37 г (соединенный выход 97%) 17 в виде светло-оранжевого твердого вещества.

Пример 19-3. Получение 1-((2R,3S,4R,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)-3-¹³C-пердейтериометилтетрагидрофуран-2-ил)пиридин-2,4(1Н,3Н)-диона, 18.

Магний (3,53 г, 147 ммоль), промывали 5% водной соляной кислотой и сушили (50°C, 0,2 мм Hg, 24 ч), помещали в двугорлую круглодонную колбу, оснащенную магнитной мешалкой и конденсатором. Колбу наполняли газом аргоном и затем безводным простым эфиrom (80 мл) добавляли. К магнию в простом эфире медленно добавляли пердейтерио-¹³C метил йодид (15,06 г, 110,3 ммоль), который выделялся в экзотермической реакции. Затем реакционную смесь охлаждали, супернатант переносили в раствор высущенного соединения 17 (50°C, 0,2 мм Hg, 15 ч) (10,0 г, 20,63 ммоль) в безводном ТГФ (1 л) при -50°C в течение 20 мин. Температуре позволяли повышаться до -40°C и смесь перемешивали при от -40 до -25°C в течение 4 ч. После завершения реакции, смесь разбавляли EtOAc (1л) при -50°C и затем медленно добавляли солевой раствор (300 мл). Органический слой отделяли и затем промывали насыщенным раствором хлорида аммония (300 мл ×2) и сушили сульфатом натрия. После фильтрования и концентрирования при сниженном давлении, остаток растворяли в MeOH (250 мл). Добавляли фторид аммония (12 г) и ТБАФ (400 мг). Полученную в результате смесь перемешивали при 90°C в течение 7 ч и затем концентрировали силикагелем (20 г) при сниженном давлении. После тщательной сушки в вакууме полученный остаток очищали при помощи фланш-колоночной хроматографии на силикагеле (MeOH:CH₂Cl₂ = 1:20 к 1:10) с получением соединения 18 (5 г, 46%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆) δ (ppm) 11,26 (s, 1H, NH), 7,65 (d, 1H, J= 8,4 Гц, H-6), 5,77 (d, 1H, J= 2,4 Гц, H-1'), 5,57 (d, 1H, J= 8,0 Гц, H-5), 5,46 (d, 1H, J= 5,2 Гц, HO-3'), 5,24 (d, 1H, J= 2,4 Гц, HO-2'), 5,14 (t, 1H, J= 5,6 Гц, HO-5'), 3,74-3,56 (m, 4H, H-3', 4', 5', 5").

Пример 19-4. Получение ((2R,3R,4S,5R)-3-ацетокси-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиридин-1(2H)-ил)-4-гидрокси-4-¹³C-метилтетрагидрофуран-2-ил)метил ацетат, 19.

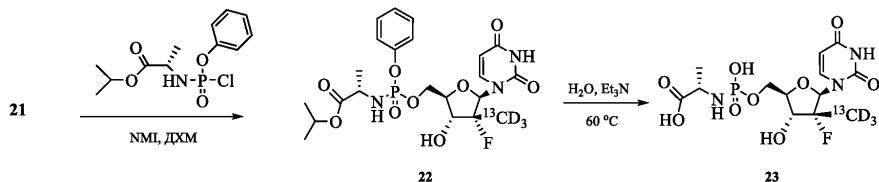
К раствору соединения 18 (5,00 г, 19,1 ммоль) в безводном пиридине (100 мл) добавляли уксусный ангидрид (3 мл) при температуре окружающей среды. Полученную в результате смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 15ч, разбавляли EtOAc (250 мл), промывали водой (50 мл × 3), и сушили сульфатом натрия. После фильтрования и концентрирования, остаток очищали фланш-колоночной хроматографией (MeOH 0 - 5% в CH₂Cl₂) с получением соединения 19 (4,0 г, 68%) в виде серого твердого вещества.

Пример 19-5. Получение ((2R,3R,4R,5R)-3-ацетокси-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиридин-1(2H)-ил)-4-фтор-4-¹³C-пердейтериометилтетрагидрофуран-2-ил)метил ацетата, 20.

В раствор соединения 19 (2,33 г, 6,73 ммоль) в безводном CH₂Cl₂ (60 мл) медленно добавляли DAST (1,33 мл, 10,1 ммоль) при -78°C. Полученную в результате смесь перемешивали в течение 30 мин после того, как подвергали ее воздействию температуры окружающей среды. Дополнительные две реакции масштаба 2,33 г и одну реакцию масштаба 1,00 г проводили в точности таким же образом. Все четыре реакционные смеси соединяли, разбавляли CH₂Cl₂ (300 мл), и промывали водой со льдом (100 мл × 2) и затем холодным водным раствором NaHCO₃ (100 мл × 2). После высушивания, фильтрования и концентрирования, остаток очищали при помощи фланш-колоночной хроматографии на силикагеле (EtOAc 0% - 50% в гексане, соединение получали с выходом приблизительно 48%) с получением соединения 20 (2,0 г, 24% от общего 7,99 г соединения 19) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃) δ (ppm) 8,27 (s, 1H, NH), 7,55 (d, 1H, J= 8,4 Гц, H-6), 6,17 (d, 1H, J= 18,8 Гц, H-1'), 5,78 (dd, 1H, J= 1,2, 8,4 Гц, H-5), 5,12 (dd, 1H, J= 9,6, 21,6 Гц, H-3'), 4,40-4,31 (m, 3H, H-4', 5', 5"), 2,19 (s, 3H, CH₃), 2,15 (s, 3H, CH₃).

Пример 19-6. Получение 1-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)-3-¹³C-пердейтериометилтетрагидрофуран-2-ил)пиридин-2,4(1Н,3Н)-диона, 21.

В раствор соединения 20 (2 г, 5,74 ммоль) в метаноле (20 мл) добавляли н-бутиламин (6 мл). Полученную в результате смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч и концентрировали силикагелем in vacuo. Полученный остаток очищали при помощи фланш-колоночной хроматографии на силикагеле (MeOH 0-10% в CH₂Cl₂) с получением соединения 21 (1,3 г, 85%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (CD₃OD) δ (ppm) 8,08 (d, 1H, J= 8,0 Гц, H-6), 6,13 (d, 1H, J= 18,4 Гц, H-1'), 5,70 (d, 1H, J= 8,0 Гц, H-5), 3,99 (d, 1H, J= 13,6 Гц, H-5'), 3,97-3,91 (m, 2H, H-3', 4'), 3,80 (dd, 1H, J= 2,0, 12,8 Гц, H-5"). Масс-спектрометрия с электрораспылением (ESMS) (M+1) оценила как 265, наблюдали 265.



Пример 19-7. Получение (S)-изопропил 2-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиридин-1(2H)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-¹³C-пердейтериометилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)fosфориламино)пропаноата, 22.

В раствор незащищенного нуклеозида 21 (207 мг, 0,783 ммоль) и Н-метилимидазола (0,4 мл, 5 ммоль) в ТГФ (4 мл) по каплям добавляли предварительно полученный фосфорхлоридат в ТГФ (1,0 М,

2,35 мл, 2,35 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь медленно нагревали до температуры окружающей среды в течение 1 ч и затем добавляли воду (1 мл) и EtOAc (5 мл). Органический раствор промывали насыщенным водным раствором моноосновного цитрата натрия (2×2 мл), насыщенным водным раствором NaHCO₃ (1×2 мл), высушивали (MgSO₄) и концентрировали при сниженном давлении. Неочищенный продукт очищали при помощи колоночной хроматографии на силикагеле с использованием 0 - 5% ⁱPrOH в CH₂Cl₂ в качестве элюентов с получением фосфорамида, 22 (216 мг, 52%, 1:1 смесь п-диастереомеров) в виде белого твердого вещества: ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 11,54 (s, 1H), 7,56 (d, J= 6,8 Гц, 1H), 7,40-7,35 (m, 2H), 7,23-7,18 (m, 3H), 6,14-5,96 (m, 2H), 5,89 (dd, J= 5,6, 25,6 Гц, 1H), 5,55 (t, J= 8,4 Гц, 1H), 4,85 (dq, J= 1,6, 6,0 Гц, 1H), 4,44-4,32 (m, 1H), 4,25 (m, 1H), 4,06-3,98 (m, 1H), 3,86-3,70 (m, 2H), 1,30-1,08 (m, 9H); ³¹P ЯМР (162 МГц, ДМСО-d₆) δ 4,90, 4,77; LRMS (электроспрей ионизация) [M+H]⁺ рассчитано для C₂₁¹³CH₂₇D₃FN₃O₉P 534,5, найдено 534,4.

Пример 19-8. Получение (2S)-2-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2Н)-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-¹³C-пердейтериометилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(гидрокси)fosфорил)амино пропаноевой кислоты, 23.

Фосфорамидат 22 (147 мг, 0,276 ммоль) суспендировали в триэтиламине (2 мл) и воде (0,5 мл), и нагревали при 60°C в течение 30 ч.

Затем летучие компоненты испаряли при сниженном давлении. Неочищенный продукт очищали при помощи колоночной хроматографии на силикагеле путем элюирования 50-70% ⁱPrOH в CH₂Cl₂ и затем, 0-20% NH₄OH в ⁱPrOH с получением 23 в виде белого твердого вещества (95 мг, 83%): ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,00 (d, J= 8,4 Гц, 1H), 5,98 (d, J= 19,2 Гц, 1H), 5,52 (d, J= 8,4 Гц, 1H), 4,02-3,81 (m, 4H), 1,10 (d, J= 6,8 Гц, 3H); ³¹P ЯМР (162 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,12; Масс-спектрометрия низкого разрешения (LRMS) (электроспрей ионизация) [M+H]⁺ рассчитано для C₁₂¹³CH₁₇D₃FN₃O₉P 416,3, найдено 416,4.

Свойства проб R_p-4, 4, и S_p-4.

Пробы R_p-4, 4, и S_p-4 анализировали при помощи порошковой рентгеновской дифракции, спектрометрии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), Инфракрасной Фурье трансформационной спектроскопии (Фурье-ИК), дифференциальной сканирующей калориметрии, термогравиметрического анализа, гравиметрической сорбции паров, термодинамического анализа растворимости в воде, и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Пример 20. Порошковая рентгеновская дифракция.

Пробы R_p-4, 4, and S_p-4 анализировали при помощи порошковой рентгеновской дифракции в следующем режиме.

a. Bruker AXS/Siemens D5000.

Рентгенограммы порошковой рентгеновской дифракции регистрировали на дифрактометре Siemens D5000 при помощи Cu Kα излучения (40 кВ, 40 мА), θ-θ гониометр, дивергенция V20 и принимающие щели, графитовый вторичный монохроматор и сцинтиляционный счетчик. Эксплуатационные характеристики устройства проверяли при помощи сертифицированного корундового стандарта (NIST 1976). Для сбора данных использовали прогное обеспечение порошковой рентгеновской дифракции Diffrac Plus Commander в. 2,3,1 и данные анализировали и представляли при помощи Diffrac Plus EVA в. 11,0,0,2 или в 13,0,0,2,

Условия окружающей среды.

Пробы, которые исследовали при условиях окружающей среды, получали как плоские поверхностные образцы с использованием порошка по мере получения. Приблизительно 35 мг пробы осторожно упаковывали в полость, врезанную в полированную, с нулевым фоном (510) кремниевую пластину. Пробу вращали в собственной плоскости во время анализа. Подробное описание сбора данных: угловой диапазон: 2-42°20'; размер шага: 0,05°20'; и время сбора: 4 с·степень⁻¹,

b. Bruker AXS C2 GADDS.

Рентгенограммы порошковой рентгеновской дифракции регистрировали на дифрактометре Bruker AXS C2 GADDS при помощи Cu Kα излучения (40 кВ, 40 мА), автоматизированная XYZ стадия, лазерный видео микроскоп для автопозиционирования проб и HiStar 2-мерный площадной индикатор. Рентгеновская оптика состоит из одинарного многослойного зеркала Гебеля соединенного с коллиматором типа "пинхол" 0,3 мм.

Дивергенцию лучей, т.е. эффективный размер рентгеновского луча пробы, составлял приблизительно 4 мм. Непрерывный режим сканирования θ-θ использовали с расстоянием пробы - детектор, составляющим 20 см, что дает эффективный 2θ диапазон, составляющий 3,2°-29,7°. Типично пробы будет подвергнута воздействию рентгеновского луча в течение 120 с. Прогным обеспечением, которое использовали для сбора данных, было GADDS для WNT 4,1,16 и данные анализировали и представляли при помощи Diffrac Plus EVA в. 9,0,0,2 или в. 13,0,0,2,

Условия окружающей среды.

Пробы, которые исследовали при условиях окружающей среды, получали как плоские поверхностные образцы с использованием порошка по мере получения без измельчения. Приблизительно 1-2 мг пробы слегка сжимали на предметном стекле с получением плоской поверхности.

Порошковая рентгеновская дифракция.

Как было найдено при помощи порошковой рентгеновской дифракции, 4 является аморфным (см. фиг. 1). Анализ порошковой рентгеновской дифракции высокого разрешения R_P-4, полученного в соответствии с примером 3, подтвердил получение кристаллического твердого вещества, проявляющего различную порошковую рентгенограмму такую же, что и у S_P-4 (полученного в соответствии с примером 4, способ 4), который также был подтвержден как кристаллическое твердое вещество. Таблица результатов порошковой рентгеновской дифракции для R_P-4 and S_P-4 показана в табл. 1, где все пики проявляют интенсивность, составляющую ≤5% (R_P-4) и не учитывая ≤3% (S_P-4).

Таблица 1. Данные порошковой рентгеновской дифракции для R_P-4 и S_P-4

Данные порошковой рентгеновской дифракции для R _P -4		Данные порошковой рентгеновской дифракции для S _P -4 (Форма 1)	
Угол 2-тета °	Интенсивность %	Угол 2-тета °	Интенсивность %
6,616	51,1	4,900	6,8
7,106	40,5	5,190	19,8
8,980	30,0	7,501	100,0
11,020	21,7	8,355	4,1
11,559	77,1	8,965	7,7
11,950	12,8	9,619	21,2
13,023	5,2	10,145	3,6
14,099	6,2	14,393	4,9
15,121	5,7	16,300	7,0
15,624	5,4	16,688	10,6
16,003	17,8	17,408	5,5
17,882	100,0	17,820	8,2
18,567	8,8	18,262	31,5
19,564	22,7	18,600	6,3
20,280	5,6	18,900	7,3
20,728	42,5	19,150	6,1
21,047	19,9	19,696	4,8
21,671	22,0	20,398	4,4
21,943	23,3	20,710	6,9
22,214	18,9	21,950	6,1
23,074	28,5	22,175	12,2
24,145	30,3	22,511	5,6
24,355	39,1	22,924	3,1
25,366	7,6	23,360	6,5
26,146	36,2	23,538	7,1
27,000	9,0	23,910	7,4
27,313	15,6	24,873	3,7
27,677	22,7	25,123	4,9
28,219	12,8	25,649	4,2
28,661	6,2	26,748	5,2
29,450	6,8	27,339	3,7
29,735	9,4	27,646	3,5
31,372	8,2	28,066	3,1
31,967	10,9	29,050	3,0
32,295	6,4	29,541	3,6
33,001	11,4	30,178	3,8
33,774	11,8	31,648	3,1
34,385	6,6	32,721	3,5
34,734	6,5	33,154	3,0
35,600	7,3	33,923	3,5
35,965	13,1	34,341	3,1
36,409	14,7	35,465	3,5
36,880	7,0	36,923	3,1
37,509	5,9	37,760	3,4
37,870	6,0	38,404	3,3
38,313	5,8	40,416	3,1
38,943	8,4		
40,093	6,6		
40,511	7,8		
41,429	6,5		

Пробу Sp-4 размалывали при помощи ступки и пестика и затем последовательно пропускали через 500 и 250 мкм сита с получением пробы в виде мелкодисперсного порошка. Данную пробу повторно анализировали при помощи порошковой рентгеновской дифракции высокого разрешения, подтверждающей отсутствие изменений формы.

Пример 21. Исследования кристаллизации для Sp-4.

Кристаллический Sp-4 проявляет полиморфизм. Таким образом, аспект направлен на кристаллический Sp-4 и его отдельные полиморфные формы. Sp-4 может существовать в как минимум пяти полиморфных формах, обозначенных как формы 1-5. Дополнительно, может быть также получен аморфный Sp-4. Типичная кристаллизация обеспечивает растворение приблизительно 100 мг Sp-4 в соответствующем объеме кристаллизационного растворителя (ацетонитрила (5 об.), хлороформ (5 об.), н-бутил ацетат (7 об.), дихлорметан (50 об.), анизол (7 об.), и 1:1 МТБЭ/гептан (50 об.)) и затем позволение испарения раствора при 5°C. Были получены различные кристаллические формы, но каждая форма, после фильтрования и/или высушивания, приводила к получению формы 1.

Формы 1, 2 и 3 являются несольватированными формами, 1:1 ДХМ сольватом и 1:1 хлороформным сольватом, соответственно, как было подтверждено рентгеновским анализом для монокристалла и анализом порошковой рентгеновской дифракции. Формы 4 и 5 получали кристаллизацией Sp-4 из растворов ацетонитрила и анизола, соответственно. Достаточные данные не могут быть собраны для определения, являются ли формы 4 и 5 несольватированными, гидрированными или сольватированными, поскольку не были получены монокристаллы достаточного качества. Формы 4 и 5 превратились в форму 1 при фильтровании. Две дополнительные кристаллические формы получали после кристаллизации Sp-4 из н-бутил ацетата (ⁿBuAc) и раствора, содержащего метил-трет-бутиловый простой эфир (МТБЭ) и гептан; после фильтрования обе данные кристаллических форм превратились в форму 1, формы 2 и 3 также превратились в форму 1 при выделении. Форма 1 является несольватированной формой, которая проявляет широкую эндотерму плавления с температурой начала перехода, составляющей 94,3°C и ΔH_{fus} 24,0 кДж моль⁻¹. Дополнительная рентгенограмма порошковой рентгеновской дифракции Sp-4, форма 1, показана на фиг. 4.

Пример 21-1. Sp-4 форма 1.

Перечень пиков Sp-4, форма 1, представлен в табл. 2.

Угол 2-Тета°	Интенсивность %
5,0	74,8
7,3	100,0
7,8	2,2
8,2	6,8
8,8	9,3
9,4	23,5
10,0	8,4
11,4	4,2
13,3	3,0
14,2	6,1
14,9	3,5
16,1	7,9
16,6	13,2
17,3	15,4

17,7	10,1
18,1	42,6
18,4	7,6
18,7	11,4
18,9	5,7
19,3	5,0
19,6	2,9
20,2	8,5
20,5	11,5
20,8	3,6
21,8	7,2
22,0	14,5
22,4	9,6
23,2	5,3
23,4	5,8
23,5	4,6
23,8	7,4
24,0	3,1
24,7	2,5
25,0	13,0
25,5	3,1
26,6	4,5
27,2	3,2
27,5	2,2
28,1	2,9
30,0	3,2

Пример 21-2. Sp-4, форма 2.

Рентгенограмма порошковой рентгеновской дифракции Sp-4, форма 2, показана на фиг. 5.
Перечень пиков Sp-4, форма 2, представлен в табл. 3.

Угол 2-Тета°	Интенсивность %
4,9	44,1
5,1	19,1
6,9	62,1
8,7	6,8
9,8	28,6
10,1	10,4
13,7	7,0
16,7	3,1
19,5	8,9
19,8	45,5
20,1	18,6
20,4	3,6
20,6	25,6
20,9	15,9
21,1	10,9
22,1	3,4
24,6	38,7
24,7	100,0
25,1	61,2
26,1	53,3
39,0	6,3

Пример 21-3. Sp-4, форма 3.

Рентгенограмма порошковой рентгеновской дифракции Sp-4, форма 3, показана на фиг. 6.
Перечень пиков Sp-4, форма 3, представлен в табл. 4.

Угол 2-Тета °	Интенсивность %
5,0	10,0
6,9	23,3
9,8	22,6
19,7	34,8
20,6	100,0
21,8	10,5
24,6	65,3
34,7	4,1

Пример 21-4. SP-5, форма 4.

Рентгенограмма порошковой рентгеновской дифракции Sp-4, форма 4, представлена на фиг. 7.
Перечень пиков Sp-4, форма 4, представлен в табл. 5.

Угол 2-Тета °	Интенсивность %
5,0	29,8
6,8	100,0
8,2	4,8
8,7	5,2
9,9	3,8
13,7	1,7
14,9	4,8
19,9	22,5
20,4	2,1
20,6	20,0
20,9	20,0
24,7	3,4
24,9	29,9
25,1	1,5
36,8	3,1

Пример 21-5. Sp-4, форма 5.

Рентгенограмма порошковой рентгеновской дифракции Sp-4, форма 5, представлена на фиг. 8.
Перечень пиков Sp-4, форма 5, представлен в табл. 6.

Угол 2-Тэта °	Интенсивность %
5,2	52,9
6,6	100,0
7,1	25,9
9,7	12,1
10,4	16,4
13,4	11,4
15,7	25,8
19,1	31,1
19,9	12,9
20,0	9,0
21,3	3,5
25,0	22,3
25,6	2,3
26,3	5,9
26,9	2,0
31,7	2,1

Пример 21-6. Sp-4 (аморфный).

Рентгенограмма порошковой рентгеновской дифракции для аморфного Sp-4 показана на фиг. 9.

Пример 22. Рентгеновская кристаллография монокристалла Sp-4 и его сольватов.

Пример 22-1. Рентгеновская кристаллография монокристалла Sp-4 (форма 1).

Фиг. 10 показывает рентгеновскую кристаллическую структуру для Sp-4 форма 1. На данной фигуре показан вид молекул формы 1 из кристаллической структуры, где показана использованная схема нумерации. Эллипсоиды анизотропного смещения атомов для не-водородных атомов показаны на уровне вероятности 50%. Атомы водорода смещены со сколь угодно малым радиусом.

Решение структур получали прямым способом, полноматричная оптимизация методом наименьших квадратов при F^2 с весовым коэффициентом

$$w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0,0592P)^2 + (0,6950P),$$

где $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, параметры анизотропного смещения, коррекция эмпирического поглощения при помощи сферических гармоник, реализованных в SCALE3 ABSPACK алгоритме масштабирования. Конечный

$$wR^2 = \{\sum[w(F_o^2 - F_c^2)^2]/\sum[w(F_o^2)^2]^{1/2}\} = 0,0871$$

для всех данных, стандартный $R_1 = 0,0329$ при F значениях 7090 отражений с $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1,016$ для всех данных и 870 параметров. Конечное Δ/σ (макс.) 0,001, Δ/σ (среднее), 0,000. Конечная разностная карта от +0,534 до -0,36 $e\text{ \AA}^{-3}$.

Таблица 7. Параметры монокристаллов формы 1

Молекулярная формула	<chem>C22H29F1N3O9P1</chem>				
Молекулярная масса	529,45				
Кристаллическая система	Моноклинная				
Пространственная группа	$P2_1$	a	20,0898(5) \AA ,	α	90°,
		b	6,10290(10) \AA ,	β	112,290(3)°,
		c	23,0138(6) \AA ,	γ	90°
V	2610,79(10) \AA^3				
Z	4				
D_c	1,347 г.см $^{-3}$				
μ	1,475 mm^{-1}				
Источник, λ	Cu K α , 1,54178 \AA				
$F(000)$	1112				
T	100(1)K				
Кристалл	Бесцветная пластина, 0,12 x 0,09 x 0,03мм				
Данные усечены до	0,80 \AA				
θ_{\max}	74,48°				
Полнота	99,4%				
Отражения	14854				
Уникальные отражения	7513				
$R_{\text{внутр}}$	0,0217				

Пример 22-2. Рентгеновская кристаллография монокристалла для Sp-4 (форма 2).

Фиг. 11 показывает рентгеновскую кристаллическую структуру для Sp-4, форма 2. На данной фигуре показан вид молекул формы 2 из кристаллической структуры, где показана использованная схема нумерации.

Гетероатомы решали изотропно из-за очень слабых данных. Атомы водорода не отображены.

Разрешение структур получали прямым способом, полноматричная оптимизация методом наименьших квадратов при F^2 с весовым коэффициентом

$$w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0,0975P)^2 + (10,6969P),$$

где $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, параметры анизотропного смещения, коррекция эмпирического поглощения при помощи сферических гармоник, реализованных в SCALE3 ABSPACK алгоритме масштабирования. Конечный

$$wR^2 = \{\sum[w(F_o^2 - F_c^2)^2]/\sum[w(F_o^2)^2]^{1/2}\} = 0,1883$$

для всех данных, стандартный $R_1 = 0,0741$ при F значениях 2525 отражений с $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1,05$ для всех данных и 158 параметров. Конечное Δ/σ (макс.) 0,000, Δ/σ (среднее), 0,000. Конечная разностная карта от +1,388 до -0,967 $e\text{ \AA}^{-3}$,

Таблица 8. Параметры монокристаллов формы 2

Молекулярная формула	<chem>C23H31Cl2FN3O9P</chem>				
Молекулярная масса	614,38				
Кристаллическая система	Моноклинная				
Пространственная группа	<i>P2₁</i>	<i>a</i>	12,8315(3) Å,	<i>α</i>	90°,
		<i>b</i>	6,14530(10) Å,	<i>β</i>	91,752(2)°,
		<i>c</i>	17,6250(4) Å,	<i>γ</i>	90°
V	1389,14(5) Å ³				
Z	2				
<i>D_e</i>	1,469 г.см ⁻³				
<i>μ</i>	3,196 мм ⁻¹				
Источник, λ	Cu-K, 1,54178 Å				
<i>F(000)</i>	640				
<i>T</i>	293(2) K				
Данные усечены до	0,80 Å				
<i>θ_{max}</i>	62,23°				
Полнота	91,1%				
Отражения	3528				
Уникальные отражения	2562				
<i>R_{внутр}</i>	0,0227				

Пример 22-3. Рентгеновская кристаллография монокристалла для S_p-4 (форма 2).

Фиг. 12 отображает рентгеновскую кристаллическую структуру (ORTEP - анизотропный) S_p-4 (форма 2). Кристаллическая структура метиленхлоридного сольвата S_p-4 (форма 2), C23H31N3PO9FCl2, приводит к получению моноклинной пространственной группы P2₁ (систематические отсутствия 0k0: k=odd) с *a*=12,8822(14) Å, *b*=6,1690(7) Å, *c*=17,733(2) Å, *β*=92,045(3)°, *V*=1408,4(3) Å³, *Z*=2 и *d_{расч}*=1,449 г/см³, интенсивность кристаллографических данных зарегистрирована на площадном детекторе Rigaku Mercury CCD с использованием графит-монохроматированного Mo-Кα излучения (*λ*=0,71073 Å) при температуре 143K. Предварительное индексирование выполняли в серии из двенадцати 0,5° изображений вращения с воздействиями, составляющими 30 с. Всего было собрано 648 изображений вращения с расстоянием кристалл - детектор, составляющим 35 мм, 20 углом отклонения, составляющим -12°, ширинами вращений, составляющими 0,5° и воздействиями, составляющими 30 с:

скан № 1 представлял собой ф-скан от 315° до 525° при *ω*=10° и *χ*=20°;

скан № 2 представлял собой ω-скан от -20° до 5° при *χ*=-90° и *φ*=315°;

скан № 3 представлял собой ω-скан от -20° до 4° при *χ*=-90° и *φ*=135°;

скан № 4 представлял собой ω-скан от -20° до 5° при *χ*=-90° и *φ*=225°;

скан № 5 представлял собой ω-скан от -20° до 20° при *χ*=-90° и *φ*=45°.

Изображения вращения обрабатывали при помощи CrystalClear (CrystalClear: Rigaku Corporation, 1999), получая перечень неусредненных *F*² и *σ(F²)* значений, которые затем передавали в прогный пакет Crystal Structure (CrystalStructure: Crystal Structure Analysis Package, Rigaku Corp. Rigaku/MSC (2002)) для дополнительной обработки и решения структуры на компьютере Dell Pentium III. Всего было измерено 7707 отражений в диапазонах 5,48 ≤ *θ* ≤ 50,04°, -14 ≤ *h* ≤ 15, -7 ≤ *k* ≤ 6, -19 ≤ *l* ≤ 21, приводя к получению 4253 уникальных отражений (*R_{внутр}* = 0,0180). Данные интенсивности корректировали для эффекта Лоренца и поляризационного эффекта и для поглощения с использованием REQAB (минимальное и максимальное пропускание 0,824, 1,000).

Структуры решали прямыми способами (SIR97, SIR97: Altomare, A., M. Burla, M. Camalli, G. Casciaro, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. Moliterni, G. Polidori & R. Spagna (1999). J. Appl. Cryst., 32, 115-119). Оптимизацию производили при помощи полноматричного метода наименьших квадратов на основе *F*² с использованием SHELLXL-97 (SHELXL-97: Sheldrick, G.M. (2008) ActCryst., A64, 112-122). Все отражения использовали во время оптимизации.

Использовали схему весовых коэффициентов использовали

$$w=1/[σ^2(F_o^2) + 0,0472P^2 + 0,4960P],$$

$$\text{где } P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3.$$

Неводородные атомы оптимизировали анизотропно и атомы водорода оптимизировали с использованием модели "райдинга". Оптимизацию сводили в *R₁*=0,0328 и *wR₂*=0,0817 для 4046 отражений, в которых *F* > 4*σ(F)* и *R₁*=0,0348, *wR₂*=0,0838 и GOF = 1,056 для всех 4253 уникальных ненулевых отражений и 358 переменных

$$(R_1 = \sum ||F_o|| - |F_c|| / \sum |F_o|; wR_2 = \{\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2\}^{1/2}; GOF = \{\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n - p)\}^{1/2};$$

где *n* = количество отражений и *p* = количество оптимизированных параметров). Максимальное *Δ/σ* (в конечном цикле наименьших квадратов составляло 0,000 и два наиболее выдающихся пика в конечном дифференциальном Фурье составляли +0,312 и -0,389 e/Å³. Flack абсолютный структурный пара-

метр оптимизировали до -0,06(6), таким образом подтверждая стереохимию титульного соединения.

Табл. 1 перечисляет информацию о ячейках, параметры сбора данных, и данные оптимизации. Конечные позиционные и эквивалентные изотропные термические параметры приведены в табл. 2. Анизотропные термические параметры приведены в табл. 3. ("ORTEP-II: A Fortran Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations". C.K. Johnson (1976) ORNL-5138,) отображено представление молекулы с 30% вероятностными термическими эллипсоидами.

Таблица 9. Краткое описание определения структуры соединения $\text{S}_\text{p}-4 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$,

Формула:	$\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{PO}_9\text{FCl}_2$
Молекулярная масса:	614,38
Кристаллический класс:	моноclinный
Пространственная группа	P_2_1 (#4)
Z	2
Постоянные ячейки:	
a	12,8822(14) Å
b	6,1690(7) Å
c	17,733(2) Å
β	92,045(3)°
V	1408,4(3) Å ³
μ	3,48 см ⁻¹
Размер кристалла, мм	0,42 x 0,12 x 0,10
$D_{\text{расч}}$	1,449 г/см ³
$F(000)$	640
Излучение:	Mo-K α ($\lambda=0,71073$ Å)
2θ диапазон	5,48 – 50,04 °
hkl собранные:	-14 ≤ h ≤ 15; -7 ≤ k ≤ 6; -19 ≤ l ≤ 21
№ измеренных отражений:	7707
№ уникальных отражений:	4253 ($R_{\text{внутр}}=0,0180$)
№ наблюдаемых отражений	4046 ($F>4\sigma$)
№ отражений, которые используют при оптимизации	4253
№ параметров	358
R индексы ($F>4\sigma$)	$R_1=0,0328$ $wR_2=0,0817$
R индексы (все данные)	$R_1=0,0348$ $wR_2=0,0838$
GOF:	1,056
Конечные дифференциальные пики, е/Å ³	+0,312, -0,389

Пример 22-4. Рентгеновская кристаллография монокристалла $\text{S}_\text{p}-4$ (форма 3).

Фиг. 13 показывает рентгеновскую кристаллическую структуру для $\text{S}_\text{p}-4$, форма 3. На данной фигуре показан вид молекул формы 3 из кристаллической структуры, где показана использованная схема нумерации. Эллипсоиды анизотропного смещения атомов для не-водородных атомов показаны на уровне вероятности 50%. Атомы водорода смещены со сколь угодно малым радиусом.

Решение структур получали прямыми способами, полноматричная оптимизация методом наименьших квадратов при F^2 с весовым коэффициентом

$$w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0,0512P)^2 + (0,6810P),$$

где $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, параметры анизотропного смещения, коррекция эмпирического поглощения при помощи сферических гармоник, реализованных в SCALE3 ABSPACK алгоритме масштабирования. Конечный

$$wR^2 = \{\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2]/\sum [w(F_o^2)^2]^{1/2}\} = 0,0796$$

для всех данных, стандартный $R_1 = 0,0294$ при F значениях 2486 отражений с $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1,068$ для всех данных и 377 параметров. Конечное $\Delta/\sigma(\text{макс.})$ 0,001, $\Delta/\sigma(\text{среднее})$, 0,000. Конечная разностная карта от +0,211 до -0,334 е Å⁻³.

Таблица 10. Параметры монокристалла для формы 3

Молекулярная формула	<chem>C23H30Cl3F1N3O6P1</chem>			
Молекулярная масса	648,82			
Кристаллическая система	Моноклинная			
Пространственная группа	<i>P21</i>	<i>a</i>	12,9257(4) Å,	α
		<i>b</i>	6,18080(10) Å,	β
		<i>c</i>	18,0134(4) Å,	γ
<i>V</i>	1430,15(6) Å ³			
<i>Z</i>	2			
<i>D_c</i>	1,507 г.см ⁻³			
μ	3,977 мм ⁻¹			
Источник, λ	Cu K α , 1,54178 Å			
<i>F</i> (000)	672			
<i>T</i>	100(1) К			
Кристалл	Бесцветная игла, 0,22 x 0,03 x 0,02 мм			
Данные усечены до	0,80 Å			
θ_{\max}	74,41°			
Полнота	69,1%			
Отражения	3062			
Уникальные отражения	2607			
<i>R</i> _{внутр}	0,0198			

Пример 23. Стабильность при повышенных температурах и относительная влажность.

Пробу R_p-4 хранили в камере влажности при 40°C и 75% относительной влажности в течение одной недели и пробу повторно анализировали при помощи порошковой рентгеновской дифракции. Порошковая дифрактограма, полученная для R_p-4, не показывала существенных измерений в течение хода эксперимента, что означало отсутствие наблюдаемых изменений твердой формы. Это должно отличаться от пробы 4, которая разжижается в течение приблизительно 16 ч хранения при 40°C и 75% относительной влажности. Действительно, иллюстрация разжижающейся природы 4 приведена ниже. Пробу 4 пропускали через 250 мкм сита, затем пробы хранили при 40°C/75% относительной влажности и 25°C/53% относительной влажности и были произведены визуальные наблюдения через регулярные интервалы времени. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 11. Стабильность 4 к повышенной относительной влажности

Условия	<i>t</i> = 1,5 часа	<i>t</i> = 4,5 часа	часа		
			<i>t</i> = 6,5 часа	<i>t</i> = 8,5 часа	<i>t</i> = 73 часа
40°C / 75% относительной влажности	Разжижение	-	-	-	-
25°C / 53% относительной влажности	Отсутствие разжижения	Клейкое твердое вещество	Частичное разжижение	Практически полное разжижение	Разжижение

После хранения при 40°C и 75% относительной влажности проба S_p-4 разжижалась изнутри в течение 16 ч. Например, пробу S_p-4 измельчали при помощи ступки и пестика, и затем последовательно пропускали через 500 и 250 мкм сита с получением пробыв виде мелкодисперсного порошка. Пробы данного вещества хранили при 40°C и 75% относительной влажности и 25°C и 53% относительной влажности и были произведены визуальные наблюдения через регулярные интервалы времени. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 12. Стабильность S_p-4 к повышенной относительной влажности

Условия	<i>t</i> = 1,5 часа	<i>t</i> = 4,5 часа	<i>t</i> = 104 часа
40 °C / 75 % относительной влажности	Отсутствие разжижения	Разжижение	-
25 °C / 53 % относительной влажности	Отсутствие разжижения	Отсутствие разжижения	Отсутствие разжижения

Анализ порошковой рентгеновской дифракции пробы после хранения при 25°C и 53% относительной влажности через 104 часа показал отсутствие значительных изменений в полученных дифракторамах, что указывало на отсутствие изменения в форме.

Пример 24. Фурье трансформационная - инфракрасная (Фурье-ИК) спектрометрия.

Данные регистрировали на Perkin-Elmer Spectrum One, оснащенном универсальным устройством для отбора проб с нарушенным полным внутренним отражением (ATR). Данные регистрировали и анализировали при помощи прогного обеспечения Spectrum в. 5.0.1.

ИК спектры получали для 4, R_P-4, и S_P-4, они приведены на фиг. 5-7, соответственно. Выбранные пики, с длинами волн (см⁻¹) приведены ниже:

4: ~1680, ~1454, ~1376, ~1205, ~1092, ~1023 (Фиг. 14);

R_P-4: ~1742, ~1713, ~1679, ~1460, ~1377, ~1259, ~1157, ~1079 (Фиг. 15); и

S_P-4 (Форма 1): ~1743, ~1713, ~1688, ~1454, ~1378, ~1208, ~1082 (Фиг.

16).

Пример 25. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) и термогравиметрический анализ (ТГА).

Данные дифференциальной сканирующей калориметрии регистрировали на TA Instruments Q2000, оснащенном 50-позиционным автосэмплером. Калибровка по теплопемкости была проведена при помощи сапфира, а калибровка по энергии и температуре была проведена при помощи сертифицированного индия.

Дифференциальная сканирующая калориметрия модулированной температуры была проведена на пробах, каждая из которых типично составляла 0,8-1,2 мг, в алюминиевом испарителе, удерживаемом на штифтах, используя базовую скорость нагревания, составляющую 2°C·мин⁻¹ и параметры модулирования температуры ±0,2°C·мин⁻¹ и 40 с. Над пробой поддерживали поток сухого азота при скорости 50 мл·мин⁻¹.

Прогным обеспечением для контроля прибора было Advantage для Q Series в. 2.8.0.392 и Thermal Advantage в. 4.8.3, и данные анализировали при помощи Universal Analysis в. 4.3A.

Данные дифференциальной сканирующей калориметрии регистрировали на дифференциальном сканирующем калориметре Mettler 823e, оснащенном 34-позиционным автосэмплером. Прибор калибровали по энергии и температуре при помощи сертифицированного индия. Каждая проба составляла, типично, 0,8-1,2 мг, в алюминиевом испарителе, удерживаемом на штифтах, их нагревали при 10°C·мин⁻¹ с 25 до 250°C. Над пробой поддерживали поток сухого азота при скорости 50 мл·мин⁻¹. Прогным обеспечением для контроля прибора и анализа данных было STARe в. 9.20.

Данные термогравиметрического анализа регистрировали на термогравиметрическом анализаторе/SDTA 851e Mettler, оснащенном 34-позиционным автосэмплером. Прибор калибровали по температуре при помощи сертифицированного индия. Каждую пробу, которая составляла, типично, 8-12 мг, загружали в предварительно взвешенный алюминиевый тигель и нагревали при 10°C·мин⁻¹ от температуры окружающей среды до 350°C. Над пробой поддерживали поток азота при скорости 50 мл·мин⁻¹. Прогным обеспечением для контроля прибора и анализа данных было STARe в. 9.20.

Анализ дифференциальной сканирующей калориметрии 4 показан в виде одной широкой эндотермы с началом при 58,7°C (ΔH 14 Дж·г⁻¹), подтвержденной как молекулярная релаксация во время стеклования при помощи дополнительного анализа модулированной дифференциальной сканирующей калориметрии (фиг. 17). Термогравиметрический анализ 4 не показал потери массы перед разложением выше 240°C, подтверждая, что вещество является несольватированным. Поскольку анализ порошковой рентгеноисковой дифракции 4 подтвердил аморфность материала, то анализ модулированной дифференциальной сканирующей калориметрии был выполнен в попытке рассчитать температуру стеклования, которая, как было найдено, составляет 57°C.

Анализ дифференциальной сканирующей калориметрии показал одну крутую эндотерму с началом при 136,2°C (ΔH 76 Дж·г⁻¹), подтверждающую плавление при помощи высокотемпературной микроскопии. Обращаясь к фиг. 18, термогравиметрический анализ R_P-4 показал отсутствие потери массы перед разложением выше 240°C, подтверждая, что вещество является несольватированным.

Анализ дифференциальной сканирующей калориметрии S_P-4 показал одну широкую эндотерму с началом при 93,9°C (ΔH 43 Дж·г⁻¹), подтверждающую плавление при помощи высокотемпературной микроскопии. Обращаясь к фиг. 19, термогравиметрический анализ S_P-4 показал отсутствие потери массы перед разложением выше 240°C, подтверждая, что вещество является несольватированным.

Пример 26. Гравиметрическая сорбция паров (ГСП).

SMS DVS Intrinsic.

Изотермы сорбции получали при помощи анализатора сорбции влаги SMS DVS Intrinsic, под контролем прогного обеспечения SMS Analysis Suite. Температуру пробы поддерживали при 25°C при помощи инструментального контроля. Влажность контролировали путем смешивания потоков сухого и влажного азота, с общей скоростью потока, составляющей 200 мл·мин⁻¹. Относительная влажность согласно измерениям при помощи зонда Calibrated Rotronic (динамический диапазон 1,0-100% относительной влажности), расположенного около пробы. Изменение массы, (релаксацию массы) пробы как функции% относительной влажности постоянно контролировали при помощи микровесов (точность ±0,005 мг).

Пробу, составляющую типично 5-20 мг, помещали в плетеную корзину из нержавеющей стали без учета массы тары в условиях окружающей среды. Пробу загружали и выгружали при 40% относительной влажности и 25°C (типичные комнатные условия). Изотерму адсорбции влаги выполняли, как описано ниже (2 сканирования давали 1 полный цикл). Стандартную изотерму выполняли при 25°C при интервалах 10% относительной влажности в диапазоне 0,5-90% относительной влажности.

Таблица 13. Параметры способа для экспериментов SMS DVS Intrinsic

Параметры	Значения
Адсорбция - Сканирование 1	40 - 90
Десорбция / Адсорбция - Сканирование 2	90 - 0, 0 - 40
Интервалы (% относительной влажности)	10
Количество сканирований	2
Скорость потока (мл.мин ⁻¹)	200
Температура (°C)	25
Стабильность (°С.мин ⁻¹)	0,2
Период сорбции (часов)	6 часов простоя

Пробу восстанавливали после завершения изотермы и повторно анализировали при помощи порошковой рентгеновской дифракции.

ГСП анализ показал, что R_p-4 является не гигроскопичным, проявляющим обратимое поглощение приблизительно 0,2 мас.% воды от 0 до 90% относительной влажности. Повторный анализ пробы при помощи порошковой рентгеновской дифракции после ГСП эксперимента не показал изменений формы.

Пробу S_p-4 измельчали при помощи пестика и ступки и затем последовательно пропускали через 500 и 250 мкм сита с получением пробы в виде мелкодисперсного порошка, который затем анализировали при помощи модифицированного одноциклического способа. Пробу отбирали при от 40% относительной влажности (приблизительно окружающей среды) до 60% относительной влажности, вместо 90% для стандартного способа, и затем повторяли по циклу до 0% и снова до 40% относительной влажности. Данный анализ показал, что S_p-4 является не гигроскопическим до 60% относительной влажности, с обратимым поглощением ~0,2% по массе воды при от 0 до 60% относительной влажности.

Пример 27. Термодинамический анализ растворимости в воде.

Растворимость в воде определяли при помощи суспендирования достаточного количества соединения в воде с получением максимальной конечной концентрации, составляющей $\geq 10 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ свободной от исходного вещества формы соединения. Суспензию приводили в равновесное состояние при 25°C в течение 24 ч, а затем измеряли значение pH. Затем данную суспензию фильтровали через фильтр из стекловолокна C на планшету на 96 ячеек. Фильтрат затем разбавляли на множитель 101, количественное определение проводили при помощи ВЭЖХ, где рефером был исходный раствор приблизительно 0,1 мг·мл⁻¹ в ДМСО. Впрыскивали различные объемы стандартных, разведенных и неразведенных растворов проб. Растворимость рассчитывали при помощи площадей пиков, определенных при помощи интегрирования пика, найденного при том же самом времени удерживания, что и основной пик при впрыскивании стандарта.

Таблица 14. Параметры способа ВЭЖХ для измерений растворимости

Тип способа:	Обратная фаза с градиентным элюированием		
Колонка:	Phenomenex Luna, C18 (2) 5мкм 50 x 4,6 мм		
Температура колонки (°C):	25		
Стандартные впрыскивания (мкл):	1, 2, 3, 5, 7, 10		
Тестовые впрыскивания (мкл):	1, 2, 3, 10, 20, 50		
Детекция:			
Длина волн, ширина спектра (нм) :	260,80		
Скорость потока (мл.мин ⁻¹):	2		
Фаза А:	0,1% ТФК в воде		
Фаза В:	0,085% ТФК в ацетонитриле		
Расписание:	Время (мин)	% Фаза А	% Фаза В
	0,0	95	5
	1,0	80	20
	2,3	5	95
	3,3	5	95
	3,5	95	5
	4,4	95	5

Анализ был выполнен при указанных выше условиях на системе серии Agilent HP 1100, оснащенной диодно-матричным детектором и при помощи прогного обеспечения ChemStation в. B.02.01-SR1.

Таблица 15. Результат растворимости в воде для R_P-4, 4, и S_P-4,

Идентификационный номер пробы	pH неотфильтрованной смеси	Растворимость / мг.мл ⁻¹	Комментарии
<i>R_P-4</i> 4	7,12	1,58	Суспензия
	7,03	6,11	Остаточное твердое вещество
<i>S_P-4</i>	6,88	5,65	Остаточное твердое вещество

Пример 28. Определение химической чистоты при помощи ВЭЖХ.

Различные условия ВЭЖХ могут быть использованы для определения химической чистоты соединений, описанных в данной заявке. Один из таких примеров описан выше касательно исследований термодинамической растворимости в воде. Другой пример описан ниже.

Условия ВЭЖХ:

ЖХ:	Модуль разделения Waters Alliance 2695, детектор Waters 2996 PDA и программное обеспечение Waters Empower 2 (версия 6.00)
Колонка:	Phenomenex LunaC18(2); 4,6 x 50 мм; 3 мкм
Скорость потока:	1,2 мл/мин
Объем впрыскивания:	10 мкл
Подвижная фаза:	Растворитель А: 95% вода с 5% метанола и 10м М ацетата аммония; pH~5,3 Растворитель В: MeOH с 10 mM ацетата аммония
Градиент:	удерживание при 0%В 3 мин 0-47%В 3-4 мин удерживание при 47 %В 4-10 мин 47%-74%В 10-11 мин удерживание при 74%В 11-13,5 мин возврат в 0%В 13,5-13,6 мин удерживание при 0%В 13,6-15,5 мин

В данных условиях, чистоту 4, R_P-4, и S_P-4 определяли как составлявшую ~99,6, ~99%, и ~99,5%, соответственно. Отмечено, что более высокие степени чистоты могут быть достигнуты путем оптимизации способов, описанных выше.

Исследование дифрактограмм порошковой рентгеновской дифракции показывает, что два кристаллические одинарные диастереоизомеры давали различные дифрактограммы порошковой рентгеновской дифракции. Дополнительно, существовала отчетливая разница между температурами плавления двух кристаллических диастереоизомеров, где R_P-4 имеет значительно более высокую температуру начала плавления, чем S_P-4 (136°C по сравнению с 94°C).

Пример 29. Способы дополнительного разделения.

Следующие способы разделения методом сверхкритической флюидной хроматографии (условия приведены ниже) приводили к адекватному разделению смеси диастереомеров, R_P-4 и S_P-4,

Препаративный способ:	Аналитический способ:
Chiralpak AS-H (2 x 25 см) SN# 07-8656	Chiralpak AS-H (25 x 0,46 см)
20% метанол/CO ₂ (100 бар)	20% метанол/CO ₂ (100 бар)
50 мл/минут, 220 нм	3 мл/минут, 220 нм.
Конц.: 260мг/30 мл метанол, объем впрыскивания.: 1,5 мл	

Следующие условия разделения при помощи сверхкритической флюидной хроматографии (условия приведены ниже), привели к адекватному разделению смеси диастереомеров, R_P-4 и S_P-4,

Препаративный способ:	Аналитический способ:
Chiralpak IA(2 x 15 см) 802091	Chiralpak IA(15 x 0,46 см)
30% изопропанол (0,1% DEA)/CO ₂ , 100 бар	40% метанол (ДЭА)/CO ₂ , 100 бар
60 мл/минут, 220 нм.	3 мл/минут, 220 нм
Объем впрыскивания: 2 мл, 20 мг/мл метанола	

Таблица 16. Краткое описание результатов, полученных из характеристик партии of R_P-4, 4, и S_P-4

Анализ	R _P -4	4	S _P -4
Протонный ЯМР	Один диастереоизомер	1:1 Смесь диастереоизомеров	Один диастереоизомер
Порошковая рентгеновская дифракция	Кристаллический – отличается от S _P -4	Аморфный	Кристаллический – отличается от R _P -4
Дифференциальная сканирующая калориметрия	Эндотерма; плавление - 136°C	Эндотерма; 59°C	Эндотерма; плавление - 94°C
Термогравиметрический анализ	Отсутствует потеря массы, разложение >240°C	Отсутствует потеря массы, разложение >240°C	Отсутствует потеря массы, разложение >240°C
IR	См. выше	См. выше	См. выше
Растворимость в воде (мг.мл ⁻¹)	1,58	6,11	5,65
Степень чистоты по ВЭЖХ	96,9 %	99,6 %	99,5 %
40°C / 75 % относительной влажности	Отсутствуют изменения формы	Разжижение изнутри 1,5 часа	Разжижение изнутри 4,5 часа
25°C / 53 % относительной влажности	-	Разжижение	Отсутствуют изменения формы
ГСП	Не гигроскопичен до 90 % относительной влажности	-	Не гигроскопичен до 60 % относительной влажности

Пример 30. Рентгеновская кристаллография 8 (SP-изомер).

Соединение 8 (SP-изомер), C₁₈H₂₁N₂PO₇, кристаллизует в моноклинной пространственной группе P2₁ (систематические отсутствия 0k0: k=odd) с a=5,3312(4)Å, b=15,3388(8)Å, c=23,7807(13)Å, β=92,891(3)°, V=1942,2(2)Å³, Z=4, и d_{calc}=1,397 г/см³. Данные интенсивности рентгеновского излучения регистрировали на матричном детекторе Bruker APEXII CCD с применением графит-монохроматированного Mo-Кα излучения (λ=0,71073 Å) при температуре 100(1)К. Фиг. 20А и 20В показывают молекулы, пронумерованные 1 и 2, соответственно, ассиметричного элемента.

Предварительное индексирование выполняли из серии тридцати шести 0,5° рамок вращения со временами воздействия, составляющими 30 с. Всего было собрано 3608 рамок с расстоянием кристалл-детектор 70,00 мм, шириной вращения 0,5° и временами воздействия, составляющими 20 с.

Тип сканирования	2θ	ω	φ	χ	рамки
φ	-35,50	279,40	27,32	48,96	725
φ	24,50	22,31	35,56	69,08	692
ω	-13,00	321,68	247,79	69,08	95
φ	34,50	204,08	28,21	-92,80	293
φ	-30,50	310,60	214,10	54,21	361
φ	32,00	304,67	24,47	50,72	722
φ	-35,50	122,14	316,59	-78,84	720

Рамки вращения интегрировали при помощи SAINT (Bruker (2009) SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.) с получением перечня неусредненных F² и σ(F²) значений, которые затем пропускали в SHELLXTL (Bruker (2009) SHELLXTL. Программный пакет Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.) был использован для дальнейшей обработки и решения структуры на компьютере Dell Pentium 4. Всего было измерено 6909 отражений в диапазонах 1,58 ≤ θ ≤ 25,09°, -6 ≤ h ≤ 6, -18 ≤ k ≤ 18, -28 ≤ l ≤ 28 с получением 6909 уникальных отражений (R_{внутр} = 0,0581). Данные интенсивности корректировали для эффектов Лоренца и поляризации и для поглощения при помощи SADABS (Sheldrick, G.M. (2007) SADABS. University of Gottingen, Germany.) (минимальное и максимальное пропускание 0,6093, 0,7452).

Структуру решали прямыми способами (SHELXS-97 (Sheldrick, G.M. (2008) ActCryst. A64, 112-122,)). Оптимизацию проводили полноматричным методом наименьших квадратов на основе F² с использованием SHELXL-97 (Sheldrick, G.M. (2008) ActCryst. A64, 112-122,). Во время оптимизации использовали все отражения. Использовали схему весовых коэффициентов

$$w=1/[\sigma^2(F_o)^2 + (0,0000P)^2 + 14,0738P] \text{ где } P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3.$$

Неводородные атомы оптимизировали анизотропно и атомы водорода оптимизировали при помощи "райдинг" модели. Оптимизацию сводили к R1 = 0,0847 и wR2 = 0,1899 для 6173 наблюдаемых отражений, для которых F > 4σ(F) и R1=0,0963 и wR2=0,1963 и GOF = 1,119 для всех 6909 уникальных ненулевых отражений и 512 переменных

$$(R1 = \sum ||F_o|| - |F_c|| / \sum |F_o||; wR2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2}; GOF = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (n - p)]^{1/2};$$

где n = количество отражений и p = количество оптимизированных параметров). Максимальное A/o в конечном цикле метода наименьших квадратов составляло 0,000 и два наиболее выдающихся пика в последнем дифференциальном Фурье цикле составляли +0,402 и -0,559 e/A³.

Таблица 17. Краткое описание определения структуры соединения 8 (SP-изомер)

Эмпирическая формула	C ₁₈ H ₂₁ N ₂ PO ₇
Молекулярная масса	408,34
Температура	100(1) K
Длина волны	0,71073 Å
Кристаллическая система	моноclinная
Пространственная группа	P2 ₁
Константы ячеек:	
a	5,3312(4) Å
b	15,3388(8) Å
c	23,7807(13) Å
β	92,891(3)°
Объем	1942,2(2) Å ³
Z	4
Плотность (рассчитанная)	1,397 Mg/m ³
Коэффициент поглощения	0,185 mm ⁻¹
F(000)	856
Размер кристалла	0,40 x 0,10 x 0,08 mm ³
Диапазон Тэта для сбора данных	1,58 - 25,09°
Диапазоны индексов	-6 ≤ h ≤ 6, -18 ≤ k ≤ 18, -28 ≤ l ≤ 28
Собранные отражения	6909
Независимые отражения	6909 [R(внутр) = 0,0581]
Полнота по тэта = 25,09°	99,6 %
Коррекция на поглощение	Полуэмпирически из эквивалентов
Максимальное и минимальное пропускание	0,7452 и 0,6093
Способ оптимизации	Полноматричный метод наименьших квадратов по F ²
данные / ограничения / параметры	6909 / 1 / 512
Степень согласия по F ²	1,119
Конечные R индексы [I>2сигма(I)]	R1 = 0,0847, wR2 = 0,1899
R индексы (все данные)	R1 = 0,0963, wR2 = 0,1963
Абсолютный структурный параметр	0,1(2)
Наибольший дифф. пик и вакансия	0,402 и -0,559 e.Å ⁻³

Пример 31. Биологическая активность/

Клетки, содержащие репликоны, высевали на 3,000 клеток/ячейка (50 мкл) в белые/непрозрачные планшеты на 96 ячеек, или 1,500 клеток/ячейка (25 мкл) в белые/непрозрачные планшеты на 384 ячеек. 50 мкл 2Х соединения добавляли в планшеты на 96 ячеек или 25 мкл 2Х соединения добавляли в планшеты на 384 ячеек. Планшеты инкубировали при 37°C в увлажненной 5% CO₂ атмосфере в течение 4 дней. После инкубирования, добавляли реагент Bright-Glo (50 мкл для планшеты на 96 ячеек, или 25 мкл для планшеты на 384 ячеек) для измерения репортера люциферазы светлячков для репликации вируса гепатита С. Процент ингибиции рассчитывали на фоне лекарственного контроля.

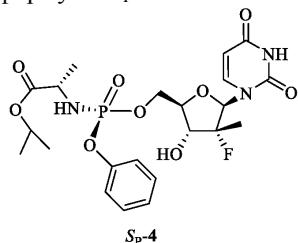
Соединение	активность репликонов вируса гепатита С (мкM)
4	0,58
R _P .4	2,87
S _P .4	0,13

$R_p\text{-}4$ и $S_p\text{-}4$ были продемонстрированы как имеющие широкий охват генотипов. Например, было показано, что оба имеют активность в отношении вируса гепатита С, генотипы 1-4.

Объект изобретения патентной заявки США № 12/053,015 и предварительных патентных заявок США №№ 61/179,923, поданной 20 мая 2009 г., и 61/319,513, поданной 3 марта 2010 г., включены этим полностью путем ссылки в данную заявку. Объект изобретения всех указанных ссылок этим включен в данную заявку путем ссылок. В случае, если значение включенного термина противоречит значению термина, определенного в данной заявке, то значение терминов, которые содержатся в данной заявке, будет доминировать над значением включенных терминов.

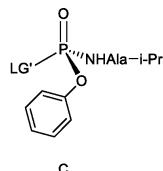
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения соединения формулы $S_p\text{-}4$



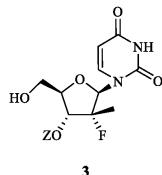
включающий:

i) взаимодействие соединения С



где LG' представляет собой п-нитрофеноксид, п-хлорфеноксид, о-хлорфеноксид, 2,4-динитрофеноксид или пентафторфеноксид,

с основным реагентом и соединением 3



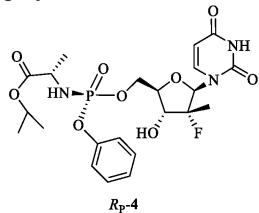
где Z представляет собой водород,
для получения $S_p\text{-}4$ или

ii) взаимодействие соединения С с основным реагентом и соединением 3, где Z выбран из бензоила, ацетила, фенилзамещенного бензоила, тетрагидропиринила, тритила, 4,4'-диметокситритида, 4-моно-метокситритида, триметокситритида, трет-бутилдиметилсилила, трет-бутилдифенилсилила, -Si(iPr)₂OSi(iPr)₂OH, -C(O)CH₂CH₂C(O)CH₃ и -C(O)OCH₂Ph, и снятие защитной группы для получения $S_p\text{-}4$.

2. Способ по п.1, где LG' представляет собой п-нитрофеноксид.

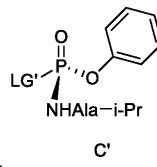
3. Способ по п.1, где LG' представляет собой пентафторфеноксид.

4. Способ получения соединения формулы $R_p\text{-}4$



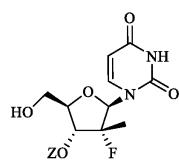
включающий:

i) взаимодействие соединения С'



где LG' представляет собой п-нитрофеноксид, п-хлорфеноксид, о-хлорфеноксид, 2,4-динитро-

феноксид или пентафторфеноксид,
с основным реагентом и соединением 3



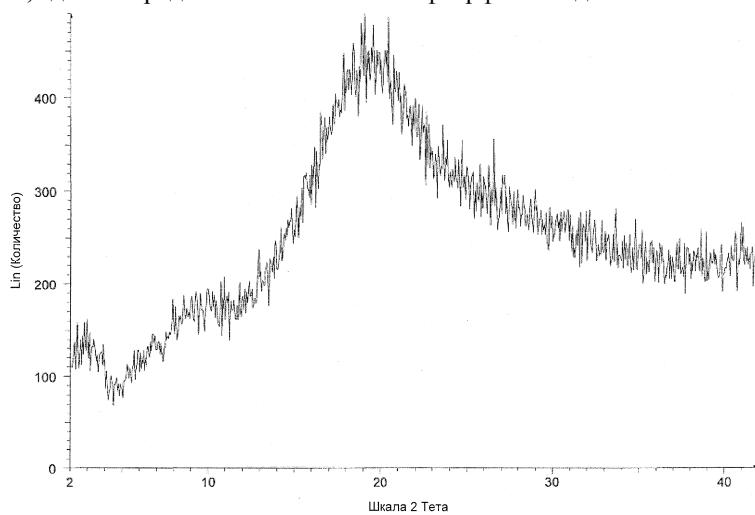
3

где Z представляет собой водород,
для получения R_p -4 или

ii) взаимодействие соединения C' с основным реагентом и соединением 3, где Z выбран из бензоила, ацетила, фенилзамещенного бензоила, тетрагидропиринила, тритила, 4,4'-диметокситритида, 4-моно-метокситритида, триметокситритида, трет-бутилдиметилсилила, трет-бутилдифенилсилила, $-Si(^3Pr)_2OSi(^3Pr)_2OH$, $-C(O)CH_2CH_2C(O)CH_3$ и $-C(O)OCH_2Ph$, и снятие защитной группы для получения R_p -4.

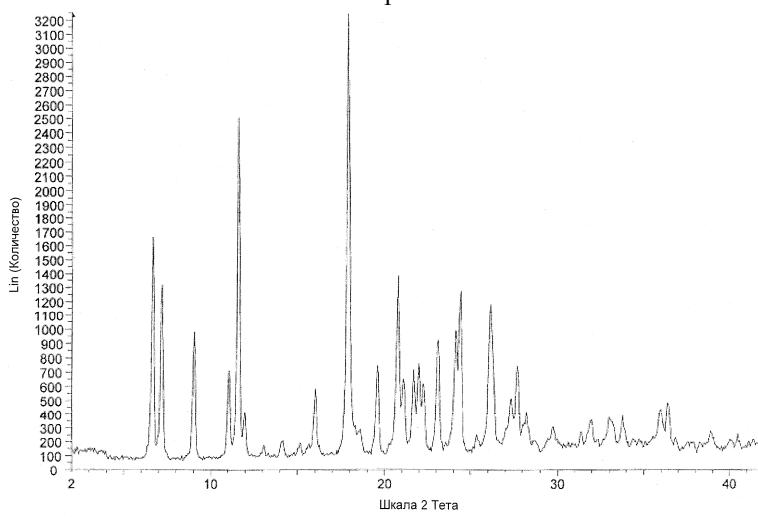
5. Способ по п.4, где LG' представляет собой π -нитрофеноксид.

6. Способ по п.1, где LG' представляет собой пентафторфеноксид.

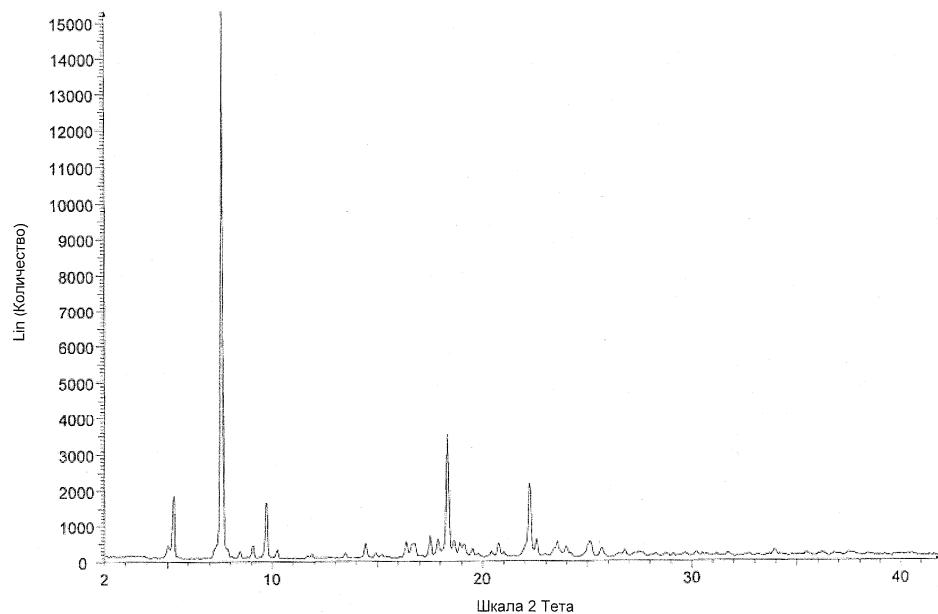


Фиг.

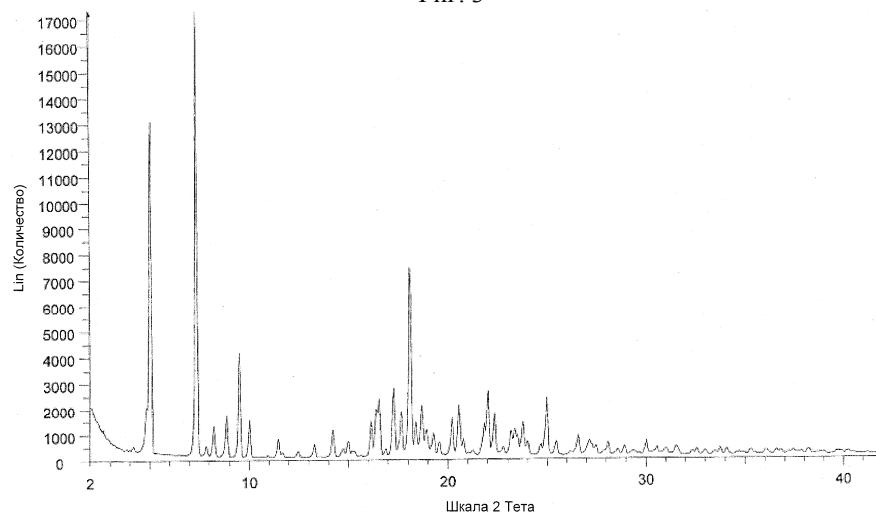
1



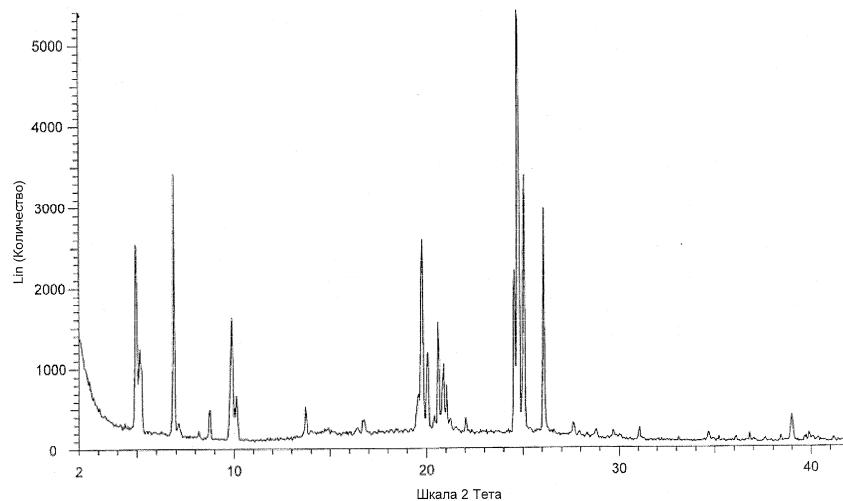
Фиг. 2



Фиг. 3

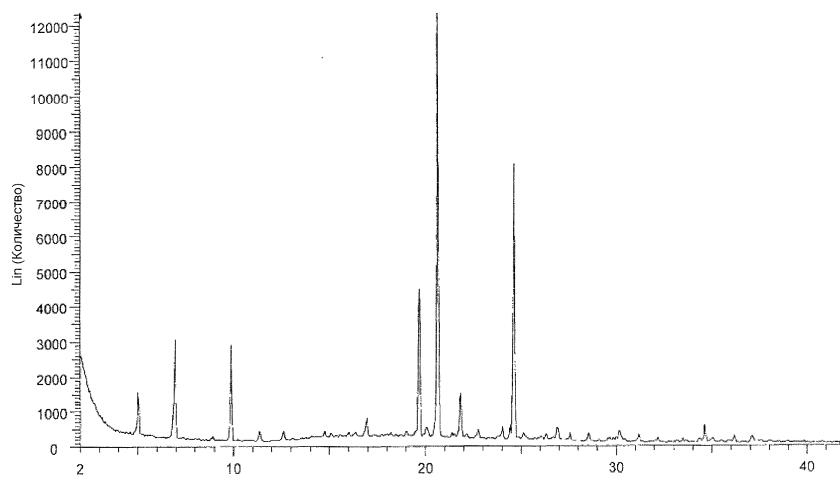


Фиг. 4

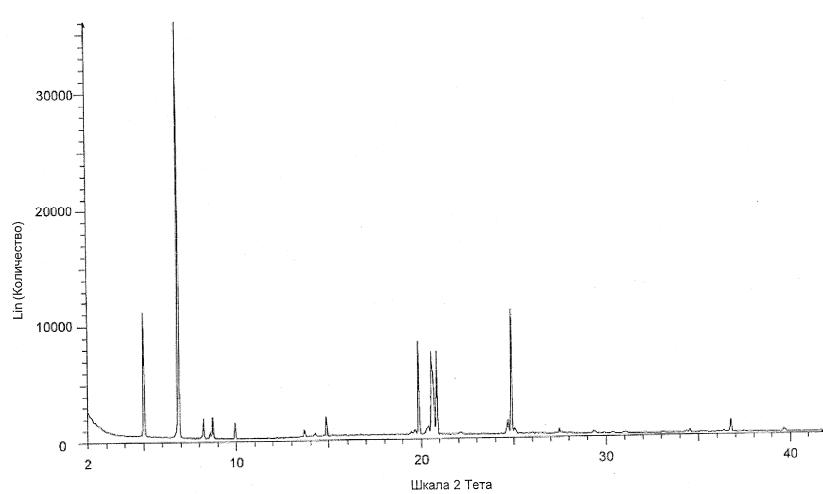


Фиг. 5

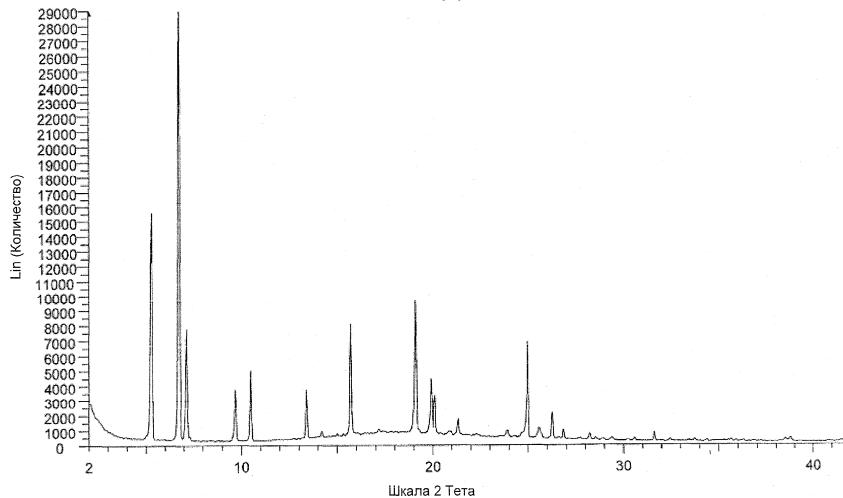
028709



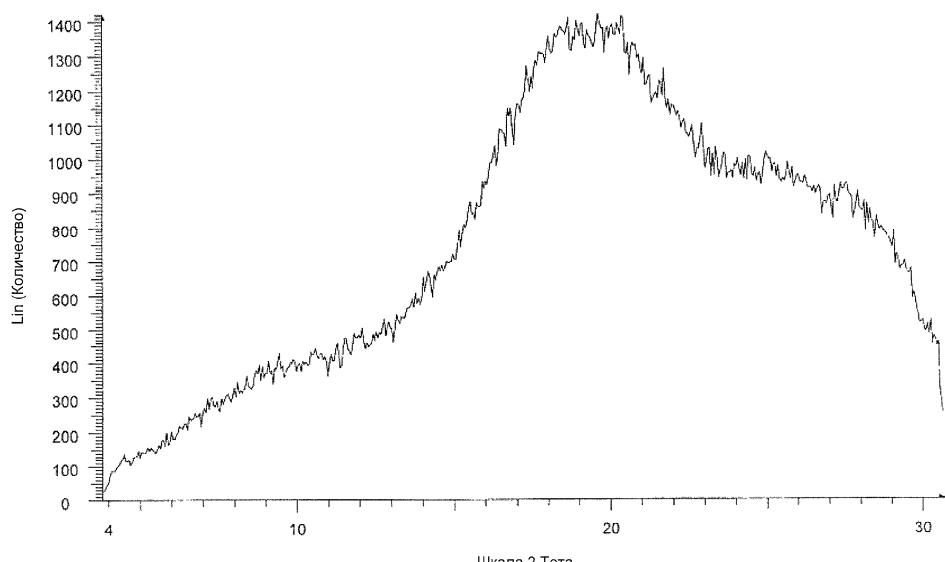
Фиг. 6



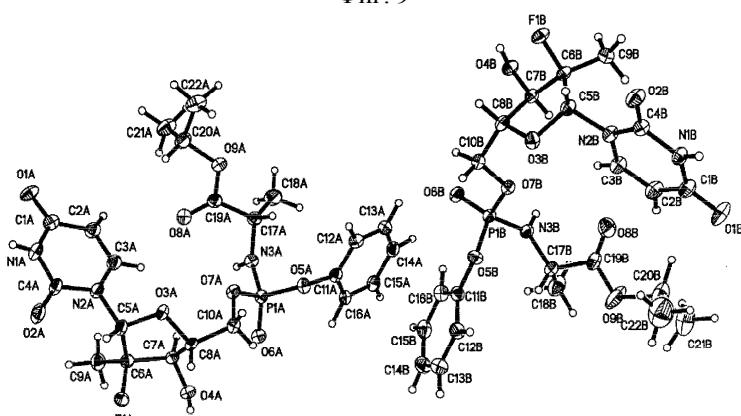
Фиг. 7



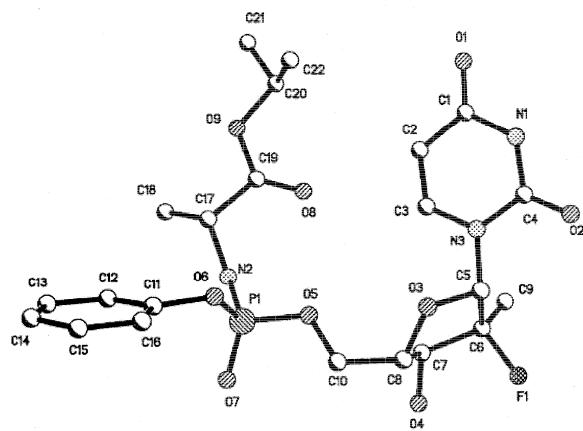
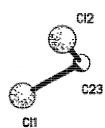
Фиг. 8



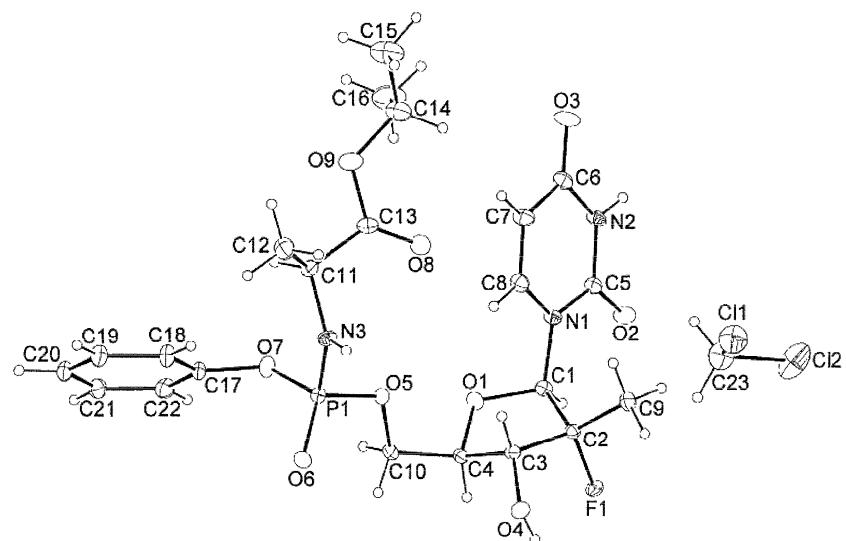
Шкала 2 Тета
Фиг. 9



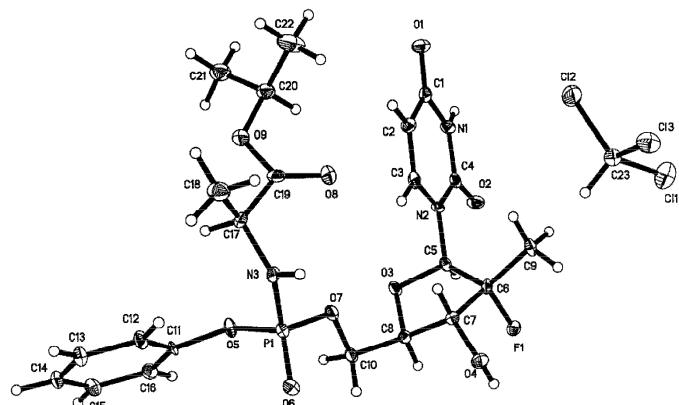
Фиг. 10



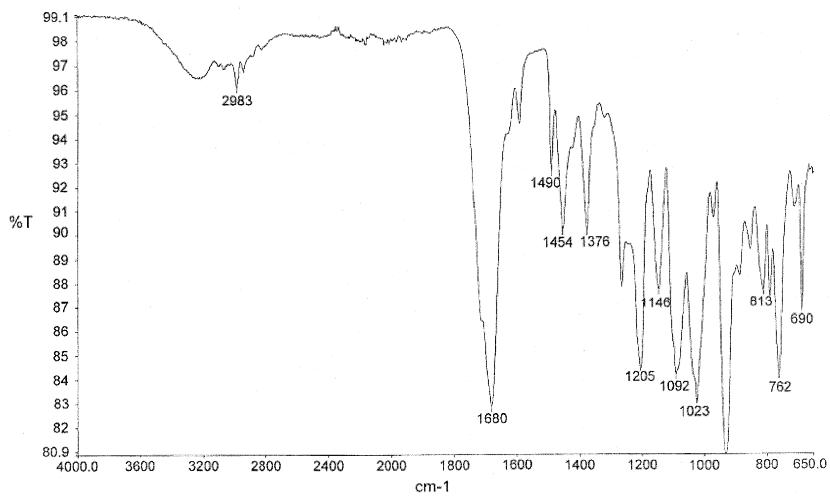
Фиг. 11



Фиг. 12

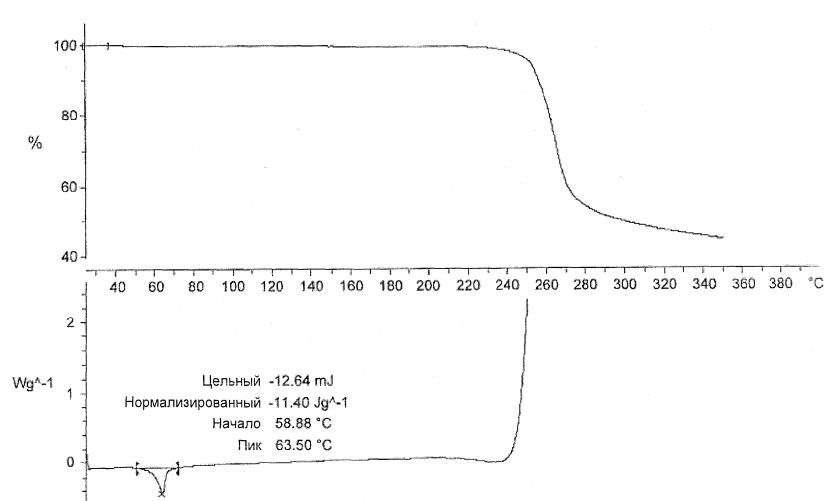
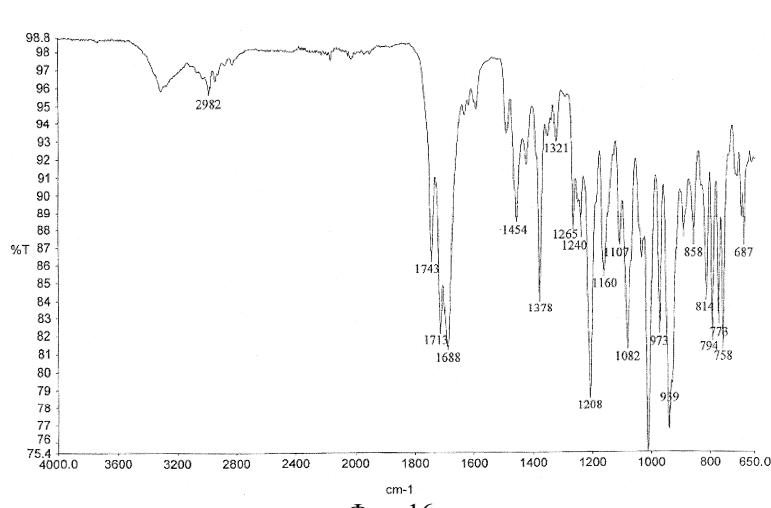
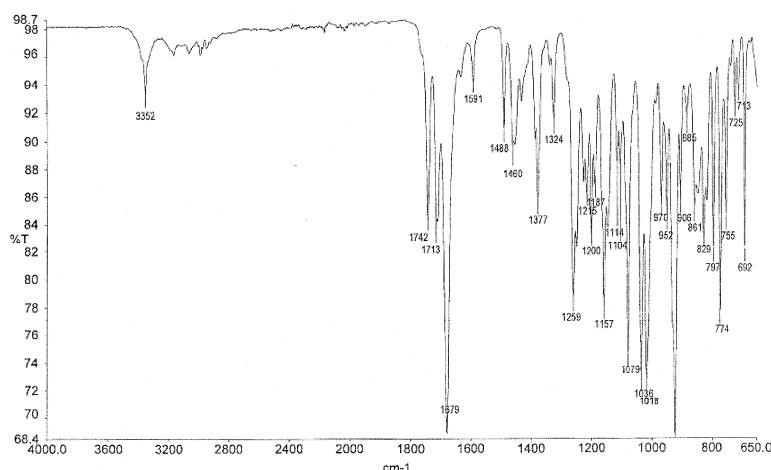


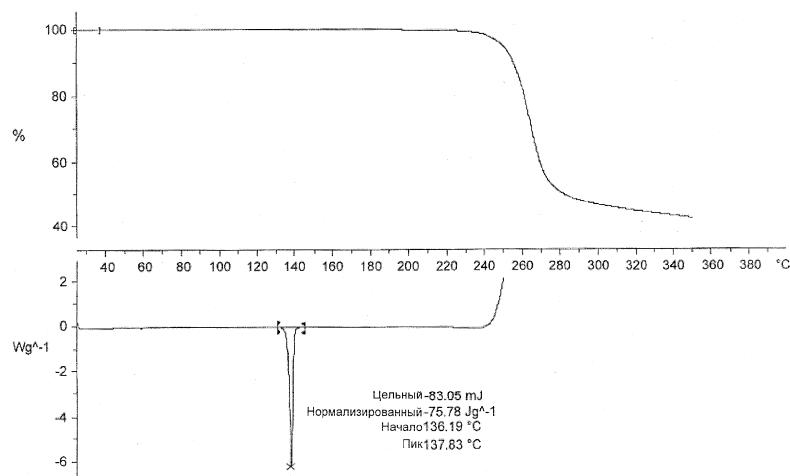
Фиг. 13



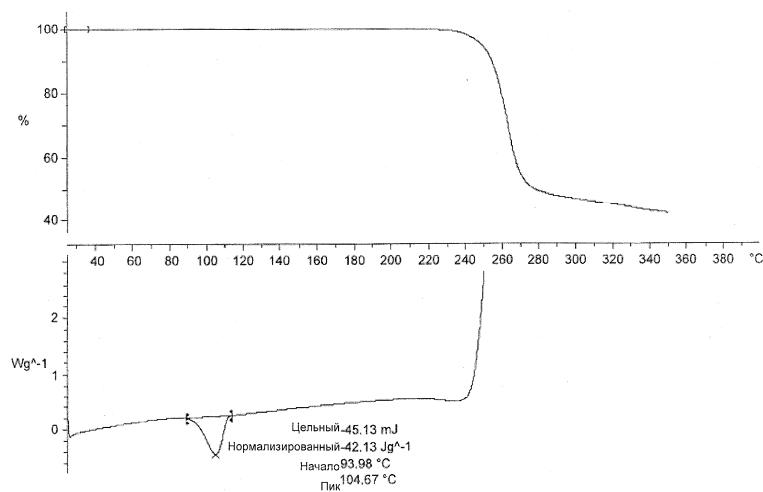
Фиг. 14

028709

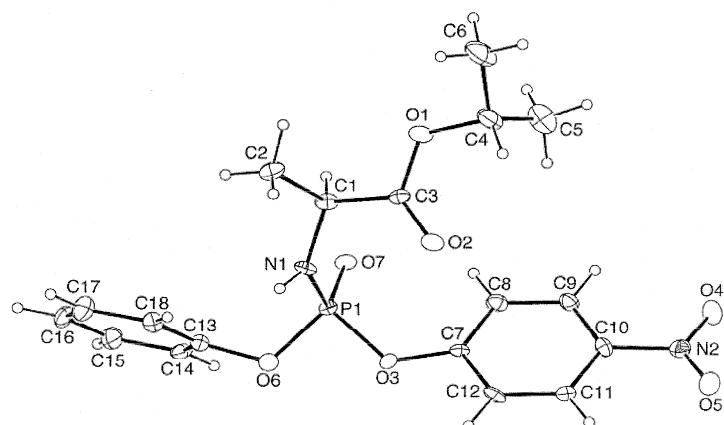




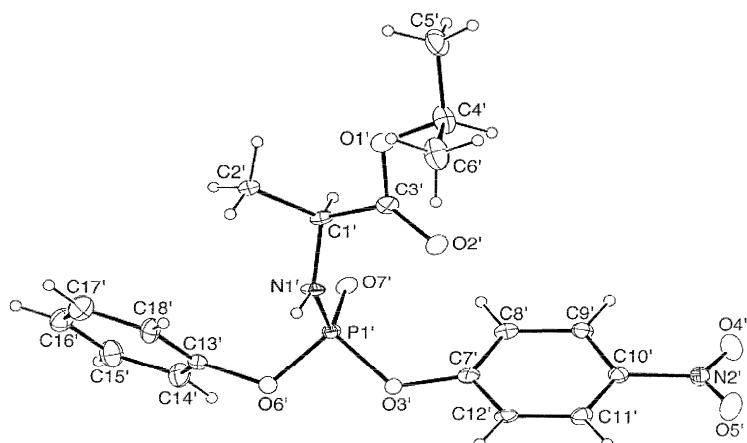
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20А



Фиг. 20В

